



**Étude de l'impact de la phosphorylation de la co-
polymérase sur l'interaction entre les protéines du
complexe de polymérisation des exopolysaccharides
chez *Lactobacillus rhamnosus***

Thèse

Hye-Ji KANG

Doctorat en science et technologie des aliments
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Hye-Ji KANG, 2014

Résumé

Les souches *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595 possèdent 17 cadres de lecture ouverts (ORF) identiques à 99 % identifiés comme gènes de biosynthèse putatifs des EPS. Par contre, les quantités produites diffèrent avec 543 mg l⁻¹ pour RW-9595M et 108 mg l⁻¹ pour ATCC 9595. La phosphorylation réversible a été proposée comme mécanisme pour réguler la polymérisation des EPS chez les bactéries lactiques. Parmi les protéines participant à la polymérisation, on propose la tyrosine kinase, la tyrosine phosphatase et la co-polymérase. Cette étude cherche à démontrer l'impact de la phosphorylation de ces protéines, surtout la co-polymérase (Wzd), sur le complexe de ces protéines chez *L. rhamnosus*. Afin de tester l'effet de la phosphorylation sur leurs interactions, Wzd (co-polymérase) et Wze (kinase) ont été exprimées chez *L. lactis* ou chez *E. coli*. Chez *L. lactis* ssp. *cremoris*, certaines combinaisons de gènes peuvent être associées à la production d'EPS *in vivo*. Chez *E. coli*, l'expression des gènes peut être contrôlée, permettant d'exprimer et de purifier des protéines dans le but d'effectuer l'étude de leurs interactions *in vitro*. Les clones de la souche *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (naturellement non productrice d'EPS) transformée avec l'opéron EPS de RW-9595M ou ATCC 9595 produisent respectivement 326 et 302 mg l⁻¹, mais avec des rendements inférieurs à la production chez la souche d'origine RW-9595M. Lors des essais *in vitro*, Wzd et Wze ne s'autophosphorylent pas lorsqu'elles sont seules, mais ensemble elles forment un complexe. Le complexe entre ces deux protéines non phosphorylées permet la phosphorylation de Wzd par Wze en présence d'ATP. Wze est libérée par la déstabilisation de cette interaction suivant la phosphorylation. L'existence de Wzd phosphorylée et de l'ATP conduit à l'auto-phosphorylation de Wze par une interaction transitoire. De plus, l'activité de Wzd est modulée par la phosphorylation des tyrosines en permettant l'autophosphorylation de Wze. Or, la phosphorylation de Wzd peut être une étape de phosphorylation réversible pour la polymérisation des EPS. Cette étude contribue à la compréhension de la relation entre les caractéristiques et les fonctions biologiques des polymères d'EPS.

Abstract

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M and ATCC 9595 have 99 % identical 17 open reading frames (ORFs) identified as putative genes coding for EPS biosynthesis and both strains produce very different EPS amounts: 543 mg l⁻¹ (RW-9595M) and 108 mg l⁻¹ (ATCC 9595). Reversible phosphorylation has been proposed as a mechanism to regulate the polymerization of EPS in lactic acid bacteria and three proteins, tyrosine kinase, tyrosine phosphatase and co-polymerase are proposed to be responsible for this regulation. The aim of this project was to demonstrate the impact of the phosphorylation of these proteins, especially the co-polymerase (Wzd), on the protein complex for EPS polymerization in *L. rhamnosus*. To test the effect of phosphorylation on their interactions, Wzd and Wze were expressed in *L. lactis* subsp. *cremoris* and *E. coli*. In *L. lactis* subsp. *cremoris*, the presence of certain combinations of genes can be associated with EPS production yields. In *E. coli*, gene expression can be controlled and the proteins purified in order to study their interactions and phosphorylation state *in vitro*. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, a non EPS-producing strain, was transformed with two recombinant plasmids coding for the genes required for EPS synthesis. These transformants with operons from either RW-9595M or ATCC 9595 produce 326 and 302 mg l⁻¹ respectively, with lower yields than RW-9595M. The proteins encoded by *wzd* and *wze* are respectively the co-polymerase and the kinase which theoretically participate in determining the chain length of the EPS. These two proteins do not autophosphorylate when they are alone, but together form a complex. The non-phosphorylated complex of two proteins allows the phosphorylation of Wzd by Wze, in the presence of ATP. This phosphorylation destabilizes the protein interaction with Wze. The transient interaction with phosphorylated Wzd leads to autophosphorylation of Wze in the presence of ATP. In addition, the activity of Wzd is modulated by tyrosine phosphorylation allowing autophosphorylation of Wze. Thus, the phosphorylation of Wzd may be an additional step of reversible phosphorylation for polymerization of EPS. This study may help advance our understanding of the relationship between the characteristics and biological functions of these polymers.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Remerciements.....	xix
Avant-Propos	xxi
Introduction.....	1
Chapitre 1	5
Revue de la littérature	
1. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques.....	6
1.1 Les exopolysaccharides	6
1.3.1 Homopolysaccharides.....	7
1.3.2 Hétéropolysaccharides.....	9
2. Intérêts des exopolysaccharides.....	9
2.1 Utilisations des exopolysaccharides dans les produits alimentaires.....	9
2.2 Effets des exopolysaccharides sur la santé	11
2.2.1 Propriétés immunomodulatrices	12
2.2.2 Inhibition de l'adhésion de probiotiques aux mucus	15
3. Biosynthèse des exopolysaccharides	17
3.1 Biosynthèse des homopolysaccharides.....	17
3.2 Biosynthèse des hétéropolysaccharides.....	18
3.2.1 Transport des sucres et synthèse de sucres-1-phosphate	18
3.2.2 Synthèse des sucres nucléotidiques	21
3.2.3 Assemblage de l'unité répétée	21
3.2.4 Polymérisation et exportation	22
4. Organisation moléculaire des gènes <i>eps</i> chez les bactéries lactiques.....	26
5. Polymérisation et Co-polymérase.....	30
5.1 Les connaissances du mécanisme de polymérisation	30
5.2 La co-polymérase.....	33
6. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	38
6.1 Gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS	40
6.1.1 Wzd.....	43
6.1.2 Wze.....	44
6.1.3 Wzb.....	45
7. Problématique, Hypothèse et Objectifs	49

7.1	Problématique.....	49
7.2	Hypothèse.....	50
7.3	Les objectifs	50
Chapitre 2.....		51
Étude de la fonctionnalité des gènes de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M et ATCC 9595 codant pour la production d'exopolysaccharides chez <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 / Study of the function of the eps gene cluster from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M and ATCC 9595 expressed in <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363		
	Résumé.....	52
	Abstract	53
1.	Introduction.....	54
2.	Materials and methods	56
2.1	Bacterial strains and growth conditions	56
2.2	DNA manipulation and transformation.....	59
2.3	EPS isolation and quantification.....	59
2.4	Western immunoblotting.....	60
3.	Results.....	62
3.1	Transfer of EPS biosynthesis gene clusters from two strains of <i>L. rhamnosus</i> to <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	62
3.1.1	Construction of recombinant, EPS producing <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	62
3.1.2	Growth of recombinant <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strains.....	68
3.1.3	EPS production by recombinant <i>L. lactis</i>	70
3.2	Tyrosine phosphorylation of Wzd and Wze in <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	72
3.2.1	Deletion of Wzd, Wze, or Wzb, and tyrosine mutation of Wzd in <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	72
3.2.2	Determination of the phosphorylation state of Wzd, Wze, Wzb and Wzd9YF containing nine mutated tyrosine residues.	74
4.	Discussion	78
4.1	EPS production by <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> transformants	78
4.2	Phosphorylation state of Wzd, Wze and Wzb proteins expressed in <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	80
5.	Acknowledgments.....	81
6.	References	82
Chapitre 3.....		87
Un commutateur de la phosphorylation de tyrosine contrôle l'interaction entre la co-polymérase Wzd et la tyrosine kinase Wze chez <i>Lactobacillus rhamnosus</i>		

/ A tyrosine phosphorylation switch controls the interaction between the co-polymerase Wzd and the tyrosine kinase Wze of *Lactobacillus rhamnosus*

Résumé.....	88
Abstract.....	89
1. Introduction.....	90
2. Materials and methods.....	91
2.1 Bacterial strains and growth condition.....	91
2.2 Plasmid construction and verification.....	91
2.3 Production and purification of native and fusion proteins.....	93
2.4 Protein-protein interaction assay.....	94
2.5 Phosphotyrosine protein detection by Western blot.....	94
3. Results.....	94
3.1 Expression and purification of His ₆ -Wzd, native and GST-Wze and Wzb.....	94
3.2 Tyrosine phosphorylation of His ₆ -Wzd and GST-Wze.....	95
3.3 Interaction of His ₆ -Wzd with Wzb and Wze.....	95
4. Discussion.....	102
5. Acknowledgments.....	104
6. References.....	106
7. Supplementary Material.....	109
7.1 Comparative sequence analysis of Wzb, Wzd and Wze.....	109
7.2 References.....	112

Chapitre 4..... 113

Discussion générale, conclusion et perspectives

1. Impact des facteurs génétiques sur la biosynthèse d'EPS.....	115
2. Impact de l'environnement sur la biosynthèse d'EPS.....	122
2.1 Le besoin en énergie.....	122
2.2 La répression catabolique.....	123
3. Le mécanisme de la polymérisation.....	125
3.1 La fonction des tyrosines chez la co-polymérase.....	127
4. Conclusions et perspectives.....	130

Chapitre 5..... 133

Références

Annexe 1

Affiche présentée au « 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria » Egmond aan Zee, Netherlands, Aout 2011.....	147
---	-----

Annexe 2

Résumé de présentation orale au « 81e congrès de l'Acfas (Association francophone pour le savoir) » Québec, Canada, Mai 2013.....	149
---	-----

Liste des tableaux

Table 1.1 La comparaison des séquences d'acides aminés prédites des cadres ouverts de lecture des groupes de gènes EPS de quatre souches de <i>L. rhamnosus</i>	42
Table 2.1 Bacterial strains used in this study.....	57
Table 2.2 Plasmids used in this study	58
Table 2.3 Oligonucleotide primers used in this study.....	61
Table 2.4 EPS production by recombinant strains of <i>L. lactis</i>	70
Table 2.5 Comparison of the sequences of all tyrosine mutated and wild <i>wzd</i> genes	73
Table 2.6 Summary of tyrosine phosphorylation state of proteins produced in <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 transformed with recombinant plasmids combining one, two or three genes coding for Wzd, Wze and Wzb	77
Table 3.1 Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotide primers.....	92

Liste des figures

Figure 1.1 Structure des homopolysaccharides	8
Figure 1.2 Hypothèse de l'équilibre Th1/Th2	14
Figure 1.3 Trois impacts potentiels des EPS sur l'adhésion de probiotiques et de pathogènes aux mucus intestinaux	16
Figure 1.4 Représentation schématique du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques	20
Figure 1.5 Modèle suggéré de la biosynthèse de l'EPS chez <i>L. rhamnosus</i> GG.....	24
Figure 1.6 Voies de synthèse des CPS pour chez <i>S. pneumoniae</i> sérotype 3	25
Figure 1.7 Représentation de l'organisation génétique de l'opéron <i>eps</i> de plusieurs souches de LAB	28
Figure 1.8 Les structures des unités répétées des EPS de souches de LAB	29
Figure 1.9 Modèle proposé pour le contrôle de la polymérisation des CPS à la surface cellulaire chez <i>S. pneumoniae</i> Rx1-19F.....	31
Figure 1.10 Modèle suggéré de la biosynthèse du LPS.....	35
Figure 1.11 La structure secondaire des protéines PCP.....	36
Figure 1.12 Structure 3D de PCP1, Wzz de <i>E. coli</i>	37
Figure 1.13 Structure de la sous unité de répétée composant les EPS de <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M et R.....	39
Figure 1.14 L'organisation des gènes EPS chez <i>L. rhamnosus</i> : R, RW-9595M et ATCC 9595 et RW-6541M	42
Figure 1.15 Analyse comparative des séquences nucléotidiques du promoteurs P1 situées dans le locus de biosynthèse d'EPS de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 (ATCC) avec la séquence de RW-9595M (RW)	43
Figure 1.16 Séquences complètes des protéines Wzd et Wzb.....	46
Figure 1.17 Alignement de la séquence de Wzd avec les autres co-polymérases	47

Figure 1.18 Aligement de la séquence de Wze ATCC (<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595) avec la séquence de Wze RW (<i>L. rhamnosus</i> RW-9595M)	48
Figure 2.1 Size determination of cloned plasmid inserts (0.8 % agarose gel)	63
Figure 2.2 Construction of pEPS1 and pEPS2	65
Figure 2.3 Genetic organization of pEPS1 and pEPS2	66
Figure 2.4 Determination of inserts of recombinant plasmids (0.8 % agarose gel)	67
Figure 2.5 Growth of <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (pIL253 and pNZ124), MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) and MG1363 (pEPS1A and pEPS2A) in GM17 at 30 °C	69
Figure 2.6 Detection of the EPS producing derivatives of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 on GM17 plates containing two concentrations of glucose	71
Figure 2.7A Construction of pHJ1	75
Figure 2.7B Construction of pHJ1	76
Figure 2.8 Western immunoblot of the phosphorylation state of Wzd and Wze proteins expressed in <i>L. lactis</i> , probed with mouse monoclonal anti phosphotyrosine antibody	77
Figure 3.1 SDS-PAGE of induced cell extracts and purified Wzd, Wzb and GST-Wze	97
Figure 3.2 Western immunoblot of the phosphorylation state of His ₆ -Wzd and GST-Wze proteins expressed in <i>E. coli</i> , probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody	98
Figure 3.3 <i>In vitro</i> interaction assay between resin-bound His ₆ -Wzd _{C41} (34 kDa) and native Wze (27 kDa) proteins	99
Figure 3.4 <i>In vitro</i> interaction assays between His ₆ -Wzd (34 kDa) and GST-Wze (53 kDa) proteins	100
Figure 3.5 Detection of tyrosine phosphorylated GST-Wze released in the wash fractions	101
Figure 3.6 Model proposed for the tyrosine switch controlling EPS polymerization and attachment	105
Figure S1 Comparison of transmembrane helix score plot of Wzd (A) from <i>L. rhamnosus</i> and CpsC19f (B) (GenBank Accession number U09239)	111

Figure 4.1 Alignement de la séquence de Wze (<i>L. rhamnosus</i>) avec la séquence de EpsC (<i>L. johnsonii</i>).....	117
Figure 4.2 L'organisation du groupe de gènes de biosynthèse EPS de <i>L. rhamnosus</i>	120
Figure 4.3 Alignement de la séquence de Wzd avec les autres co-polymérase de <i>Lactococcus</i> et <i>Lactibacillus</i>	129

*Unstartled, like a lion at sounds
Unsnared, like the wind in a net
Unsmearred, like a lotus in water:
wander alone like a rhinoceros*

Buddha

Khaggavisana Sutta: A Rhinoceros
(Rhinoceros Sutra)

Remerciements

C'est volontairement que les erreurs de français de cette section n'ont pas été corrigées, afin que vous, mes amis, pensiez à moi en la lisant.

Tout d'abord, je voudrais exprimer toute ma gratitude et mes sincères remerciements à ma directrice, Gisèle LaPointe. Depuis le début, elle m'a supporté et encouragé en me permettant de compléter mon projet de doctorat. Je n'aurais sûrement pas réussi cette thèse sans toute la confiance qu'il a mis en moi. Elle m'a fourni d'excellentes conditions de travail qui m'ont permis d'obtenir de bons résultats de recherche, grâce à ses grandes connaissances scientifiques, ses grandes qualités humaines et sa disponibilité pour moi. Je tiens à la remercier de m'avoir re-compris la joie de recherche.

Merci au Professeur Christophe Gilbert qui est mon codirecteur et au Professeur Steve Labie d'avoir fait la prélecture de ma thèse. Je tiens à la remercier leurs bons conseils afin de l'améliorer. Je ne vais pas oublier votre aide.

Je tiens à remercier Denis Roy pour les conseils de sciences et de québécoise (hum.....oui c'était vraiment québécois pas français!), et m'avoir donné plusieurs expériences professionnelles, de même que pour sa grande humanité.

Je veux maintenant remercier tous les anciens du laboratoire qui ont facilité mon intégration, à savoir Mash (Marie-Hélène Lessard), Rachel Rioux, Marteau (Marianne Arteau) et Marie Filteau. Grace aux elles, j'ai pu bien approprier la vie Québec et au labo au début, sans avoir le mal du pays.

Un merci à tous mes collègues et amis du laboratoire: Amel, Nathalie et Nassim (pour toutes ces longues discussions scientifiques et non scientifiques interminables), Émilie (pour l'expression québécois... un motton), Seb~astien (pour toutes les journées et soirées et l'aide pour la petite vie à Nantes), Mérielie (pour accompagner de travailler tôt du matin

et de magasiner au magasin asiatique! Merci à son cheval chéri Accent), Pat (pour les sécurités au lab) et Véro (Véronique : pour toutes les soirées avec beaucoup de chips).

Merci à tous les stagiaires françaises qui sont passés durant ma thèse, Mathilde, Marion, Guillaume et Marine. En plus, merci à l'équipe d'IFREMER de Nante qui me donne belle expérience et beaux temps à Nante.

Merci aussi à mes amies au Québec : mes françaises préférés (Jef et popo), les équipes de plantes et mes amies coréennes-quebecoises.

Un grand merci à mon meilleur ami québécois et mon bizarre professeur de français... québécoise : Cho- Joseph Lupien Meilleur (pour énormément grand aide à vivre à Québec)!

Un grand merci aux Ok-Ju, KANG et Kenu Tae, Lee qui a aidé à venir à Québec. Merci aussi tous les autres professeurs et Kun Youg Park.

Je tiens à remercier ma famille en Corée du sud, mes parents (사랑하는 아빠, 엄마) et mon frère (우리 우철이: 고생이 많다 동생) qui me toujours supportent. Je remercie aussi à ma meilleure amie (이뿌이) et mes tous les autres familles et des amies. Grace à vous, je peux finir ma thèse.

Avant-Propos

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques pour soumission à des revues avec comité de lecture. Les chapitres rédigés en anglais sont précédés d'un résumé en français et les références bibliographiques des chapitres sont présentées à la fin de chaque chapitre.

Le manuscrit est composé de quatre chapitres et le premier chapitre, intitulé « Revue de la littérature », donne une vue d'ensemble des connaissances récentes sur les exopolysaccharides (EPS) et leur intérêt ainsi que leurs applications. Dans ce même chapitre, l'état actuel de la recherche sur les mécanismes de biosynthèse des EPS est introduit, dans le but de souligner les aspects sur lesquels les connaissances sont insuffisantes et les directions nécessaires pour faire avancer notre compréhension. À la suite de cette revue de la littérature, les hypothèses et les objectifs de recherche sont présentés.

Le chapitre 2, intitulé « Étude de la fonctionnalité des gènes de *Lactobacillus rhamnosus* codant pour la production d'exopolysaccharides chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 », décrit l'utilisation de *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 transformée avec les opérons codant pour la biosynthèse des EPS provenant de *L. rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595 pour déterminer comment l'espèce exprimant les gènes affecte le rendement de synthèse des EPS. Les états de la phosphorylation des protéines sont aussi présentés avec les mutants générés chez *L. lactis*. J'ai planifié et effectué la plupart de l'expérimentation, avec la participation de Mathilde Guzzo et Marion Neuille à certains travaux de biologie moléculaire dans le cadre de leur stage d'été. Ce chapitre fait partie d'un manuscrit en préparation pour soumission au journal "*Applied Microbiology and Biotechnology*".

Le chapitre 3, intitulé « Un commutateur de la phosphorylation de tyrosine contrôle l'interaction entre la co-polymérase Wzd et la tyrosine kinase Wze chez *Lactobacillus rhamnosus* » évalue l'impact de la phosphorylation des protéines codées par les gènes *wzb*, *wzd* et *wze* de *L. rhamnosus* ATCC 9595 sur leur interaction. Le manuscrit est soumis sous forme d'article scientifique au le journal *FEBS Letters*, avec la collaboration des co-auteurs

à la révision du texte. Mme Frédérique Badeaux a participé aux étapes préliminaires de l'étude dans le cadre de son mémoire de maîtrise. M. Christophe Gilbert a collaboré au projet en effectuant une partie de l'expérimentation visant l'état de phosphorylation de la protéine Wzd (Fig. 3.3) et a contribué vivement aux discussions sur l'interprétation des résultats pour arriver aux modifications proposées au mécanisme de polymérisation des EPS.

Pour la réalisation de ce projet, j'ai effectué ainsi la grande majorité des manipulations et j'ai planifié et supervisé les travaux des stagiaires. J'ai également analysé et interprété les résultats, conçu les figures et tableaux et rédigé les manuscrits. Cette thèse a été réalisée sous la direction du Dr Gisèle LaPointe qui a encadré la planification et la réalisation des travaux, la discussion des résultats et à la rédaction des manuscrits avec ses conseils judicieux.

Finalement, le chapitre 4 est une discussion générale pour l'ensemble du projet et se termine par une conclusion générale. Les limites de cette étude et les perspectives de recherche sont aussi décrites.

Introduction

Les interactions entre les bactéries et leurs hôtes sont modulées par des structures à la surface des cellules telles que les polysaccharides extracellulaires (EPS; exopolysaccharides). Ces polymères sont généralement considérés comme ayant un rôle de protection contre des conditions environnementales défavorables (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Les polysaccharides de surface jouent également un rôle dans la reconnaissance cellulaire, et peuvent ainsi permettre aux bactéries pathogènes et aux bactéries commensales d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

Les polysaccharides sont principalement connus pour leurs effets sur les propriétés rhéologiques lorsqu'ils sont ajoutés à un produit alimentaire. Les EPS peuvent agir comme épaississant, stabilisant, émulsifiant, substitut de matière grasse et/ou agent gélifiant dans les aliments (Roberts, 1995; Sutherland, 1998). Les caractéristiques intrinsèques des EPS comme la masse molaire, la rigidité, le nombre d'embranchements et leur composition influencent leurs propriétés. Les souches bactériennes capables de produire les EPS appropriés et de fermenter le lait auraient un avantage à être utilisées. En effet, certains EPS produits jouent le rôle de texturants et de ce fait limitent l'ajout d'additifs alimentaires dans le produit final, tels que l'amidon ou la gélatine, en modifiant la texture ou la consistance.

Dans l'industrie alimentaire, les bactéries productrices d'EPS appartiennent aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus* sont employées pour améliorer les caractéristiques de texture des produits laitiers, particulièrement le yogourt et le fromage à faible teneur en matière grasse (Martensson *et al.*, 2003). Plusieurs applications de ces bactéries lactiques ont le statut GRAS (Generally Recognized As Safe; (Cerning, 1990)), c'est-à-dire que leur utilisation est reconnue comme sans danger pour la santé.

Certaines souches de *Lactobacillus rhamnosus* sont actuellement ajoutées aux produits laitiers tels que le yogourt et le fromage en tant que cultures probiotiques ayant des effets bénéfiques sur la santé. *L. rhamnosus* GG a bien documenté les essais cliniques, montrant une réduction de l'eczéma atopique chez les enfants, par exemple (Kalliomäki *et al.*, 2003). Un yogourt contenant la souche *L. rhamnosus* GR-1 a montré des effets anti-diarrhéiques chez les patients atteints du VIH / SIDA (Anukam *et al.*, 2008) et des effets anti-

inflammatoires chez les patients présentant une maladie intestinale chronique inflammatoire (Lorea Baroja *et al.*, 2007).

Les études concernant les probiotiques sont importantes, dû à leurs effets sur la santé, cependant il s'avère nécessaire de continuer l'étude des bactéries lactiques. Il faut aussi continuer les études sur le mécanisme de biosynthèse des EPS des bactéries lactiques. En connaissant le mécanisme d'action, les signaux nécessaires pour induire une production des EPS et les facteurs environnementaux et génétiques qui l'influencent, la production des EPS pourra être maîtrisée. De plus, en comprenant le mécanisme de polymérisation plus en détail, il sera possible de contrôler la production et la masse moléculaire des EPS désirées. L'industrie alimentaire bénéficierait beaucoup d'avoir accès à des souches bactériennes capables d'assurer tant la fermentation que la production d'EPS appropriés.

L. rhamnosus RW-9595M est une souche productrice d'EPS produisant environ 400 mg/L d'EPS dans le lait (Dupont *et al.*, 2000) et 2767 mg/L en milieu synthétique, sous contrôle de pH (Macedo *et al.*, 2002). Cette souche est un variant de la souche ATCC 9595 qui ne produit que 50 à 100 mg/L d'EPS. Les EPS de RW-9595M ont montré des propriétés d'immunomodulation en stimulant la production de cytokines associées à la réponse Th1, incluant l'IL-12 et l'interféron gamma. Les EPS pourraient donc induire une résistance accrue contre les agents infectieux et permettre une réduction des manifestations allergiques (Chabot *et al.*, 2001).

Une analyse de la séquence nucléotidique des opérons EPS de ces deux souches a montré qu'il y avait très peu de différences (Péant *et al.*, 2005). En revanche, les mécanismes de contrôle de la synthèse d'EPS restent encore à élucider, étant donné que les lactobacilles se transforment difficilement et que les mutants sont instables et difficiles à générer. Les lactocoques peuvent croître et se manipulent facilement (De Vos et Simons, 1994). Elles seraient un bon modèle de bactéries lactiques pour étudier ces mécanismes de synthèse en utilisant les opérons EPS de RW-9595M et ATCC 9595. En transférant des gènes plasmidiques chez *Lactococcus*, nous serions en mesure d'effectuer plus facilement des changements ponctuels ou des délétions de gènes. Les gènes chromosomiques sont plus difficiles à modifier, car chaque modification implique la génération d'un mutant. Lorsque

les gènes sont plasmidiques, on peut les recombiner *in vitro*, et simplement transformer l'hôte (*L. lactis*) avec les plasmides modifiés.

L'état de phosphorylation et les interactions entre les trois protéines (co-polymérase, kinase et phosphatase) considérées comme contrôlant la longueur de la chaîne des EPS sont proposées pour être à l'origine des mécanismes de polymérisation des EPS. L'interaction entre la kinase et la co-polymérase a été observée et la phosphorylation de la kinase a lieu en raison de la présence de la co-polymérase, mais le mécanisme de contrôle de cette interaction n'est pas connu. Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'avancer dans la compréhension de la biosynthèse des EPS.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques

1.1 Les exopolysaccharides

Les bactéries sont capables de produire de longues chaînes de polysaccharides qui peuvent être utilisés pour construire la paroi cellulaire. Ces polysaccharides qui sont excrétés à l'extérieur des cellules peuvent être divisés en deux groupes : 1. Les polysaccharides capsulaires (CPS) sont attachés par des liaisons covalentes à la paroi des cellules. 2. Les exopolysaccharides (EPS) ne sont pas attachés et ils sont libérés dans l'environnement ou restent faiblement attachés (Cerning, 1995; Boels *et al.*, 2001). Les bactéries lactiques (LAB) sont capables de produire plusieurs types de ces polysaccharides comme les EPS ou les CPS.

1.2 Rôles des exopolysaccharides

Les EPS peuvent jouer un rôle dans la protection des bactéries contre les prédateurs, les antibiotiques, la dessiccation, le stress osmotique, les composés toxiques et contre la phagocytose (Vuyst et Degeest, 1999). Ils peuvent également contribuer à la formation de biofilms et favoriser ainsi l'adhérence et la colonisation. Ces rôles sont intéressants pour des bactéries résidant dans le tractus gastro-intestinal. En général, les EPS ne sont pas utilisés comme source d'énergie, à l'exception de quelques bactéries qui sont capables de dégrader les polysaccharides qu'ils produisent (voir section 2.2 pour ce sujet). Par exemple, *Streptococcus mutans* et *S. sobrinus* peuvent dégrader le dextrane qui est produit et, de plus, *S. mutans* peut utiliser les oligosaccharides résultants (Colby et Russell, 2003). La dégradation des EPS a aussi été observée chez *Lactobacillus rhamnosus* R pendant la fermentation. Cet EPS a été dégradé par les glycohydrolases qui ont été extraits de la cellule (Pham *et al.*, 2000). La production de CPS par *S. pneumoniae* est un facteur de virulence.

1.3 Classification des exopolysaccharides

Les EPS sont classés en deux groupes, les homopolysaccharides (HoPS) et les heteropolysaccharides (HePS), selon la composition en monosaccharide et le mécanisme de biosynthèse (Vuyst et Degeest, 1999).

1.3.1 Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides sont composés d'un seul type de monosaccharide comme, par exemple, le glucose ou le fructose qui constituent respectivement les glucanes et les fructanes. Les HoPS sont de haute masse moléculaire et la structure varie selon les souches et les conditions de cultures. Les HoPS ont des différences au niveau du degré de ramification et le type de liaison osidique. La production de HoPS requiert la présence de substrats spécifiques comme le sucrose, dont les unités sont souvent assemblées à l'extérieur de la cellule sans apport énergétique de la cellule (Monsan *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2012). Certains HoPS, tel que les beta-glucanes, sont synthétisés par un mécanisme dit synthase-dépendant (voir la section 3. 1 pour plus de détails). Ces polymères sont produits en plus grande quantité que les HePS chez les bactéries lactiques. Par exemple, *L. reuteri* LB121 peut produire 10 g l⁻¹ de ces polymères (glucan et fructan), dans le milieu MRS en présence de 100 g de sucrose (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan, 2005).

- Fructanes : il en existe deux types, la lévane et l'inuline. Les lévanes sont constitués de résidus de fructose liés par des liaisons β (2→6) (Figure 1.1 A) et ils sont produits par les streptocoques (*S. salivarius*). L'inuline est constituée également de résidus fructose, mais liés par des liaisons osidiques β (2→1) (Figure 1.1 B) et il est utilisé comme prébiotique pour favoriser la croissance de bifidobactéries (Wang et Gibson 1993; Kolida et Gibson, 2007). *S. mutans* produit ces fructo-oligosaccharides.
- Glucanes : Ce sont des polysaccharides composés exclusivement par des chaînes de glucose attachées par liaisons α -1→6, α -1→3, α -1→4 et α -1→2. Le dextrane est produit par la dextransucrase qui catalyse la liaison les α -1→6 liaisons osidiques (Figure 1.1 C).

Leuconostoc mesenteroides secrète la dextransucrase qui peut hydrolyser les sucres pour produire le dextrane. La souche NRRL B-512F produit le dextrane soluble qui est 95 % linéaire et la souche NRRL B-640 produit aussi le dextrane qui est hautement linéaire avec une liaison α (1 \rightarrow 6). Ce dextrane est utilisé pour la chromatographie d'exclusion stérique comme Sephadex et pour le sulfate de dextrane qui empêche la coagulation du sang.

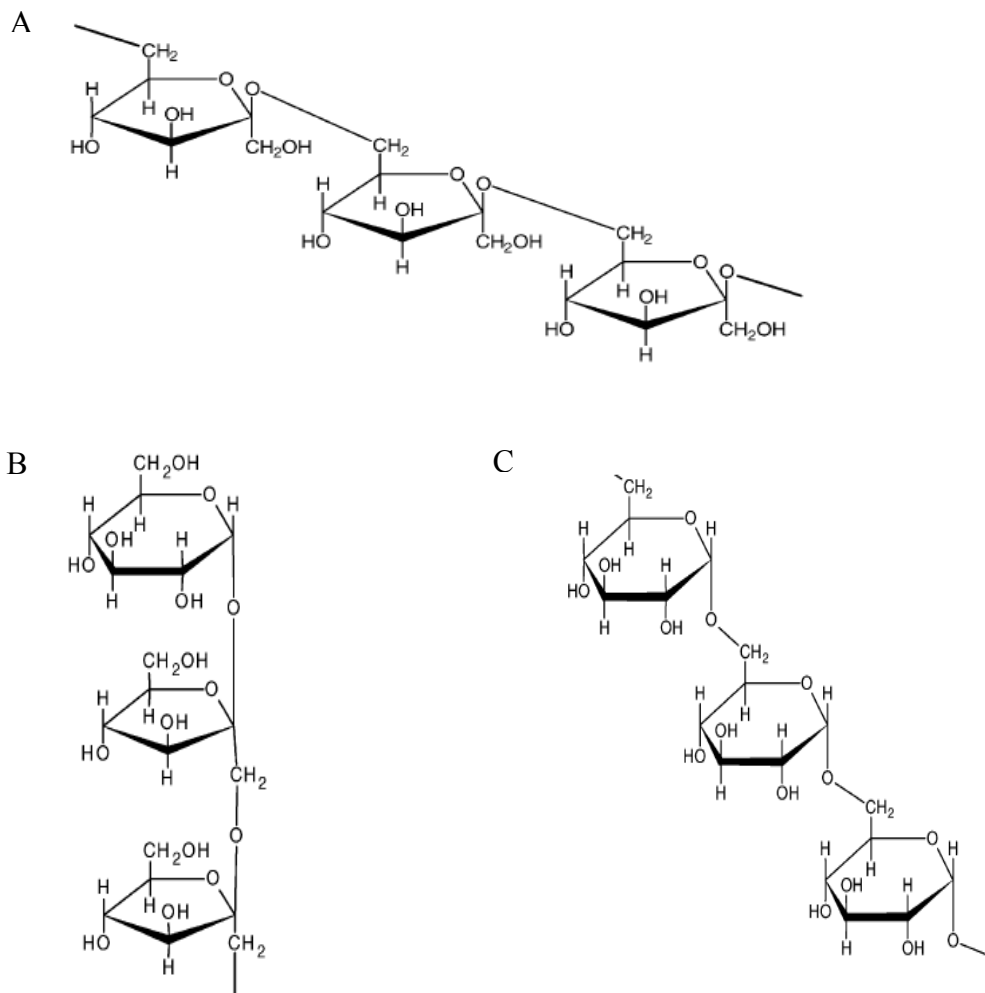


Figure 1.1 Structure des homopolysaccharides

Fructanes : le lévane (A) et l'inuline (B)

Glucanes : le dextrane (C)

1.3.2 Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides sont formés par l'assemblage de centaines d'unités répétées. Chaque unité est composée de deux à huit résidus avec au moins deux monosaccharides différents, et peut contenir des substances organiques (acétyle, glycérol) et inorganiques (groupe phosphate) autres que des glucides. Les HePS varient en fonction de leur composition en sucres et leur masse moléculaire qui se situe entre $1,0 \times 10^4$ et $6,0 \times 10^6$ Da. Le D-glucose, le D-galactose et le L-rhamnose sont les sucres les plus fréquemment identifiés. La structure des unités répétées a été caractérisée chez plusieurs souches de streptocoques, lactobacilles et lactocoques. Les différents EPS qui sont produits par une souche peuvent être influencés par le milieu et les conditions de culture (Cerning, 1995; Vuyst et Degeest, 1999; De Vuyst *et al.*, 2001). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est capable de synthétiser deux types d'EPS pendant la fermentation, en fonction du sucre présent dans le milieu (Grobben *et al.*, 1997). L'EPS de faible poids moléculaire a été produit avec le fructose. Par contre, un polymère de haut poids moléculaire a été produit avec le glucose. Les HePS sont produit par les bactéries lactiques mésophiles (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. casei*, *L. sake*, *L. rhamnosus*, etc.) et thermophiles (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus* et *S. thermophilus*) (Vuyst et Degeest, 1999)

2. Intérêts des exopolysaccharides

2.1 Utilisations des exopolysaccharides dans les produits alimentaires

Les EPS qui sont synthétisés par les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la fabrication des produits laitiers fermentés tels que le yogourt, le fromage et la crème sûre (Crescenzi, 1995; Bouzar *et al.*, 1997). Ils contribuent à la texture, aux propriétés organoleptiques et à la stabilité des produits finis.

Une application des biopolymères dans l'industrie est leur utilisation comme agent de gélification. Un gel de polysaccharides est un réseau tridimensionnel. Ce réseau est formé par des interactions entre des chaînes de polymères chargées négativement et des ions chargés positivement. Il est formé aussi via des interactions entre les différentes chaînes

neutres de l'EPS par des ponts hydrogènes et par l'intervention de force de Van-der-Waals.

Les EPS produits par des bactéries qui effectuent la fermentation influencent la texture et les caractéristiques sensorielles dans le yogourt faible en gras. La matière grasse est importante pour les qualités sensorielles des aliments comme la saveur, la couleur et la texture (Hassan *et al.*, 2002; Ruas-Madiedo *et al.*, 2005). Le yogourt faible en gras est moins ferme que celui riche en gras, à cause de la diminution du nombre de globules gras qui agissent en tant que supports de la structure du réseau protéique. L'utilisation des souches productrices d'EPS dans la fabrication du yogourt peut empêcher la synérèse et la fracture du gel, par ailleurs elles peuvent augmenter la viscosité et influencer la force de gel (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). L'influence de différentes souches productrices d'EPS dans les yogourts faible en gras a été vérifiée (Güler-akin *et al.*, 2009). Le yogourt faible en gras avec les souches EPS+ (*S. thermophilus* et *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) ont eu moins de synérèse et plus de viscosité que ceux faits avec les souches EPS-.

Les bactéries lactiques produisant des EPS ont été utilisées pour la production de fromages faible en gras. Par exemple, plusieurs souches de *L. helveticus* utilisées pour produire la Mozzarella faible en gras produisent des EPS et ceux-ci contribuent à la rétention de l'eau dans le produit (Kojic *et al.*, 1992; Low *et al.*, 1998; Perry *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2000). Les teneurs en gras et en eau sont importantes pour la texture du fromage et les EPS peuvent aider à maintenir l'humidité dans ce type de produit. En plus, les souches de *L. lactis* productrices d'EPS ont amélioré l'humidité et la texture du fromage Cheddar. Les fromages produits sont ainsi plus élastiques, plus cohésifs et moins fermes que les fromages produits avec la souche non productrice (Dabour *et al.*, 2005; Dabour *et al.*, 2006).

Beaucoup d'études suggèrent que toutes ces propriétés fonctionnelles des EPS semblent être influencées par leur composition chimique, leur charge, leur masse moléculaire et leur rigidité. Il n'est pas facile de comprendre les principes de la relation entre les fonctions et les caractéristiques des EPS, à cause de la diversité des EPS. Une étude précédente a vérifié les impacts des caractéristiques sur la viscosité du lait fermenté avec plusieurs types d'EPS de trois souches de *S. thermophilus* et de quatre souches de *L. delbrueckii* (Gentès *et al.*, 2011). La viscosité, la fermeté et la rétention de lactosérum du lait fermenté ont été améliorées par les EPS ayant une haute masse moléculaire, une chaîne rigide et peu

ramifiée. Cette étude a proposé une corrélation entre la masse moléculaire et la viscosité. La masse moléculaire des EPS peut donc être un déterminant important de la viscosité.

2.2 Effets des exopolysaccharides sur la santé

Les EPS sont connues pour leurs effets sur la santé, tel que l'activité anti-tumorale, l'abaissement du cholestérol sanguin, l'activité contre les ulcères gastriques, comme prébiotique actif et dans l'immunomodulation. L'activité anti-tumorale a été démontrée avec *L. lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 et leur EPS, qui augmentait le pouvoir cytotoxique des macrophages (Kitazawa *et al.*, 1991). L'activité contre des ulcères gastriques a été étudiée avec les EPS de certaines souches de bifidobactéries, de lactobacilles et de streptocoques. Cette activité a été surtout observée avec les EPS ayant un contenu en rhamnose supérieur à 60 %, ce qui suggère que ce monosaccharide pourrait être particulièrement impliqué dans l'effet anti-ulcère (Nagaoka *et al.*, 1994).

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles par l'humain qui stimulent la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries dans leur système digestif avec un effet bénéfique sur la santé. Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides qui échappent à la digestion dans l'intestin et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales. Le plus commun des prébiotiques est les fructo-oligosides (ex. inulin) (Gibson et Roberfroid, 1995). La susceptibilité des EPS à la digestion est importante pour le rôle de prébiotiques. L'EPS produit par *L. lactis* ssp. *cremoris* NZ4010 n'était pas digéré dans le système gastro-intestinal de souris (Looijesteijn *et al.*, 2001). Les biodégradabilités de six EPS des bactéries lactiques étaient testées *in vitro* (Ruijssenaars *et al.*, 2000). Les EPS de *S. thermophilus* SFi12 et SFi39, qui étaient facilement dégradés, ont des structures relativement simples, avec un seul branchement de résidu β -galactosyle. Par contre, les EPS de *L. lactis* ssp. *cremoris* B40 et de *L. sakei* 0-1, qui également n'étaient pas dégradés, contiennent deux branchements, un contenant des monosaccharides non chargés et l'autre contenant des substituants chargés. La biodégradabilité semble être variée en fonction des EPS et certains résidus utilisés qui peuvent réduire l'accès aux enzymes. Pour utiliser des

EPS comme prébiotiques, d'autres études sont nécessaires, en particulier sur la biodégradation de ces polymères par les bactéries intestinales et les effets potentiels sur la santé induits.

2.2.1 Propriétés immunomodulatrices

Beaucoup d'études ont montré des activités immunomodulatrices de certains EPS produits par les bactéries lactiques. Les caractéristiques physico-chimiques des EPS déterminent leurs propriétés (Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012). La stimulation de la production des cytokines anti- ou pro-inflammatoire par les EPS variant selon la charge, la composition et la taille moléculaire a été récemment proposée (Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012; López *et al.*, 2012).

La régulation immunitaire assure une homéostasie entre les activités des cellules Th1 et des cellules Th2. Les cellules Th produisent selon leur dominance des réponses immunitaires comme les maladies auto-immunes (Type Th1) ou allergies (Type Th2), quand l'équilibre entre deux cellules Th est rompu. Les cellules Th1 produisent les cytokines pro-inflammatoires (ex. IFN- γ) et confère une protection contre les agents infectieux par la phagocytose en induisant les cellules comme les macrophages, les neutrophiles et les monocytes. Par ailleurs, les cellules Th2 sécrètent les cytokines anti-inflammatoires (ex. IL-4, IL-5) et sont plus impliquées dans l'immunité humorale liée aux lymphocytes B et à la production d'anticorps. La production des cytokines par l'une des cellules Th peut réguler le développement et l'activité de l'autre. L'inhibition des cellules Th1 par IL-10 et des cellules Th2 par IFN- γ permet d'entretenir un équilibre entre les deux réponses (Figure 1.2) (Kidd, 2003).

L. lactis ssp. *cremoris* KSV20 produit un EPS phosphorylé (PO_4^-) qui a induit la synthèse de IFN- γ et IL-1 chez les macrophages des souris (Kitazawa *et al.*, 1996). Dans une autre étude, l'EPS produit par *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073-RI, également phosphorylé (PO_4^-), a stimulé les lymphocytes B chez les souris (Kitazawa *et al.*, 1998). La stimulation de l'expression des gènes pour la production d'IL-10 et TNF- γ a été observée avec le dextrane (HoPS) de *L. mesenteroides*, lorsque celui-ci a été phosphorylé

chimiquement (Sato *et al.*, 2004).

L'induction de la production de TNF- α , IL-12, IL-10, et IL-6 par les macrophages de souris a été vérifiée chez *L. casei* Shirota mutant non producteur d'EPS. Le type sauvage est capable de produire des EPS de haute masse moléculaire, mais il y avait moins d'induction observée (Yasuda *et al.*, 2008). La suppression de la réponse immunitaire est détectée chez les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) humaines qui sont induites par l'EPS de *L. paraplantarum* BGCG11 en comparaison avec leur mutant EPS négatif. L'EPS de la souche BGCG11 est de haute masse moléculaire ($2,0 \times 10^6$ Da) et neutre. Cette souche était capable d'induire les cytokines pro-inflammatoires, lorsque les opérons EPS étaient mutés pour empêcher la production (Nikolic *et al.*, 2012).

La production de cytokines a été vérifiée avec les EPS purifiés provenant de dix souches de *Bifidobacterium* chez les PBMC humaines. Cette étude suggère que les EPS neutres et de haute masse moléculaire semblent supprimer la production des cytokines pro-inflammatoires et que les EPS acides ou de faible masse moléculaire semblent avoir des propriétés immunostimulantes (López *et al.*, 2012). La masse moléculaire et la charge des EPS semblent être des facteurs qui déterminent leur capacité d'immunomodulation. Malgré que les études sur ces propriétés des EPS l'aient vérifié, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de démontrer quels sont les principaux paramètres physico-chimiques qui influencent les propriétés immunostimulantes.

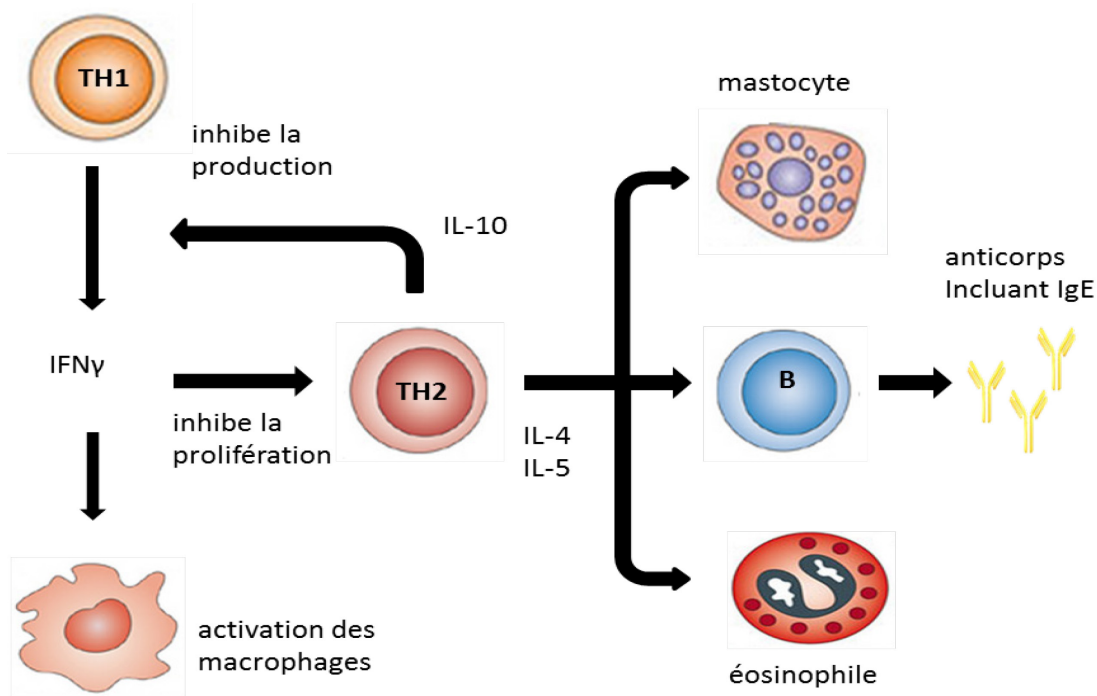


Figure 1.2 Hypothèse de l'équilibre Th1/Th2 (Modifié de Kidd, 2003).

Les cellules Th1 sécrètent la cytokine interféron gamma et activent les voies inflammatoires principalement par l'activation des macrophages. Les cellules Th2 sécrètent les cytokines interleukine-4 et -5 qui stimulent la formation d'anticorps par les lymphocytes B, les mastocytes, les éosinophiles et d'autres voies. Les cellules Th1 et Th2 peuvent s'inhiber l'une et l'autre (cross-inhibition).

2.2.2 Inhibition de l'adhésion de probiotiques aux mucus

Les effets bénéfiques sur la santé conférés par les probiotiques sont liés à la capacité d'adhésion aux mucus de la paroi intestinale, car ils stimulent la colonisation transitoire de l'hôte, l'exclusion de pathogènes et l'interaction avec les cellules de l'hôte pour l'amélioration de la barrière épithéliale et la modulation du système immunitaire. Il s'agit donc d'un critère important pour sélectionner les probiotiques (Dunne *et al.*, 2001; Servin, 2004). Les molécules impliquées dans l'adhésion ainsi que les mécanismes associés ne sont pas encore caractérisés parfaitement. Cependant, les chaînes de carbohydrates ou les glycoprotéines étaient proposées comme des molécules pouvant déterminer l'adhésion de *Bifidobacterium bifidum* et *L. reuteri* (Bibiloni *et al.*, 1999; Mukai *et al.*, 2004).

Chez *L. johnsonii*, la souche FI10386 (un mutant spontané) produit un peu plus d'EPS en quantité et montre un phénotype de colonie plus opaque que la souche parente FI9785 (Horn *et al.*, 2013). L'adhésion de la colonie FI10386 à la lignée cellulaire HT29 a notamment été réduite à moins de 20 % par rapport au type sauvage. Le temps de résidence dans l'intestin de la souche NCC533 diffère selon l'EPS. Son temps de résidence a été augmenté lorsque les opérons EPS sont délétées (Denou *et al.*, 2008).

L'effet des EPS sur l'adhésion a été étudié avec les EPS de *L. rhamnosus* GG, *B. longum* NB667 et *B. animalis* IPLA-R1 (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). Les fractions des EPS produits par les souches NB667 ou IPLA-R1 réduisent l'adhésion de ces mêmes souches aux mucus, malgré que la fraction EPS produite par GG n'ait pas d'effet. Par contre, les EPS produits par trois souches augmentent l'adhésion des bactéries pathogènes *Enterobacter sakazakii* et *Escherichia coli*. L'adhésion de *Salmonella* était stimulée en présence des fractions EPS de GG et de NB667 (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006).

Les EPS peuvent adhérer directement au mucus et inhiber compétitivement l'adhésion des probiotiques (Figure 1.3) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). Ils peuvent également bloquer l'adhésion des bactéries en s'attachant à leur surface. Les quelques composants de surface des pathogènes peuvent se lier aux EPS qui vont favoriser leur adhésion au mucus. La concentration et les propriétés des EPS dans l'intestin ne sont pas connues, mais ces données sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces polymères dans l'adhésion

des bactéries probiotiques et pathogènes. Par contre, d'autres études sont nécessaires afin de comprendre l'impact des caractéristiques des EPS comme la structure, la composition et la masse moléculaire sur l'adhésion afin de proposer un mécanisme d'action de ces polymères.

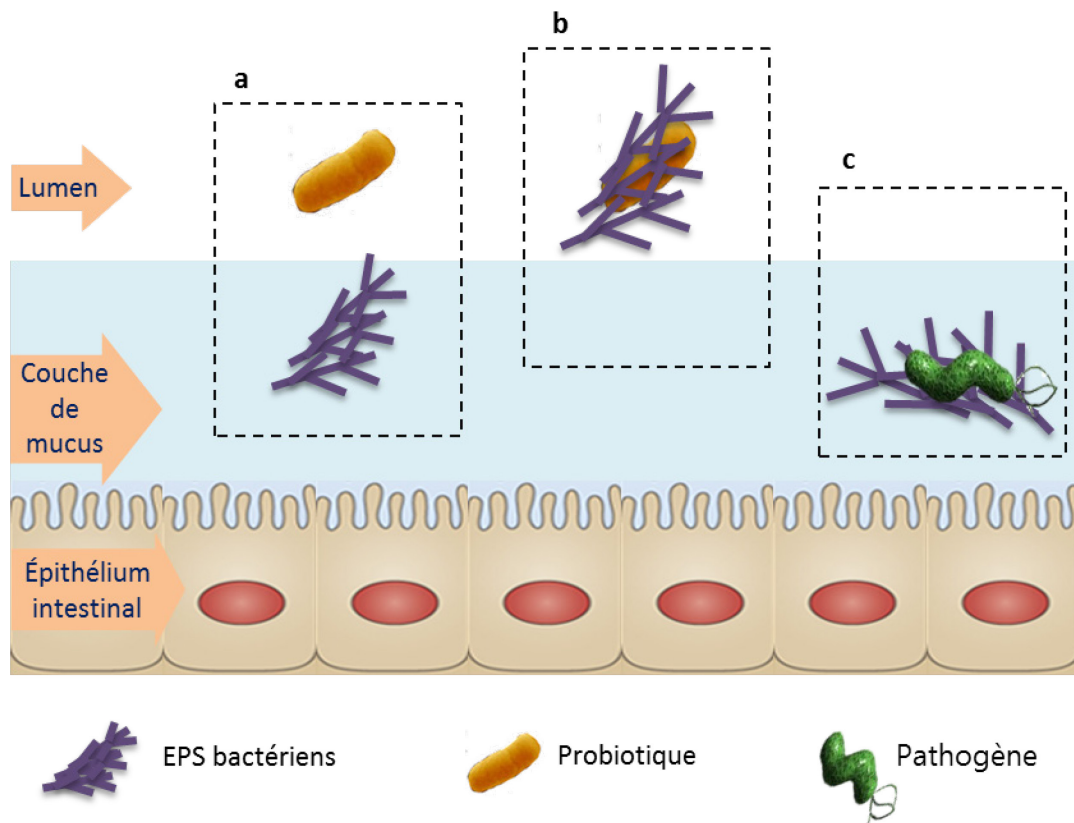


Figure 1.3 Trois impacts potentiels des EPS sur l'adhésion des probiotiques et des pathogènes au mucus intestinal (Modifié de Ruas-Madiedo *et al.*, 2006).

Diminution de l'adhérence de probiotiques: (a) les EPS pourraient directement adhérer au mucus et inhiber de manière compétitive l'adhésion de probiotiques ou (b) ils pourraient coller à la surface de probiotique et ainsi masquer les molécules bactériennes impliquées

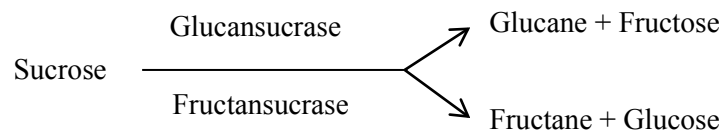
dans l'adhésion. Augmentation de l'adhésion des pathogènes: (c) les composantes de la surface des pathogènes pourraient se lier aux EPS et ces polymères liés pourraient adhérer aux mucus.

3. Biosynthèse des exopolysaccharides

3.1 Biosynthèse des homopolysaccharides

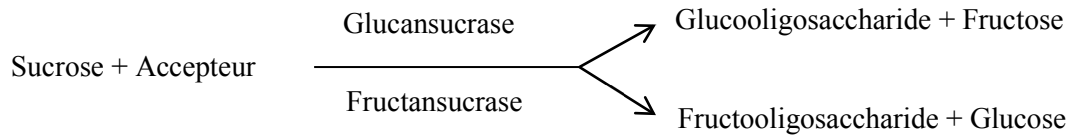
Les différents types d'EPS peuvent être distingués selon leur mécanisme de biosynthèse et les précurseurs exigés (Sutherland, 1993). La première classe comporte les homopolysaccharides extracellulaires. Les homopolysaccharides sont synthétisés généralement par deux mécanismes différents: par une glycosyltransférase extracellulaire ou par une synthétase membranaire. Pour le premier mécanisme, la réaction de polymérisation s'effectue par l'intermédiaire des glycosyltransférases extracellulaires, qui transfèrent un monosaccharide à partir d'un disaccharide à une chaîne croissante de polysaccharide. Puisque leur production est plutôt simple, elle est indépendante du métabolisme énergétique central et les variations de la structure sont limitées aux types de liaisons et les embranchements.

En fait, la plupart de ces homopolysaccharides sont synthétisés de la même manière, c'est-à-dire en utilisant des glycosucrases extracellulaires en tant que donneur glycosylique (de fructose ou de glucose) (Vuyst et Degeest, 1999). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des glucanes et des fructanes sont appelées les glycosyltransférases (GTF) et les fructosyltransférases (FTFs), respectivement (Korakli et Vogel, 2006). Les enzymes synthétisant le glucane sont aussi appelées les glucansucrases. Ces enzymes peuvent utiliser l'énergie du lien osidique du sucrose pour catalyser le transfert du sucre correspondant:



En plus de la synthèse de polymères ayant une masse moléculaire élevée, les glycosucrases, en présence de sucrose et d'une molécule acceptrice efficace (comme le maltose), catalysent généralement la production d'oligosaccharides de faible masse

moléculaire (Koepsell *et al.*, 1953).



Le deuxième mécanisme est régulé par la synthétase. Dans ces systèmes, il semble qu'une glycosyltransférase membranaire intégrée est en mesure de faciliter la polymérisation simultanément à la translocation à travers la membrane. La sécrétion de l'exopolysaccharide se produit en présence d'une molécule de transporteur lipidique (voir la section 3.2.4 pour plus de détails).

3.2 Biosynthèse des hétéropolysaccharides

La biosynthèse des EPS de type hétéropolysaccharide se déroule en quatre étapes : le transport de sucre dans le cytoplasme et la synthèse des sucres-1-phosphate, la synthèse des sucres nucléotidiques, l'assemblage de l'unité répétée et en dernier la polymérisation et l'exportation des EPS.

3.2.1 Transport des sucres et synthèse de sucres-1-phosphate

Le déplacement des mono- ou disaccharides vers le cytoplasme est un processus soigneusement régulé (Figure 1.4). Les trois différents systèmes de transport observés chez les bactéries lactiques sont : la translocation avec hydrolyse d'ATP par une ATPase, le système de transport symport et antiport et le transport avec phosphorylation via le système PEP-PTS (phosphoénolpyruvate – dependent phospho-transférase system) (De Vos et Vaughan, 1994). Le plus fréquemment rencontré est le système PEP-PTS. La bactérie *L. lacis* qui fermente le lactose possède un système PEP-PTS spécifique qui peut importer le lactose dans le cytoplasme en formant le lactose-6 phosphate (De Vuyst *et al.*, 2001;

Laws *et al.*, 2001). Les protéines régulatrices de la dégradation du lactose sont : la protéine phosphocarrier HPr, l'enzyme I et CcpA.

L'enzyme I, la protéine HPr (histidine-containing phosphocarrier) et l'enzyme complexe de perméase carbohydrate-spécifique sont trois protéines transporteuses du système PEP-PTS. Un complexe de la protéine Ccp (« catabolite control protéine ») et la protéine HPr de PTS sont des régulateurs importants de l'activation et de la répression du système PEP-PTS dans l'acquisition des éléments nutritifs. La protéine HPr a deux sites de phosphorylation : le résidu histidine (His-HPr) qui est phosphorylé par l'enzyme I et le résidu sérine (Ser-HPr) qui peut être phosphorylé par la kinase. La Ser-HPr phosphorylé peut contrôler l'expression des gènes responsable de la répression catabolique par interaction avec Ccp. Chez les lactobacilles, la présence d'un système de transport PEP-PTS pour plusieurs sucres, incluant le glucose, le lactose et le galactose a été déterminée (Chassy et Thompson, 1983a; Chassy et Thompson, 1983b). Chez *L. delbrueckii* et *S. thermophilus*, c'est le système d'antiport lactose-galactose qui est utilisé pour le transport (De Vos et Vaughan, 1994). La protéine LacS est un transporteur chez *S. thermophilus* et elle peut fonctionner soit dans le système symport lactose et soit dans l'antiport lactose-galactose.

Les sucres, une fois dans le cytoplasme, sont phosphorylés pour être utilisés : Les sucres-6-phosphates sont consommés dans la voie catabolique, alors que les sucres-1-phosphates participent à la formation des sucres nucléotidiques lors de la synthèse des polysaccharides. Le sucre-6-phosphate est transformé en sucre-1-phosphate par l'enzyme phosphoglucomutase (PGM). L' α -PGM peut transformer le glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate qui peut ensuite être converti en sucres nucléotidiques (Ramos *et al.*, 2001).

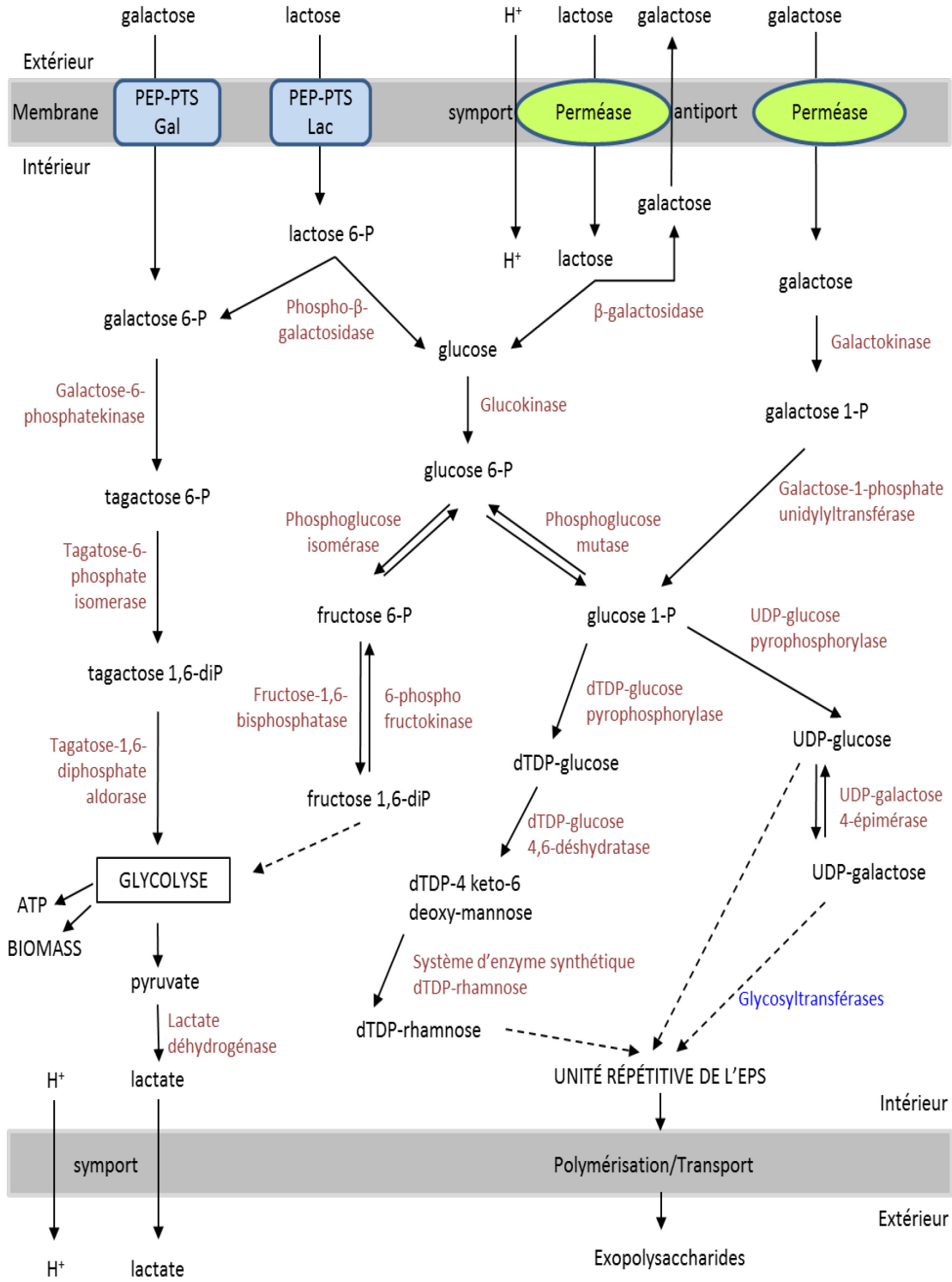


Figure 1.4 Représentation schématique du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques (Modifié de De Vuyst *et al.*, 2001).

3.2.2 Synthèse des sucres nucléotidiques

Les sucres nucléotidiques comme l'UDP-glucose, l'UDP-galactose ou le dTDP-rhamnose sont requis pour la construction des HePS. Ils sont formés dans le métabolisme des glucides qui commence avec le transport des sucres. Le glucose-1-phosphate est un précurseur important pour la synthèse des sucres nucléotidiques et il est converti en UDP-glucose par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (GalU). L'UDP-glucose est converti ensuite en UDP-galactose ou UDP-acide glucuronique par l'UDP-glucose épimérase (GalE) ou le glucose déshydrogénase (Ugd), respectivement (Degeest et De Vuyst, 2000; Boels *et al.*, 2001).

Le dTDP-rhamnose est synthétisé à partir du glucose-1-phosphate. Le glucose-1-phosphate est converti en dTDP-glucose par dTDP-glucose pyrophosphorylase (RfbA) et après le dTDP-glucose-4,6 déshydratase (RfbB), le dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3,5 épimérase (RfbC) et le dTDP-4-keto-L-rhamnose réductase (RfbD) participent pour la synthèse du rhamnose nucléotidique (Ramos *et al.*, 2001).

3.2.3 Assemblage de l'unité répétée

L'assemblage de l'unité répétée est catalysé par les glycosyltransférases qui assurent l'ajout séquentiel des sucres activés à partir des molécules donneuses vers le transporteur membranaire undécaprényl phosphate. Les glycosyltransférases primaires qui lient le premier sucre au transporteur lipidique sont hautement homologues dans les bactéries à Gram positif (Campbell *et al.*, 1997). La fonction des glycosyltransférases de quelques souches de bactéries lactiques est vérifiée par l'expression d'hétérologues et d'homologues (Stingele *et al.*, 1999; Van Kranenburg *et al.*, 1999b).

Par exemple, chez *S. thermophilus* Sfi6, l'activité de quatre glycosyltransférases, EpsE, EpsG, EpsF et EpsI a été étudiée. EpsE montre une activité de phospho glycosyltransférase qui transfère le galactose sur le support lipophile et après EpsG transfère le α -1,3-N-acétylgalactosamine sur le première β -galactoside. EpsF et EpsI montrent les activités de galactosyltransférase et β -1,3-glycosyltransférase, respectivement (Stingele *et al.*, 1999). Un mécanisme d'assemblage chez *L. rhmanosus* GG a été proposé sans que les

glycosyltransférases aient été caractérisées du point de vue biochimie (Lebeer *et al.*, 2009). Le galactopyranose est le premier sucre attaché au transporteur lipidique phosphorylé ancré à la membrane et ensuite un deuxième sucre, le rhamnose, est lié par une liaison osidique α (Figure 1.5). Les glycosyltransférases WelE et WelF assurent la formation de ces liaisons. La N-acetylglucosamine est liée ensuite par une liaison α -1,3 par la WelG et les galactofuranoses ajoutés par la WelH constituent les branches. L'ajout d'un galactopyranose et d'un galactofuranose par WelI et la WelJ complètent l'unité répétée.

3.2.4 Polymérisation et exportation

Les sous-unités répétées sont transportées à travers la membrane avant la polymérisation, où plusieurs unités répétées sont liées ensemble. Après exportation, le polymère est libéré ou reste attaché à l'enveloppe de la cellule, comme une capsule. La polymérisation et le transport peuvent influencer la composition, la grandeur et la quantité des EPS (De Vuyst *et al.*, 2001; Laws *et al.*, 2001).

Les trois voies de polymérisation appelées Wzy dépendante, synthase dépendante et transporteur ABC dépendante étaient proposées (Whitfield, 2006). Les deux premières voies de biosynthèse sont nommées en fonction de la polymérase impliquée, alors que la dernière est nommée en fonction du mécanisme d'exportation des polysaccharides à la surface des cellules, car l'assemblage est effectué en continu pendant l'exportation. Bien que les trois mécanismes soient présents chez les bactéries à Gram négatif, les mécanismes Wzy et synthase dépendants sont surtout décrits chez les bactéries à Gram positif. Selon la présence d'un gène codant pour une polymérase de type Wzy, le mécanisme de biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques serait classé comme Wzy-dépendant.

Les polymères Wzy dépendants ont généralement des sucres et des liaisons glucosidiques multiples. Wzy, une protéine membranaire est la polymérase putative, nécessaire à la polymérisation des unités répétitives liées à und-PP (undecaprenyl diphosphate) dans la synthèse Wzy-dépendante (Figure 1.6 A). Cette polymérisation se produit du côté interne de la membrane cytoplasmique et par conséquent, la voie d'assemblage reste tributaire de l'exportation d'unités répétées liées aux lipides, à travers la membrane intérieure, par Wzx

(Whitfield, 2006; Yother, 2011).

Le mécanisme synthase dépendante se distingue du mécanisme Wzy dépendant car une seule enzyme qui est responsable de l'initiation, de la polymérisation et du transport du polymère en croissance (Figure 1.6 B). Par rapport aux polysaccharides synthétisés par le mécanisme Wzy dépendant, leurs polymères ont des structures relativement simples avec seulement un ou deux sucres répétés. Dans ce cas, les sucres sont ajoutés directement à la chaîne en croissance en continu pendant qu'elle est assemblée et transportée à travers la membrane cytoplasmique.

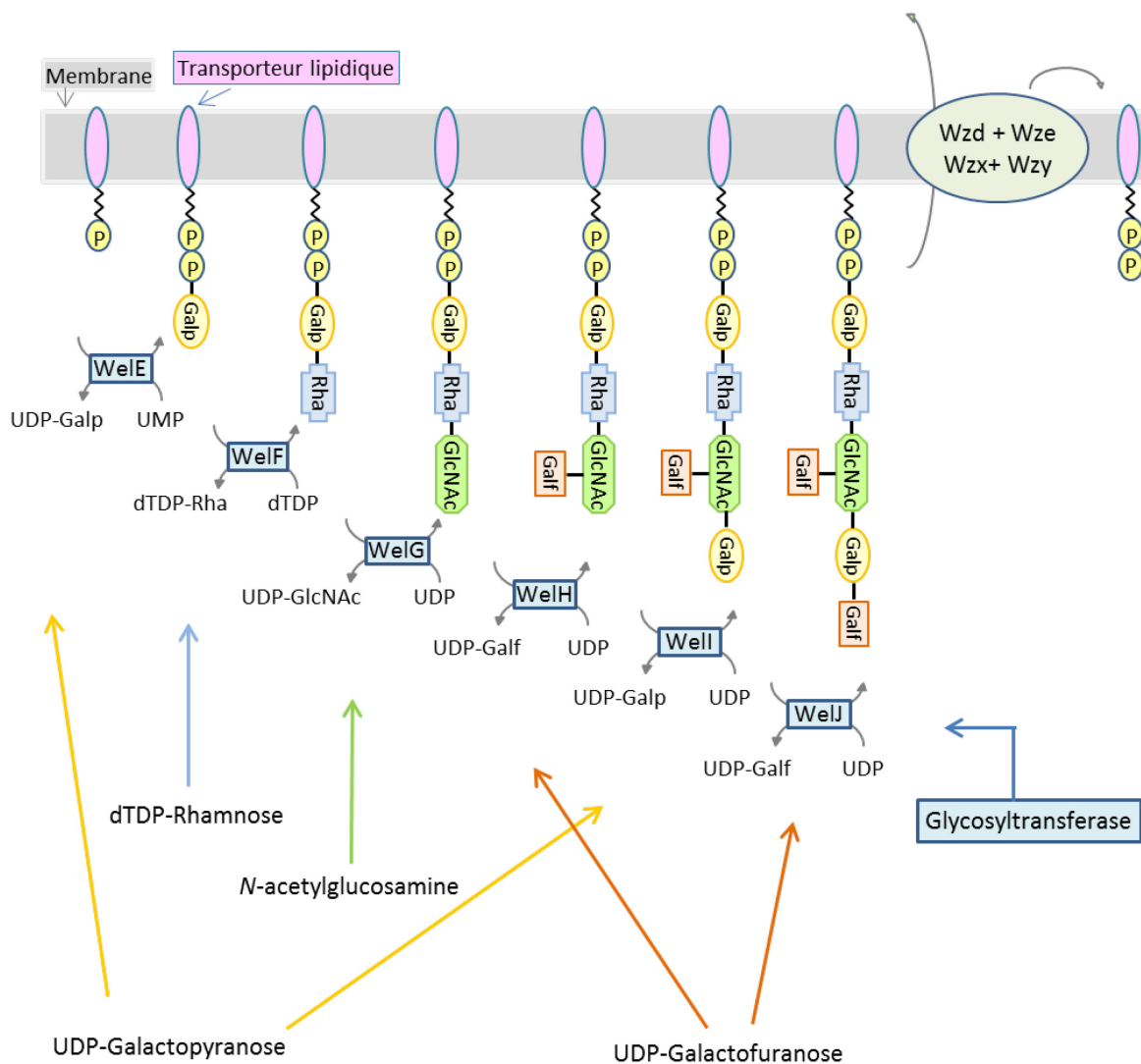


Figure 1.5 Modèle suggéré de la biosynthèse de l'EPS chez *L. rhamnosus* GG (Modifié de Lebeer *et al.*, 2009).

L'UDP-galactopyranose (UDP-Galp) est lié par la WelE à un transporteur lipidique. Un rhamnose de dTDP-rhamnose (dTDP-Rha) est ajouté à l'unité répétée naissante par la WelF. La WelG ajoute un *N*-acetylglucosamine d'UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). Un galactofuranose d'UDP-galactofuranose (UDP-Galf) est ajouté par la WelH. L'unité répétée est complétée par l'ajout d'un galactopyranose d'UDP-Galp et d'un galactofuranose d'UDP-Galf. La Well et la WelJ sont proposées pour accomplir ces étapes. La translocation de la sous-unité à l'extérieur de la membrane serait réalisée par l'activité de Wzx. La polymérisation serait réalisée par Wzy, avec Wzd et Wze qui détermineraient la longueur de la chaîne. Le transporteur lipidique est transloqué à l'intérieur de la membrane et déphosphorylé.

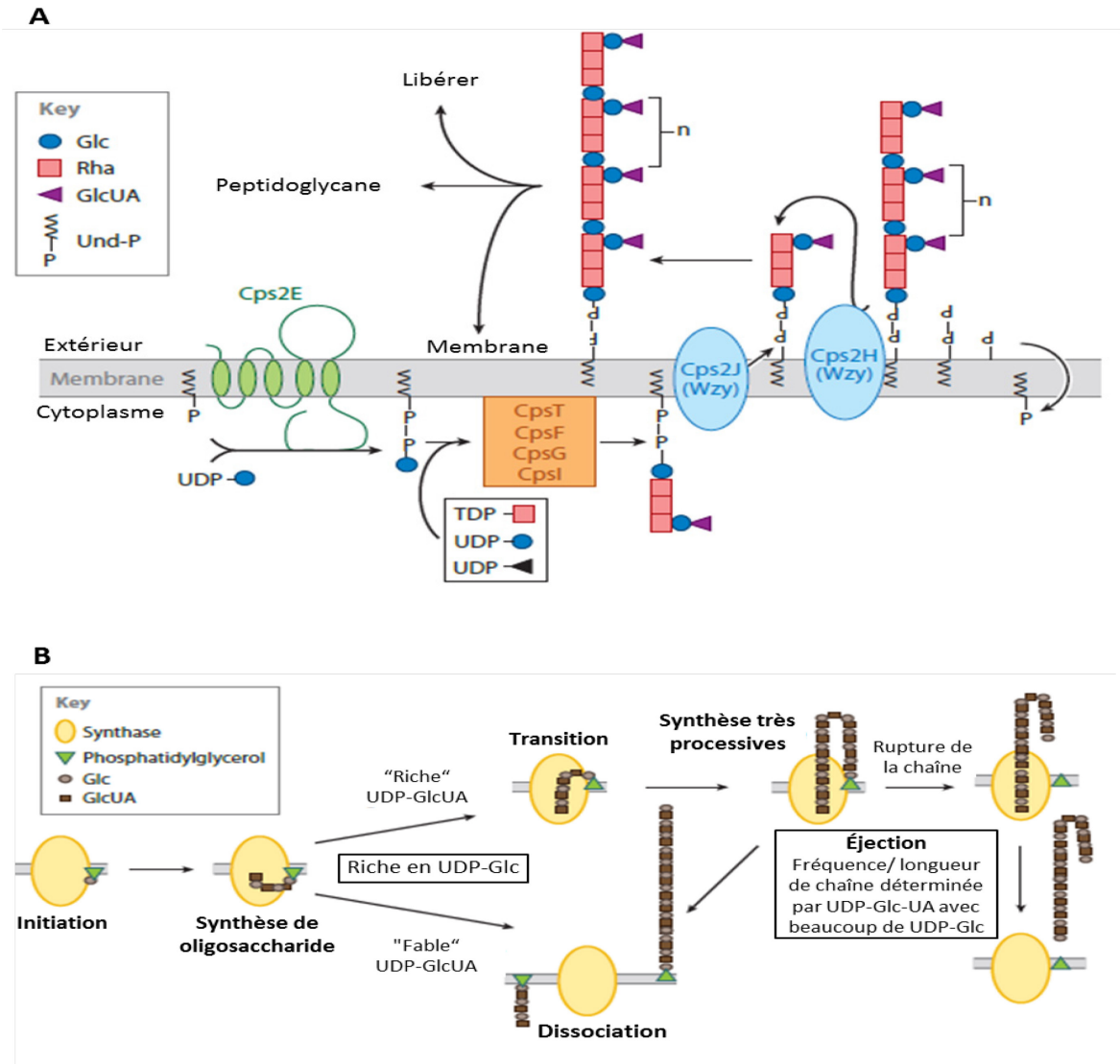


Figure 1.6 Voies de synthèse des CPS pour chez *Streptococcus pneumoniae* sérotype 3 (Traduit de Yother, 2011).

A) Les étapes de la voie de biosynthèse Wzy dépendante : CpsT, CpsF, CpsG, et CpsI agissent de manière séquentielle pour construire l'unité répétée, bien que leurs fonctions spécifiques, et donc l'ordre d'action, n'aient pas été démontrées. Une activité glycosyltransférase supplémentaire est nécessaire et peut être apportée par l'une de ces enzymes. **B)** Les étapes de la voie de biosynthèse synthase dépendante : Les réactions se déroulent en présence d'une grande concentration d'UDP-Glc. L'UDP-Glc est dérivé à partir de pools cellulaires; la synthèse d'UDP-GlcUA est catalysée par une déshydrogénase de l'UDP-Glc (Cps3D) codée par le locus de la biosynthèse de la capsule. La rupture de la chaîne est proposée pour être enzymatique et peut survenir entre les sucres ou à la liaison phosphatidylglycerol.

4. Organisation moléculaire des gènes *eps* chez les bactéries lactiques

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques sont situés sur des plasmides ou sur le chromosome (Van Kranenburg *et al.*, 1999a). Pour les bactéries thermophiles du yogourt, la production d'EPS s'est avérée être codée par des gènes situés sur le chromosome (Almirón-Roig *et al.*, 2000; Lamothe *et al.*, 2002). Bien qu'il existe une grande variabilité entre les EPS produits par des espèces phylogéniquement proches, l'organisation des gènes *eps* et *cps* semble conservée.

Les opérons de biosynthèse des EPS semblent inclure les gènes de régulation, de détermination de longueur chaîne, de la biosynthèse des unités répétées, de la polymérisation et de l'exportation (Figure 1.7).

La protéine EpsA de *S. thermophilus* Sfi6 est un homologue de la protéine régulatrice LytR chez *Bacillus subtilis* et le gène régulateur est conservé chez les bactéries lactiques. Les gènes *epsA* et *cpsA* sont au début de plusieurs opérons. Les protéines codées par ces gènes contiennent les trois régions membranaires en N-terminal.

Les gènes de la région 5' des opérons sont bien conservés chez les bactéries lactiques et sont comparables aux opérons de la synthèse du CPS chez *S. pneumoniae* (Jolly et Stinglee, 2001). Les protéines codées par le troisième et le quatrième gène, comme *epsC* et *epsD*, *cpsC* et *cpsD*, ou *epsB* et *epsC*, agissent ensemble pour déterminer la longueur de la chaîne. Ces couples de protéines sont similaires à la protéine Wzc décrite chez *E. coli* (Grangeasse *et al.*, 2003). EpsA de *L. lactis* NIZO B40, EpsC de *S. thermophilus* Sfi39, CpsC de *S. thermophilus* NCFB 2393 et EpsB de *L. delbrueckii* sont similaires (identité 21-61 %) avec CpsC (co-polymerase) de *S. pneumoniae*. EpsD (*S. thermophilus* Sfi39), CpsD (*S. thermophilus* NCFB 2393), EpsC (*L. delbrueckii*) et EpsB (*L. lactis* NIZO B40) ont des motifs de liaison ATP comme ceux présent dans CpsD (une kinase) de *S. pneumoniae*. La phosphorylation de la région riche en tyrosine de CpsD contrôle la production CPS chez *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2000a). Toutefois, cette région n'est pas présente dans tous les homologues, (ex. EpsC de *L. delbrueckii*), donc la production ne peut pas toujours être contrôlée par la phosphorylation (Jolly et Stinglee, 2001).

La région centrale (mais plus de la région 3') est également prévue pour la polymérisation et l'exportation de l'EPS. Ces processus sont mal connus chez les bactéries à Gram positif, bien que plusieurs systèmes aient été étudiés chez les bactéries à Gram négatif, tel que la protéine Wzy qui est connue pour être la polymérase de l'antigène O (LPS) chez *E. coli*. Les protéines EpsI (*L. lactis* NIZO B40) et EpsJ (*S. thermophilus* Sfi6) possèdent une fonction similaire avec celle de Wzy. EpsK (*L. lactis* NIZO B40), EpsM (*S. thermophilus* Sfi6) et EpsN (*L. delbrueckii*) sont les homologues de Wzx (RfbX) qui est considéré comme le transporteur flippase qui transfère les sous-unités de l'antigène O à travers la membrane interne chez *E. coli* (Kranenburg *et al.*, 1997; Whitfield et Roberts, 1999; Jolly et Stinglele, 2001).

La biosynthèse de l'EPS fait intervenir l'activité séquentielle des glycosyltransférases lors de la formation des unités répétées (Figure 1.8). Les glycosyltransférases chez les bactéries lactiques sont situés dans la région centrale de l'opéron EPS. La phosphoglycosyltransférase contrôle la réaction initiale de la biosynthèse d'EPS chez les bactéries. Le mécanisme de la régulation de la phospho-glycosyltransférase n'est pas connu, mais une étude a démontré que la kinase (EpsD) et la co-polymérase (EpsC) sont requises pour l'activité de la phospho-glycosyltransférase (EpsE) chez *S. thermophilus* (Minic *et al.*, 2007). Cette étude propose que le complexe EpsC et EpsD active EpsE par la phosphorylation, ce qui initie la biosynthèse d'unité répétée.

Il y a des différences d'organisation des gènes chez *L. rhamnosus* GG en comparaison avec les autres présentés. Les gènes, co-polymérase (*wzd*) et kinase (*wze*) sont à la région 5' des opérons et le régulateur (*wzr*) et la phosphatase (*wzb*) sont à la région 3', malgré qu'ils soient tous à la région 5' chez les autres. Les gènes pour la polymérisation et l'exportation sont à la région centrale, mais plus près de la région 5', en différence avec les autres. En plus, les glycosyltransférases sont situées dans la région centrale de l'opéron EPS. Par contre, les gènes (*rmlA-C*) pour la synthèse de rhamnose nucléotidique (dTDP-rhamnose) sont présentés dans les opérons d'EPS.

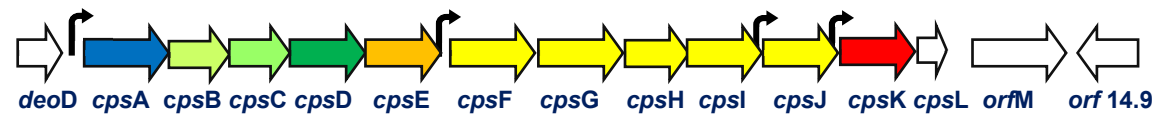
Streptococcus thermophilus Sfi6 (Stingele *et al.*, 1996)



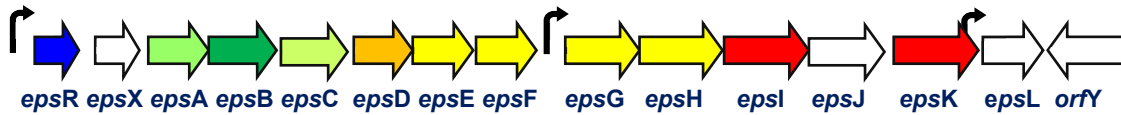
Streptococcus thermophilus Sfi39 (Germond *et al.*, 2001)



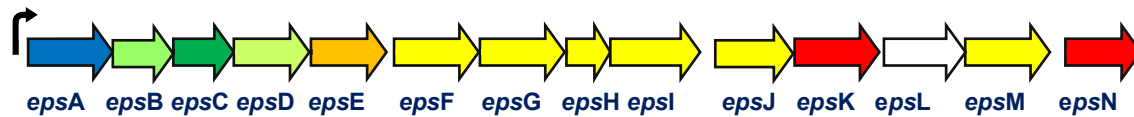
Streptococcus thermophilus NCFB 2393 (Almirón-Roig *et al.*, 2000)



Lactococcus lactis ssp. *cremoris* NIZO B40 (Kranenburg *et al.*, 1997)



Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* Lfi5 (Lamothe *et al.*, 2002)



Lactobacillus rhamnosus GG (Lebeer *et al.*, 2009)

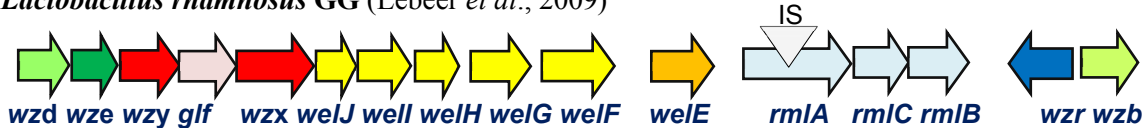
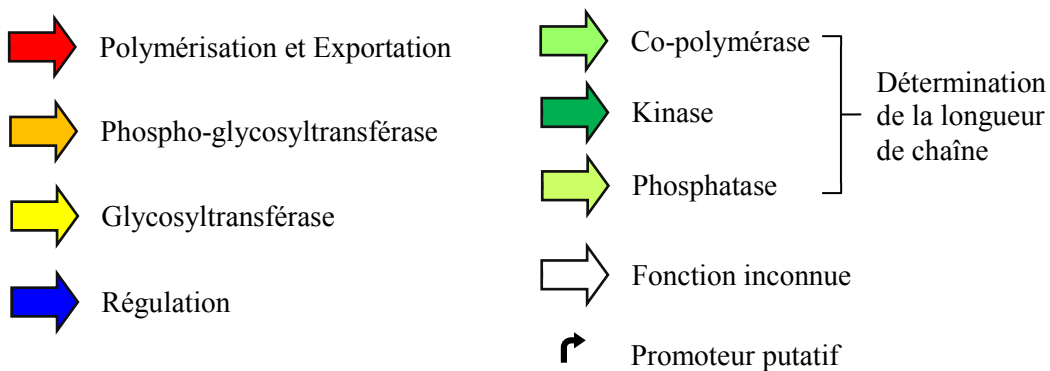
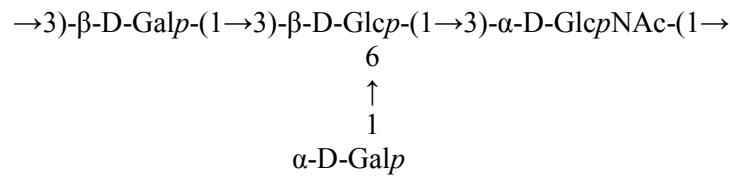


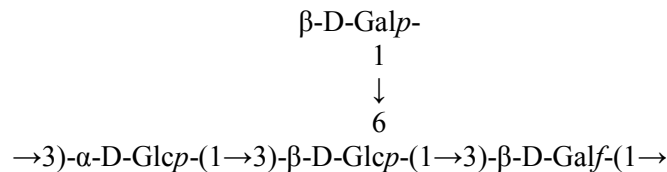
Figure 1.7 Représentation de l'organisation génétique des opérons *eps* de plusieurs souches de LAB.



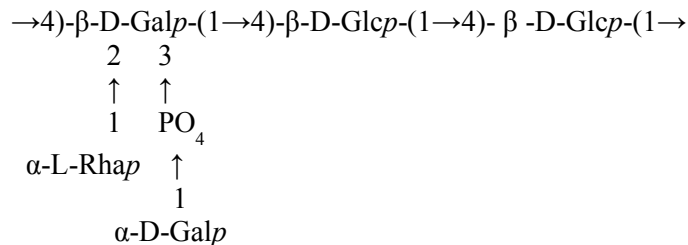
Streptococcus thermophilus Sfi6 (Stingele *et al.*, 1996)



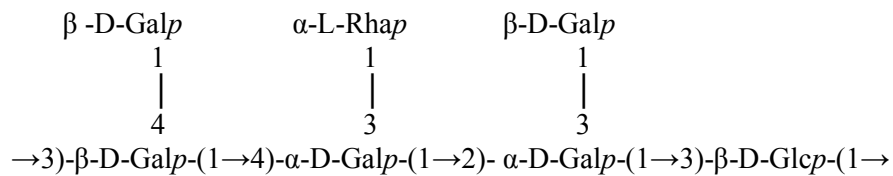
Streptococcus thermophilus Sfi39 (Lemoine *et al.*, 2001)



***Lactococcus lactis ssp. cremoris* NIZO B40** (Kranenburg *et al.*, 1997)



***Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Lfi5** (Lamothe *et al.*, 2002)



***Lactobacillus rhamnosus* GG** (Landersjö *et al.*, 2002)

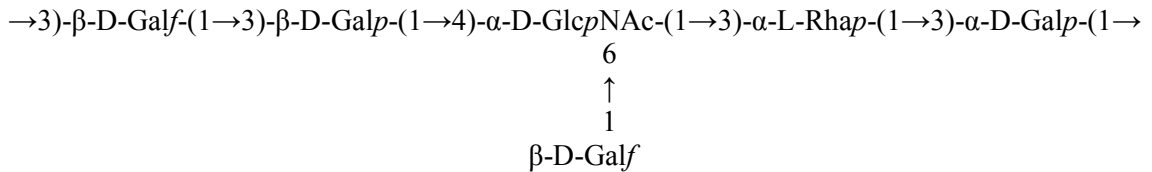


Figure 1.8 Les structures des unités répétées des EPS de souches de LAB.

Glc, glucose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; GlcNAc, N-acétyl-glucosamine
p, une configuration en anneau de pyranose; *f*, une configuration en anneau de furanose

5. Polymérisation et Co-polymérase

5.1 Les connaissances du mécanisme de polymérisation

Les protéines proposées pour être impliquées dans le contrôle de la longueur de chaînes des polymères EPS sont: une protéine tyrosine phosphatase (PTP), une tyrosine kinase (PTK) et une co-polymérase (PCP) (De Vuyst *et al.*, 2001). Chez *S. thermophilus*, les quatre premiers gènes (*epsA-D*) de la région 5' des opérons EPS sont conservés et semblent contribuer à la régulation (*epsA* et *epsB*), à la polymérisation (*epsC*) et à la translocation à travers la membrane (*epsD*) (Jolly et Stingele, 2001).

Les études fonctionnelles chez *S. pneumoniae* ont montré que la polymérisation des CPS est régulée par des événements de phosphorylations réversibles de la tyrosine dans le complexe de polymérisation (Figure 1.9). Un complexe stable, composé des protéines CpsB, CpsC, CpsD et l'ATP, est proposé pour effectuer le contrôle de la polymérisation extracellulaire de la capsule (Campbell *et al.*, 1997; Stingele *et al.*, 1999; Morona *et al.*, 2000a; Bender et Yother, 2001). De plus, cette phosphorylation réversible pourrait contrôler l'attachement des polysaccharides pour la formation de la capsule. Dans ce modèle, l'auto- et la transphosphorylation de la tyrosine kinase CpsD (PTK) nécessite la présence de la co-polymérase, une protéine accessoire transmembranaire CpsC. La déphosphorylation est réalisée par la phosphatase CpsB, qui peut également inhiber la phosphorylation de CpsD (Bender et Yother, 2001). Aucune capsule n'est produite lorsque les gènes *cps2C* et *cps2D* sont supprimés chez *S. pneumoniae*. Morona *et al* (2000) ont montré que l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine de CpsD réduit l'activité et régule ainsi négativement la production de la capsule. Ceci contribue à réduire l'encapsulation chez la souche de *S. pneumoniae* Rx1-19F. En revanche, la phosphorylation de la tyrosine est positivement corrélée avec la production de la capsule chez la souche *S. pneumoniae* D39 (Bender *et al.*, 2003). Une autre étude a montré que la phosphorylation de CpsD a conduit à réduire le taux global de biosynthèse de CPS et à augmenter l'attachement de CPS à la paroi cellulaire chez la souche *S. pneumoniae* D39 (Morona *et al.*, 2006).

Chez *L. lactis*, les EPS n'ont pas été produits lorsque les protéines EpsA (co-polymérase) et EpsB (kinase) étaient mutées. Par contre, la mutation de phosphatase (EpsC) n'était pas

essentielle pour la production (Groot et Kleerebezem, 2007). Un système similaire a été identifié chez *S. thermophilus*. La production d'EPS est inhibée lorsque les gènes *epsC* et *epsD* sont supprimés (Minic *et al.*, 2007). EpsC (Co-polymérase) est nécessaire pour la phosphorylation d'EpsD (kinase) et les deux protéines sont essentielles pour l'activité d'EpsE (glycosyltransférase primaire), permettant ainsi la biosynthèse des unités répétées des EPS. Chez *L. johnsonii*, la tyrosine kinase putative, EpsC, est proposée comme facteur expliquant les différences quantités d'EPS entre les souches FI9785 et FI10386 (un mutant spontané de FI9785) (Horn *et al.*, 2013). Une acide aminée dans la kinase diffère entre deux souches FI9785 (EpsC) et FI10386 (EpsC^{D88N}). Pour le mutant, il y a un peu plus de production d'EPS en quantité et le phénotype de la colonie est plus opaque.

D'une façon analogue, chez *Bacillus subtilis*, la kinase (YwqD) nécessite également la présence de la protéine modulatrice TkmA (YwqC) pour la phosphorylation de Ugd (YwqF; UDP-glucose déshydrogénase), qui devient active (Mijakovic *et al.*, 2003; Mijakovic *et al.*, 2005). Ainsi, il reste des ambiguïtés dans notre compréhension de la fonction du complexe de polymérisation, le rôle précis de chaque protéine n'est pas encore bien compris, et semble en fait varier selon les souches et les espèces.

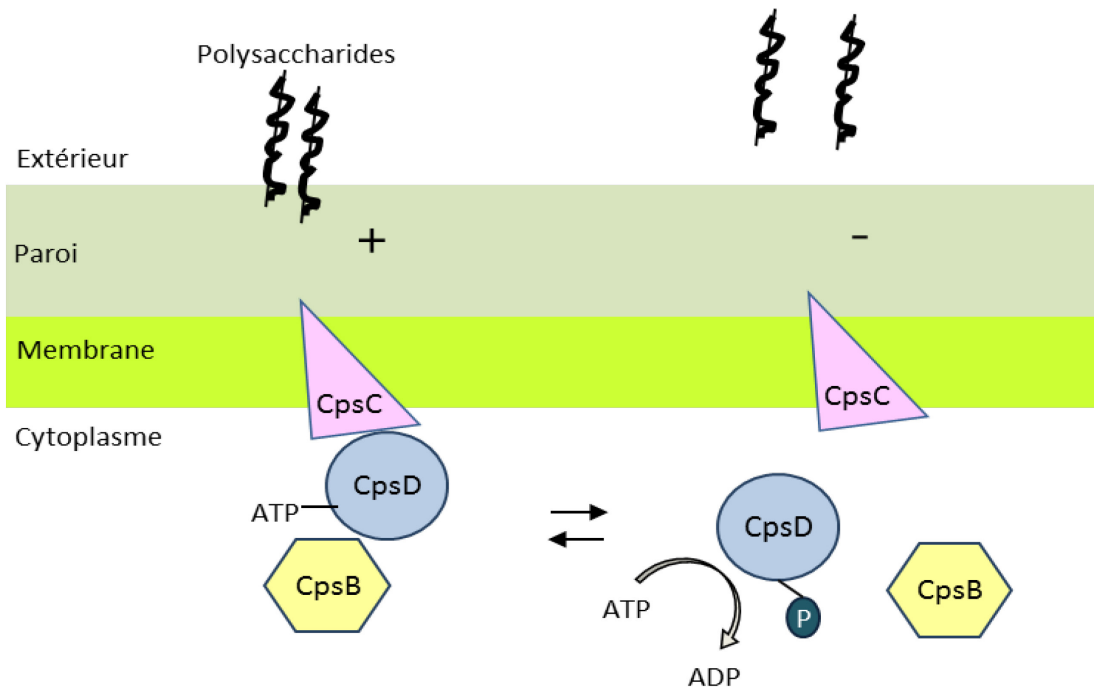


Figure 1.9 Modèle proposé pour le contrôle de la polymérisation des CPS à la surface cellulaire chez *S. pneumoniae* Rx1-19F.

L'autophosphorylation de CpsD conduirait à la dissociation le complexe CpsC-CpsD, ce qui amènerait à réduire la polymérisation des CPS à la surface cellulaire. La déphosphorylation de CpsD est réalisée par CpsB et permet un retour vers le complexe protéique CpsC/CpsD, induisant la polymerisation des CPS (Morona *et al.*, 2000a).

5.2 La co-polymérase

La protéine co-polymérase (PCP) participe à la détermination de la longueur de la chaîne dans la biosynthèse des lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries à Gram négatif (Figure 1.10). Certains LPS à longue chaîne sont formés de façon Wzy dépendante, avec la participation d'un représentant du PCP (surtout PCP1) chez ces bactéries. Pour la distribution de longueur de la chaîne, la distribution modale fait état d'un modèle commun. Dans ce modèle, l'intensité de la bande diminue par l'augmentation de nombre d'unités (Bastin *et al.*, 1993). Les LPS posséderaient donc des bandes discrètes, tandis que les EPS posséderaient une distribution continue.

Les LPS de la plupart des souches d'*E. coli* ont une longueur de chaîne O-antigène de base de 10 à 18 unités. Il existe des variations considérables de la longueur de chaîne pour des mêmes LPS (Franco *et al.*, 1998). *Shigella flexneri* 2a possède deux gènes *wzz* (PCP); *wzz_{SF}* codé sur le chromosome et confère une courte longueur de chaîne modale (11-17 unités), alors que *wzz_{pHS-2}* est codé sur un plasmide (pHS-2 : 3 kb) et détermine une longueur de chaîne modale très longue (90 - 100 unités) (Stevenson *et al.*, 1995).

La plupart des PCP possèdent deux régions transmembranaires (TM1 et TM2) du côté N-terminal et C-terminal, respectivement et une région hydrophobe qui est située entre TM1 et TM2 (Morona *et al.*, 2002; Tocilj *et al.*, 2008; Morona *et al.*, 2009). Beaucoup de PCP ont des régions « coiled-coil » qui présentent une corrélation avec le degré de polymérisation ou de détermination de la longueur de chaîne (Morona *et al.*, 2000b; Purins *et al.*, 2008). La probabilité de formation des régions « coiled-coil » et la localisation et le nombre de ces régions corréleront avec la longueur de la chaîne des polysaccharides étant synthétisés. La présence en grand nombre de ces régions potentielles est fortement corrélée avec la présence de plus longues chaînes modales (Stevenson *et al.*, 1995; Morona *et al.*, 2000b). Les PCP sont classées en fonction des caractéristiques, y compris les profils de prédiction coiled-coil, la taille, le type de polysaccharides synthétisés et la similarité de séquence (Cuthbertson *et al.*, 2009; Morona *et al.*, 2009).

Les trois classes des PCP sont PCP1, PCP2 et PCP3 (Figure 1.11) (Tocilj *et al.*, 2008; Morona *et al.*, 2009). Les protéines PCP1 sont associées à la régulation de l'antigène O LPS

ou la biosynthèse de l'ECA (« enterobacterial common antigen »). Les protéines PCP2 participent à la synthèse des polysaccharides de haute masse moléculaire comme les CPS et les EPS. Les deux protéines PCP1 et PCP2 sont associées avec la voie de synthèse Wzy dépendante, alors que les protéines PCP3 participent à la biosynthèse des CPS via la polymérisation par les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Les PCP2 sont catégorisées en PCP2a (protéine de Gram négatif) et PCP2b (protéine de Gram positif) : PCP2a possède un domaine de liaison au C-terminal avec la tyrosine kinase (PTK) et une région entre TM1 et TM2 qui est plus hydrophobe que la région analogue chez les protéines PCP1, tandis que les PCP2b sont moins hydrophobes. Dans le groupe des protéines PCP1, on trouve Wzz (*S. flexneri* et *E. coli*), et FepE (*E. coli* K-12). La co-polymérase (CpsC) et la kinase (CpsD) de la synthèse des EPS chez *S. salivarius* sont groupées dans PCP2. En plus, Cps19C (la co-polymérase) et Cps19D (la kinase) de la synthèse de CPS19A chez *S. pneumoniae* sont groupées dans PCP2b (Morona *et al.*, 2009).

La relation entre structure et fonction chez Wzz a été abordée dans plusieurs études. Chez *E. coli*, la variation de la longueur de la chaîne d'antigène O est le résultat d'une variation de séquence d'acides aminés de la protéine Wzz (Franco *et al.*, 1998). La structure de Wzz a été déterminée (Figure 1.12). Les protomères de protéine sont associés en oligomères en forme de cloche ou de dé avec le même schéma général d'interactions côte à côte, en formant une cavité interne. Suite à la détermination de la structure de Wzz, un nouveau modèle de mécanisme de polymérisation dans la voie Wzy dépendante est proposé. Les oligomères de Wzz agissent comme des molécules d'échafaudage pour la polymérase Wzy.

Dans ce cas, la polymérisation d'oligosaccharide (LPS : l'antigène O) se produit par un transfert de la chaîne en croissance d'une molécule de Wzy à une molécule adjacente de Wzy, au lieu d'être synthétisée par une molécule unique Wzy (Tocij *et al.*, 2008; Morona *et al.*, 2009). Deux fonctions des PCP sont proposées par Wzz: organiser et interagir avec Wzy, et aider à déterminer la longueur appropriée de l'antigène O pour terminer la polymérisation et exporter les chaînes (Daniels *et al.*, 2002). Plus d'études sont nécessaires pour comprendre ces fonctions proposées. Chez les bactéries à Gram positif, la co-polymérase et la kinase sont deux protéines distinctes, alors que chez les bactéries à Gram négatif, ces deux protéines sont réunies en une seule protéine.

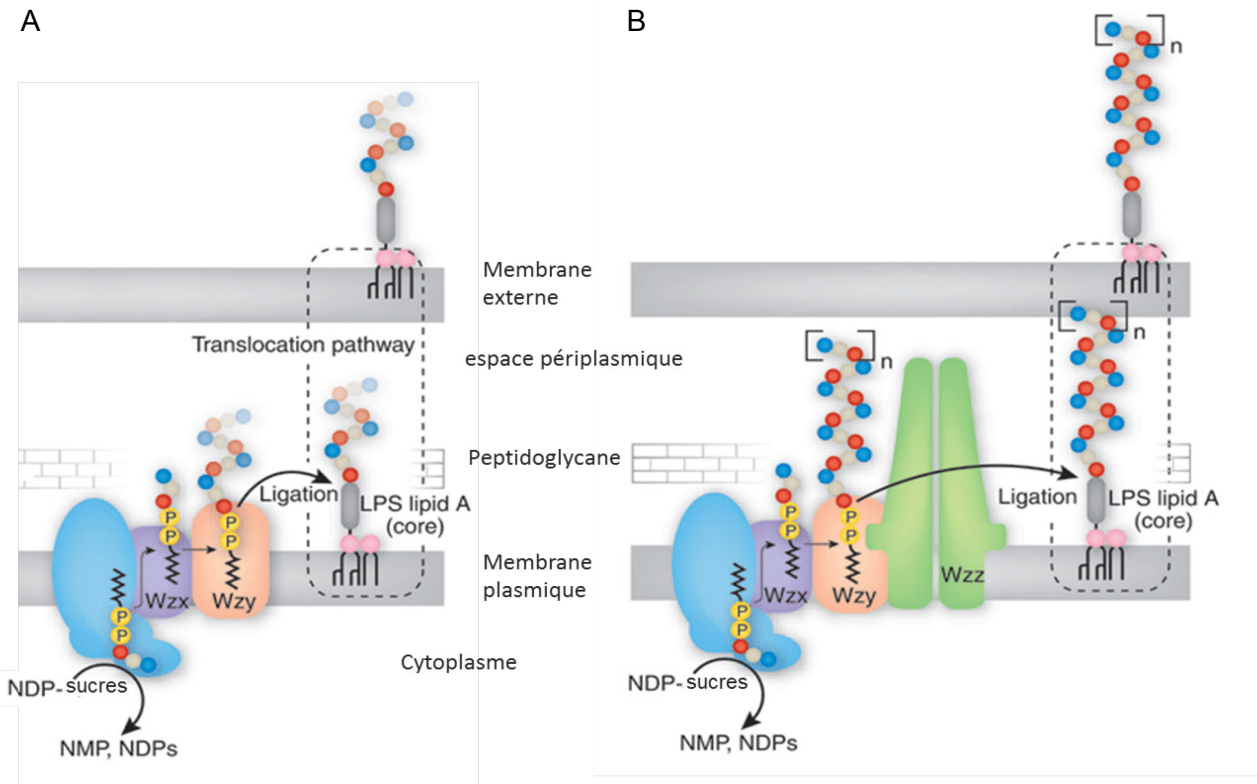


Figure 1.10 Modèle suggéré de la biosynthèse du LPS (Traduit de Whitfield, 2008).

Les glycosyltransférases complètent l'unité répétée qui est liée à l'undécaprényl di-phosphate. Cette unité répétée est exportée à travers la membrane cytoplasmique par des opérations impliquant une flippase putative (Wzx : une protéine intégrale à la membrane). La polymérisation se fait par l'addition progressive de l'unité répétée naissante à la terminaison de chaîne d'unité répétée. La Wzy est une protéine dédiée à l'étape de polymérisation. Cette étape est terminée par la ligation des oligo-saccharides au lipide A core et ce polymère est transloqué à la surface cellulaire.

A) En l'absence de la co-polymérase: la probabilité d'extension de chaîne à médiation Wzy diminue avec chaque unité répétée supplémentaire. B) En présence de la co-polymérase (Wzz) : le système n'est plus simplement stochastique. Il favorise l'allongement de chaîne pour atteindre une longueur de chaîne modale caractéristique avant la ligation.

NMP, nucléoside monophosphate ; NPD, nucléoside diphosphate

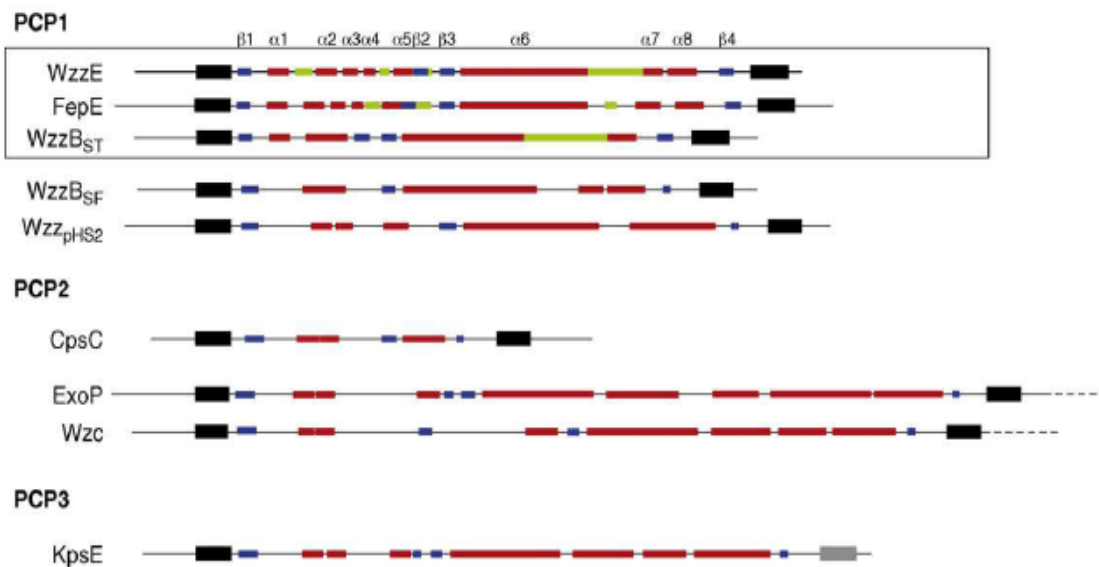


Figure 1.11 La structure secondaire des protéines PCP (Tiré de Morona *et al.*, 2009).

La structure secondaire est illustrée par des couleurs : longueur de protéines, ligne noire; TM, rectangle noir; région TM-associé dans KpsE, rectangle gris; feuillet β , bleu; hélices α , rouges; les régions avec les structures non déterminées, vert. Toutes les protéines sont présentées dans leur intégralité à l'exception de ExoP et Wzc, où seul le domaine N-terminal périplasmique est affiché. Le domaine tyrosine kinase C-terminal est indiqué par une ligne en pointillés. Wzc, 450 aa, *E. coli* K-12 (seulement le domaine N-terminal périplasmique); ExoP, 489 aa, *Sinorhizobium meliloti* (seulement le domaine N-terminal périplasmique); CpsC, 231 aa, *S. pneumoniae*; WzzE, 349 aa, *E. coli* O157:H7; WzzB_{ST}, 327 aa, *S. typhimurium*; FepE, 377 aa, *E. coli* O157:H7; WzzB_{SF}, 325 aa, *S. flexneri*; Wzz_{pHS2}, 369 aa, *S. flexneri* 2a; KpsE, 382 aa, *E. coli*.

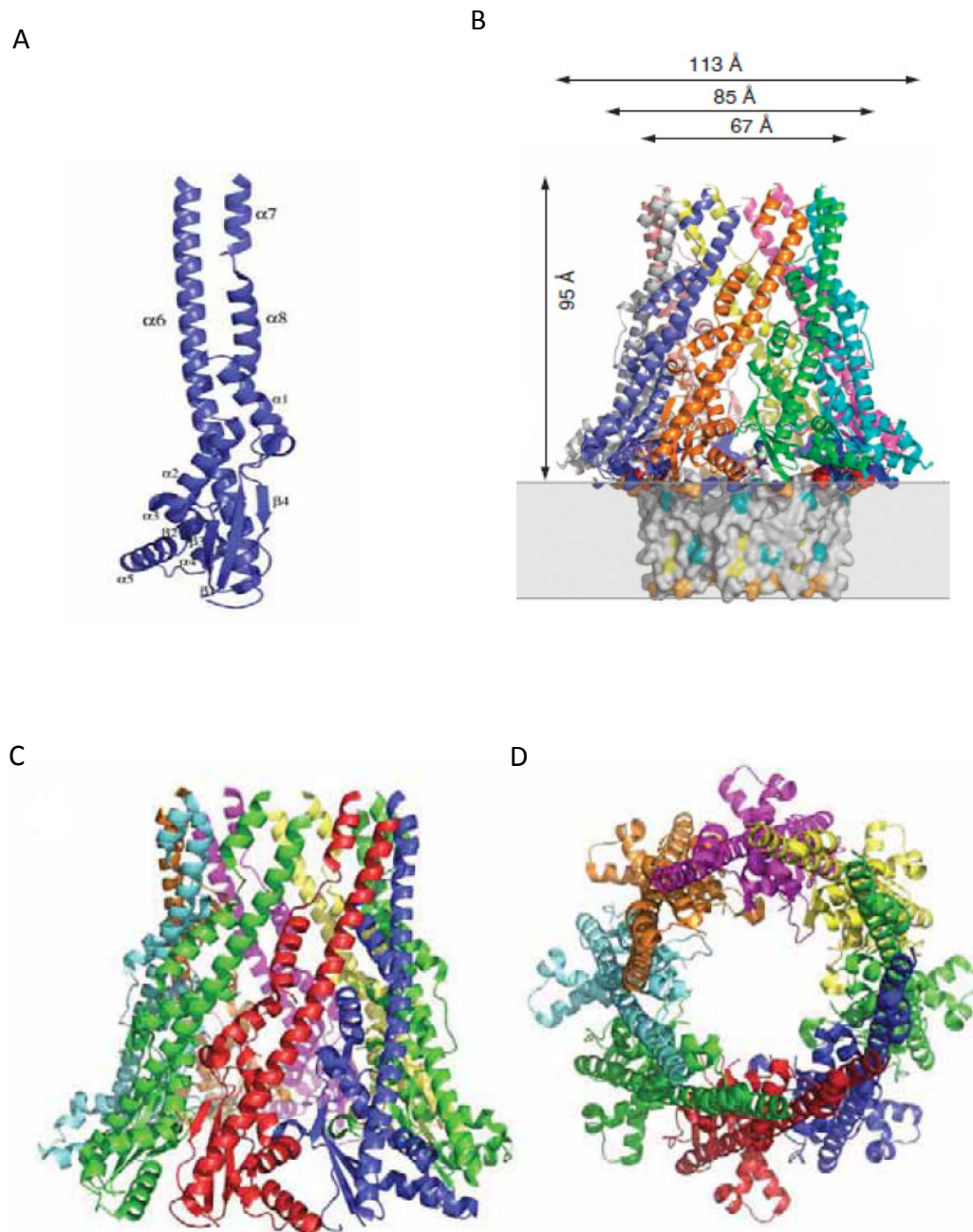


Figure 1.12 Structure 3D de PCP1, Wzz de *E. coli* (Tiré de Tocilj *et al.*, 2008).

A) La structure de monomère B,C) Les structures des oligomères en forme de cloche ou de dé avec des monomères individuels de couleur différente D) vue des structures PCP du haut à partir de la membrane interne.

6. *Lactobacillus rhamnosus*

Les souches *L. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M sont très semblables au niveau génétique, mais leur production d'EPS est radicalement différente en termes de quantités (Péant *et al.*, 2005). *L. rhamnosus* ATCC 9595 produit très peu d'EPS, soit 50 à 100 mg l⁻¹. *L. rhamnosus* RW-9595M est un mutant spontané de la souche ATCC 9595 qui est considéré hyper-mucoïde puisqu'il peut produire une quantité plus élevée d'EPS, soit 400 mg l⁻¹ dans le lait (Dupont *et al.*, 2000) ou 2767 mg l⁻¹ dans le milieu synthétique (perméat de lactosérum supplémenté d'extrait de levure, de sels et d'acides aminés), sous contrôle de pH (Macedo *et al.*, 2002).

La structure de l'EPS produit par *L. rhamnosus* RW-9595M a été déterminée (Figure 1.13) (Van Calsteren *et al.*, 2002). Il possède quatre résidus rhamnose, contrairement à un maximum de deux chez les autres EPS de bactéries lactiques, ainsi que la présence d'un résidu galactose avec une configuration en anneau de pyranose.

Étant très acide, cet EPS ouvre la porte à de nouvelles utilisations, par exemple comme agent stabilisant pour les produits laitiers acidifiés pasteurisés et stérilisés, comme le yogourt à boire et le lait contenant du jus de fruit. Les EPS de RW-9595M ont un potentiel immunomodulateur. La production des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α a été stimulée chez les macrophages péritonéaux murins traités avec la souche ATCC 9595 (Bleau *et al.*, 2010). Les EPS de RW-9595M ont également stimulé la production de cytokines associées à la réponse Th1, incluant l'interleukine IL-12 et l'interféron gamma chez les cellules mononuclées humaines et les splénocytes de souris (Chabot *et al.*, 2001). Les EPS pourraient donc induire une résistance accrue contre les agents infectieux et permettre de réduire les manifestations allergiques. Grâce aux rhamnoses qui sont en effet des 6-désoxy mannoses, ces EPS peuvent être des ligands pour les récepteurs de mannoses des macrophages. Ces récepteurs sur la surface reconnaissent des monosaccharides dans l'ordre d'affinité suivant: D-Mannose = L-Fuctose > D-Glucose = N-acetyl-D-glucosamine >> D-Galactose (ex. dans glucide complexe) par la spécificité de liaisons de type mannose. En plus, ils ont aussi une affinité avec le rhamnose (L-Rhamnose) similaire à celle représentée pour le glucose et l'acétylglucosamine. Ils participent à l'endocytose et à la phagocytose de pathogènes et d'une grande variété de micro-organismes y compris les

levures, les champignons et les protozoaires (Weis, *et al.*, 1998; Zamze, *et al.*, 2002).

Il est aussi intéressant de noter qu'il existe une distinction entre les deux souches pour une enzyme présente dans la voie métabolique qui mène à la biosynthèse des EPS (Parent, 2003). L'activité d'UDP-GalE, l'enzyme qui transforme l'UDP-glucose en UDP-galactose, est beaucoup plus élevée chez RW-9595M que chez la souche ATCC 9595 après 20 heures d'incubation (Parent, 2003). Cependant, cette différence n'est plus présente après 40 heures d'incubation.

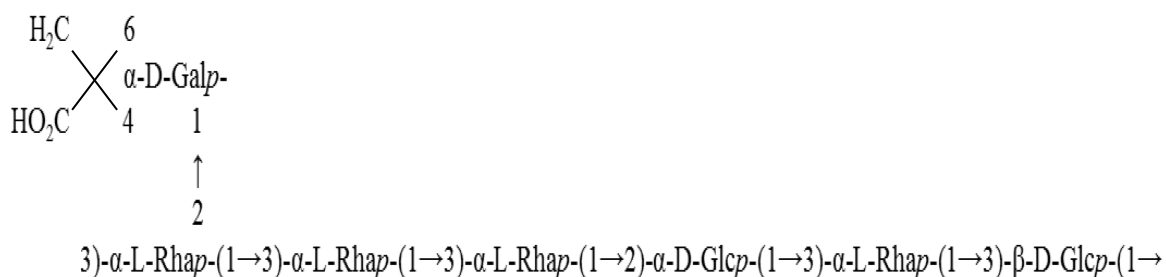


Figure 1.13 Structure de la sous-unité répétée composant les EPS de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et R (Van Calsteren *et al.*, 2002).

Rha; rhamnose, Gal; galactose, Glc ; glucose

6.1 Gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS

Péant *et al* (2005) ont caractérisé les gènes codants pour les enzymes responsables de la synthèse des EPS chez quatre souches de *L. rhamnosus* : R, RW-9595M, ATCC 9595 et RW-6541M. Il s'agit d'un locus d'environ 18,5 kpb avec cinq régions typiques qui regroupent 17 gènes qui codent potentiellement des protéines impliquées dans la biosynthèse des EPS (Figure 1.14).

Les séquences d'acides aminés de 17 protéines prédites étaient comparées (Table 1.1). Les trois gènes, *wzd*, *wze* et *wzb*, codent des protéines ayant des fonctions potentielles dans la détermination de la longueur de chaîne des polysaccharides. Les deux protéines, Wzd et Wzb, sont identiques à 100 %. Par contre, un acide aminé chez Wze est différent entre les souches RW-9595M et ATCC 9595. Chez RW-9595M, une lysine est présente juste après la région Walker A. Par contre, la thréonine est trouvée à la même position chez ATCC 9595. La séquence d'acides aminés diffère pour cinq autres protéines (Wzx, WelI, RmlC, RmlD et Wzr).

Les régions de promoteur P1 sont identiques entre les souches RW-9595M et ATCC 9595 (Figure 1.15). Une séquence similaire au site *cre* est localisée en amont du promoteur P1 (Péant *et al.*, 2005). Il y a aussi des séquences consensus similaires de CRP (cAMP receptor protein), FNR (regulator for fumarate and nitrate reduction) et FLP (FNP-like protein) identifiées dans le promoteur P1. C'est un site putatif de régulation.

Les six gènes situés au niveau de la portion centrale, codent des glycosyltransférases : la protéine WelE serait une glycosyltransférase initiatrice qui ajoute un glucose, WelF, WelH et WelI agiraient comme des rhamnosyltransférases, WelG et WelJ seraient des glucosyltransférases. Le gène *welE* se trouve près de la fin des opérons et il est transcrit individuellement. Une étude a démontré l'impact de la diminution de l'expression de *welE* sur certaines propriétés des EPS de la souche RW-9595M (Bouazzaoui et LaPointe, 2006). La diminution de l'expression de *welE* en utilisant un système ARN antisens chez cette souche n'a pas affecté la quantité d'EPS produite, malgré que l'inactivation d'un gène équivalent chez *L. lactis* NIZO B40 a conduit à une inhibition complète de la production d'EPS (Kranenburg *et al.*, 1997). Cependant, cette modification de l'expression de *welE*

chez la souche RW-9595M a amené à un changement du phénotype. Les auteurs proposent que la réduction de l'activité *WeE* puisse conduire à une diminution de la quantité des unités répétitives disponibles pour la polymérase, aboutissant à l'arrêt prématuré de l'élongation de la chaîne. Ainsi les polysaccharides formés ont une taille plus courte. Les quatre gènes (*rmlA-rmlD*) sont responsables de la production d'enzymes pour la synthèse des précurseurs de rhamnose (dTDP-rhamnose). Le gène *wzy* coderait une polymérase impliquée dans l'assemblage des sous-unités de répétition et le gène *wzx* coderait la protéine qui va transporter les unités répétées à l'extérieur des cellules. *Wzr* codée par le gène *wzr* serait un régulateur transcriptionnel potentiel.

Une étude précédente visait à déterminer si la variation des quantités produites d'EPS entre les deux souches (RW-9595M, et ATCC 9595) pouvait être liée à des différences dans les niveaux d'expression des gènes des opérons EPS entre les souches (Rioux, 2009). L'expression de dix gènes impliqués : l'activité de la glycosyltransférase (*welE*), de la polymérisation des EPS (*wzd*, *wzm*, et *wzb*), de la synthèse de précurseur (*rmlA*, *D*, *galK*, *galE*, et *galR*) ou de la régulation transcriptionnelle (*wzr*) a été comparée entre les deux souches en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Seul *wzr* a été fortement exprimée chez RW-9595M par rapport à ATCC 9595 pendant la croissance exponentielle. En plus, seulement la souche RW-9595M a montré une expression significativement plus élevée de tous les gènes pendant la croissance exponentielle par rapport à la phase stationnaire. Ceci suggère que la souche plus efficace pour la production d'EPS est plus active pour la transcription lors de la croissance exponentielle. Donc, il y aurait des effets potentiels sur la vitesse du métabolisme. Cela permettrait la surproduction d'EPS pendant la croissance.



Figure 1.14 L'organisation des gènes EPS chez *L. rhamnosus* : R, RW-9595M, ATCC 9595 et RW-6541M (Péant *et al.*, 2005).

Table 1.1 La comparaison des séquences d'acides aminés prédites des cadres ouverts de lecture des groupes de gènes EPS de quatre souches de *L. rhamnosus* (Péant *et al.*, 2005).

Le nombre des différents acides aminés est donné entre parenthèses.

Protéine	Pourcentage d'identité avec la séquence d'acides aminés du produit protéique prédit à partir de RW-9595M
	ATCC 9595
Wzd	100 (0)
Wze	99 (1)
Wzx	99 (3)
WelF	100 (0)
WelG	100 (0)
WelH	100 (0)
WelI	99 (1)
Wzy	100 (0)
WelJ	100 (0)
Wzm	100 (0)
RmlA	100 (0)
RmlC	98 (2)
RmlB	100 (0)
RmlD	99 (1)
WelE	100 (0)
Wzr	99 (2)
Wzb	100 (0)

*Trente-quatre acides aminés sont tronqués par un arrêt en Wzx de la souche R.


```

ATCC  TTGTAAAGATAATGTAATAAAAAGTTTACAAACTGTAGGTATGGCTTCAT
RW    TTGTAAAGATAATGTAATAAAAAGTTTACAAACTGTAGGTATGGCTTCAT
*****

ATCC  CAAGGAAGATGGCAAGGAAATAAGCTGTCACCAAGTTAAGGATGAATTGC
RW    CAAGGAAGATGGCAAGGAAATAAGCTGTCACCAAGTTAAGGATGAATTGC
*****

ATCC  TTAAAGCTAAAAAGACGGGTAGACTTGAAAGCACAACTAGGGTATTATG
RW    TTAAAGCTAAAAAGACGGGTAGACTTGAAAGCACAACTAGGGTATTATG
*****

ATCC  CTTGGGAGTGGAAATTTTCAAAGCTCTTTTTACATGAATGCAGTAGTATTT
RW    CTTGGGAGTGGAAATTTTCAAAGCTCTTTTTACATGAATGCAGTAGTATTT
*****

          P1
          ↓
ATCC  TGTGAGAA GTTTGACTAGCTTCACATGAGTAGGATGAATTATATAAGA
RW    TGTGAGAA GTTTGACTAGCTTCACATGAGTAGGATGAATTATATAAGA
*****

ATCC  TGGGATTAGGTGGGAAGAATT
RW    TGGGATTAGGTGGGAAGAATT
*****

```

* : Résidu identique

Figure 1.15 Analyse comparative des séquences nucléotidiques du promoteurs P1 situées dans le locus de biosynthèse d'EPS de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 (ATCC) avec la séquence de RW-9595M (RW).

Une séquence a été trouvée près de 200 bases en amont du promoteur P1 (en surbrillance jaune) (Péant *et al.*, 2005). Les deux nucléotides (ATAAAAAGTTTACA) sont différents avec le site *cre* (ATAAAACGTTTACA) de l'opéron lactose chez *L. casei*. Un site similaire putatif de régulation est situé dans le promoteur (rouge). Ce motif (TTTGActagctTCACA) présente une seule différence de nucléotide avec la séquence consensus de CRP chez *E. coli* (TGTGANNNNNNTCACA), un certain écart par rapport à la séquence consensus de FLP chez *L. casei* (CA / CTGANNNNTCAG / TG), et trois nucléotides différents avec la séquence consensus de FNR chez *E. coli* (TTGATNNNNATCAA).

6.1.1 Wzd

Le gène *wzd* se situe au tout début du locus codant pour la biosynthèse des EPS chez quatre

souches de *L. rhamnosus* en aval d'un promoteur de transcription. Ce gène a une séquence de 915 pb et il code la protéine Wzd (Figure 1.16 A) qui a une taille de 34 kDa (Péant *et al.*, 2005). Cette protéine possède deux régions transmembranaires et une région "coiled-coil" à l'extrémité intracellulaire C-terminale. Cette topologie classe la protéine parmi les PCP de type 2 (PCP2b). La séquence en acides aminés de Wzd contient neuf tyrosines, dont une est située après la région transmembranaire C-terminale. La comparaison avec des protéines similaires provenant d'autres bactéries montre que Wzd est un orthologue de la co-polymérase EpsC de *S. thermophilus* (Glucksmann *et al.*, 1993). La co-polymérase a été identifiée comme étant nécessaire pour la phosphorylation de la kinase (Morona *et al.*, 2000a; Minic *et al.*, 2007). Chez *S. thermophilus* MR-1C, l'interaction entre Wzd (co-polymérase) et Wze (tyrosine kinase) a été démontrée (Cefalo *et al.*, 2011). Par contre, aucune étude n'a démontré l'état de phosphorylation de la co-polymérase, jusqu'à présent.

Wzd possède neuf tyrosines, dont une est située près de la région transmembranaire C-terminale (Figure 1.17). Les protéines homologues CpsC (*S. pneumoniae* Rx1-19F), EpsC (*S. thermophilus* CNRZ1066) et EpsA (*L. lactis* ssp. *cremoris* NIZO B40) possèdent 3, 6 et 7 tyrosines, respectivement. CpsC ne possède pas de tyrosine située près de la région transmembranaire C-terminale. Une étude précédente a démontré que le domaine cytoplasmique de la région transmembranaire C-terminal de la co-polymérase (CpsA) est nécessaire pour l'autophosphorylation intermoléculaire de la kinase (CpsB) chez *S. aureus* (Olivares-Illana *et al.*, 2008). La tyrosine dans ce domaine pourrait participer à la phosphorylation.

6.1.2 Wze

La protéine Wze, codée par le deuxième gène du locus EPS, pourrait avoir la fonction d'une kinase. Le gène *wze* a une séquence de 753 pb et produit une protéine de 27 kDa (Figure 1.18). La transcription de *wze* est sous le contrôle du même promoteur que *wzd*. Cette protéine possède un site de liaison à l'ATP de type Walker A et Walker B. Walker A est considéré comme un motif commun parmi les protéines kinase des procaryotes. Ce motif a la séquence consensus [AG]X₄GK[ST] où A,G,K,S et T désignent respectivement

les résidus de l'alanine, la glycine, la lysine, la sérine et la thréonine. X désigne n'importe quel acide aminé et les crochets indiquent les acides aminés possibles à cette position. Le motif Walker B correspond à la séquence hhhD, où h représente un acide aminé hydrophobe du côté N-terminal ainsi qu'une extrémité C-terminale riche en tyrosines (Péant, 2003). La protéine Wze possède un résidu tyrosine dans une position similaire à la tyrosine 569 décrite chez la protéine Wzc d'*E. coli*. Cette dernière est impliquée dans l'auto-phosphorylation (Grangeasse *et al.*, 2002; Péant *et al.*, 2005). La protéine Wze est orthologue à CpsD de *S. pneumoniae*, à EpsD de *S. thermophilus* et à EpsB de *L. lacis* ssp. *cremoris* (Morona *et al.*, 2000a). La kinase, CpsD, était phosphorylée en présence de CpsC (co-polymérase) chez *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2000a). Des résultats similaires ont été aussi obtenus chez *L. lacis* ssp. *cremoris* et chez *S. thermophilus* (Groot et Kleerebezem, 2007; Minic *et al.*, 2007).

6.1.3 Wzb

La protéine Wzb (Figure 1.16 B) est une protéine homologue de la phosphatase phosphotyrosine, EpsD de *L. bulgaricus* (Lamothe *et al.*, 2002) et de CpsB de *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2002). Ces protéines sont proposées comme étant impliquées dans la détermination de la longueur de la chaîne. La protéine Wzb (27 kDa) est codée par le gène *wzb* (765 pb) situé en dernière position du locus EPS. Elle est précédée par un promoteur qui lui est propre et tout comme pour Wze, Wzb n'a pas de région transmembranaire. Sa fonction de phosphatase a été vérifiée *in vitro* et son activité semble être avantagée par le cobalt et le cuivre (LaPointe *et al.*, 2008). La phosphatase, CpsB, déphosphoryle la kinase (CpsD), chez *S. pneumoniae*. La délétion du gène codant pour cette phosphatase a causé l'augmentation de la phosphorylation de la kinase, ce qui peut affecter la production et l'attachement des CPS (Bender *et al.*, 2003). Chez *L. lacis* ssp. *cremoris*, la délétion de la phosphatase n'a pas influencé la production EPS, car la quantité d'EPS a seulement diminué légèrement (Groot et Kleerebezem, 2007). Un résultat similaire a été observé chez *S. thermophilus* (Minic *et al.*, 2007).

A

MNEQIDLARLWNVFKHSFIVMILLGLLGMFIAYFGAKTFIAPKYSASTSMLVNRKQDNNPN
MQLNAQQADIQIINTYKDIITRPVILREVADDLTSPRRVKVKAQKAVYGTRYNAATGVRE
RYVVKKEEQPAKYKLPKAKYANISEDDLKMSVSNNAQNSQVFTVNVRDTPVRAKDVAN
EIAKVFKAKIASIMSVSNVSIVSRATADPTPVTPLKIASLIGLILGMVLAFTVGLIRELTDQTI
KSIDFITNDLGLVNLGLVNYVORMNDMDEAIARSKNKIIDSEAEPETTGFPQRSRRRV

B

MIDVHCHMLPGIDDGSKDLTTSLELAQAAVADGITHALMTPHHMNGRYTNHATDVIRMTD
EFQDELDRRNIPLTVFPCQEVRRINGQLLEAIDHNDILTCDVSGHYVLIEFPSDDVPLYTQNM
FEVMQRGMIPVIVHPERNTRLMKHPGLLYQMVERGAFQAQTASSYVGTFGKKVQQFSEDI
DAGLAHVFAHHLPGRSYEMSAAFKRLTRKRGEKKARIFEENARALVNGDPLVRFNER
KVEKRLLSRY

Figure 1.16 Séquences complètes des protéines Wzd et Wzb

A) Séquence en acides aminés de Wzd (co-polymerase): Les surbrillances grises correspondent aux régions transmembranaires et les régions hydrophobes sont soulignées. Les lettres en gras soulignées indiquent la région coiled-coil B) Séquence en acides aminés de Wzb (phosphatase)

WzdRW

MNE-----QIDLARLWNVFKHSFIVMILLGLLGMFIAYFGAKTFIAPKY 44

WzdATCC	MNE-----QIDLARLWNVFKHS	FIVMILLGLLGMFIAYFGAKTFIAPKY	44
CpsC	MKEQNTL--EIDVLQLFRALWKRK	LVILLVAIITSSVAFAYSTFVIKPEF	48
EpsC	MNQDNTKSDEIDVLALLHKLWTKK	LLILFTAFYFAVFSFLGTYYFFIQPTY	50
EpsA	MQE--TQEQTIDLRGIFKIIIRKRLG	LILFSALIVTILGSIYTFEIA SPVY	48
	*::	**:	: . :
		::::	:: .. :
WzdRW	SASTSMLVNRKQDNNPN-MQLNAQQADIQIINT	YKDII TRPVILREVADD	93
WzdATCC	SASTSMLVNRKQDNNPN-MQLNAQQADIQIINT	YKDII TRPVILREVADD	93
CpsC	TSMTRI	YVVNRDQGEKSLTNQDLQAGSSLVKDYREI ILSQDVLEEVS	98
EpsC	TSTTRI	YVVNQATDNKN-LSAQDLQAGTYLANDYKEI ITSNVLESEVIKD	99
EpsA	TASTQLVVKLPNSDNSA-A	YAGEVTGNIQMANTINQVIVSPVILD DKVQSN	97
	:: *	: *	.. : : .::* :* :* ..
WzdRW	LTSPRRVKVKAQKAV	YGTRYNAATGVRERYVVKEEQPAKYKLKPAKYAN	143
WzdATCC	LTSPRRVKVKAQKAV	YGTRYNAATGVRERYVVKEEQPAKYKLKPAKYAN	143
CpsC	LK-----	-----LD	102
EpsC	EK-----	-----LN	103
EpsA	L-----	-----N	99
			:
WzdRW	ISEDDLKMI SVSNAQNSQVFTVNV	RDTDPVRAKDVANEIAKVFKAKIAS	193
WzdATCC	ISEDDLKMI SVSNAQNSQVFTVNV	RDTDPVRAKDVANEIAKVFKAKIAS	193
CpsC	LTPKDLANKIKVTVPVDTRIVSVS	DRVPEEASRIANSLREVAQAQKII	152
EpsC	LSEAELSKMVSUNIPTDTRLISIS	VNAKTGQDAQTLANKVREVASKKIKK	153
EpsA	LSDDSFQKQVTAANQNSQVIMLTV	KYSNPYIAKKIADETAKIFSSDAAK	149
	:: .:	: : . .	::::: .:* * . :* . : :
WzdRW	IMSVNSVIVSRATADPTVTPNLK	IASLIGLILGMVLAFTVGLIRELTD	243
WzdATCC	IMSVNSVIVSRATADPTVTPNLK	IASLIGLILGMVLAFTVGLIRELTD	243
CpsC	ITRVSDVTTLEEARPATSPSSPNIKR	STLIGFLAGVIGTSVIVLILELLD	202
EpsC	VTKVENVTTLLEAKLPESPPSPNIKLN	VLLGAVLGGFLAVVGVLVREILD	203
EpsA	LLNVTNVNLSKAKAQTPISP	PKPK LYLAISVIAGLVGLAIAL LKELFD	199
	: *	:* . : . *	:* :* : * : . : * . :* :* :
WzdRW	QTIKSIDFITNDLGLVNLGLVNY	VQRMNDMDEAIARSKNKIIDSEAE PET	293
WzdATCC	QTIKSIDFITNDLGLVNLGLVNY	VQRMNDMDEAIARSKNKIIDSEAE PET	293
CpsC	TRVRRPKDIEDTLQMTLLGIVP	-----NLNKLK-----	230
EpsC	DRVRRPEDVEDALGMTLLGIVP	-----DTDKI-----	230
EpsA	NKINKEEDIE-ALGLTVLGVTSY	DQ-MSDFNKNTNKNGTQSGTKSSPPSD	247
	: .	: *	: . :* : . :
WzdRW	TGFPQRSRRRV-----	304	* : Résidu identique
WzdATCC	TGFPQRSRRRV-----	304	: : Substitution conservatrice
CpsC	-----		. : Substitution semi-conservatrice
EpsC	-----		
EpsA	HEVNRSSKRNRK----	259	- : intervalle

Figure 1.17 Alignement de la séquence de Wzd avec les autres co-polymérase.

Wzd de *L. rhamnosus* RW-9595M(RW) et ATCC 9595(ATCC) étaient comparées avec les protéines homologues comme CpsC de *S. pneumoniae* Rx1-19F, EpsC de *S. thermophilus* CNRZ1066 et EpsA de *L. lactis* ssp. *cremoris* NIZO B40. Les régions correspondant aux motifs associés aux séquences transmembranaires sont en surbrillance jaune et la région coiled-coil est doublement soulignée.

```

Wze ATCC MNFSLEKILHRHKEDQETQKNGVMLVTF AEPKHVVSEQFRTVVRTNIEFAG 50
Wze RW   MNFSLEKILHRHKEDQETQKNGVMLVTF AEPKHVVSEQFRTVVRTNIEFAG 50
          *****

          Walker A A/GXXXXGKS/T      Walker B hhhD
Wze ATCC AALDQCQVVMFTSSAMSEGKSTVSANVAVTWAQAGKKVLLIDADLRRPTV 100
Wze RW   AALDQCQVVMFTSSAMSEGKSKVSANVAVTWAQAGKKVLLIDADLRRPTV 100
          *****

Wze ATCC HATFRTLNLGDGVTTVLTGKEKPDDVVEETFVDNMSIITSGPVPPNPSELL 150
Wze RW   HATFRTLNLGDGVTTVLTGKEKPDDVVEETFVDNMSIITSGPVPPNPSELL 150
          *****

          Walker B hhhD
Wze ATCC NSKRMAGLLEWAREKYDIIVLDAPPVLAVSDVQVLVPKTDGVVVVANMGK 200
Wze RW   NSKRMAGLLEWAREKYDIIVLDAPPVLAVSDVQVLVPKTDGVVVVANMGK 200
          *****

Wze ATCC TLKGLDKRTVEVLKLANAKILGSVERVKAKHGDRGYGYGYGYGNESNK 250
Wze RW   TLKGLDKRTVEVLKLANAKILGSVERVKAKHGDRGYGYGYGYGNESNK 250
          *****

```

* : Résidu identique; . : Substitution semi-conservatrice

Figure 1.18 Alignement de la séquence de Wze ATCC (*L. rhamnosus* ATCC 9595) avec la séquence de Wze RW (*L. rhamnosus* RW-9595M)

WzeRW de RW-9595M et WzeATCC de ATCC 9595 ont été comparées. Les motifs Walker A (GKT/S) et Walker B (hhhD) sont en surbrillance grise. Les régions riches en tyrosines sont encadrées et les tyrosines dans ces régions sont bleues. Les différences d'acides aminés entre les deux Wze sont en surbrillance jaune. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

7. Problématique, Hypothèse et Objectifs

7.1 Problématique

L'industrie alimentaire s'intéresse à la recherche sur les bactéries lactiques GRAS et productrices d'EPS, car ces dernières sont capables d'améliorer la texture et la rhéologie des produits et également peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé. Une meilleure connaissance de la biosynthèse des EPS et de sa régulation peut aider à utiliser de telles souches. Cette connaissance permettra de comprendre les limitations sur la production. En effet, les bactéries lactiques ne produisent pas beaucoup de HePS, malgré qu'elles puissent produire des HoPS à plus de 10 g l⁻¹. De plus, la compréhension des mécanismes de biosynthèse permettra de contrôler la longueur des chaînes et d'influencer les propriétés rhéologiques et fonctionnelles des EPS telles que l'immuno-modulation ou l'interaction avec les bactéries pathogènes ou probiotiques.

Jusqu'à ce jour, les études sur le mécanisme de polymérisation des EPS ont été réalisées pour la plupart chez *E. coli* et chez *S. pneumoniae*. Il existe des similarités entre certains mécanismes des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, bien qu'il y ait beaucoup de différences entre ces bactéries. Les études ciblant d'autres genres bactériens peuvent aider à préciser les similarités et les différences entre les mécanismes, ainsi que d'approfondir des portions des mécanismes.

Chez *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595, la séquence des gènes impliqués dans la production d'EPS est hautement similaire (99 %), bien que ces souches aient des niveaux de production d'EPS très différents. En analysant le mécanisme de production des EPS, il sera possible de déterminer les mécanismes ou les facteurs liés aux différences de production d'EPS chez ces souches.

7.2 Hypothèse

Treize gènes provenant de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ou ATCC 9595 sont suffisants pour conférer le phénotype de la biosynthèse et la polymérisation des EPS lorsque transférés chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* possédant les gènes équivalents codant pour la production du précurseur dTDP-rhamnose (*rmlA-rmlD*). L'interaction entre les trois protéines Wzd, Wze et Wzb du complexe de polymérisation des EPS est gouvernée par des événements de phosphorylation réversible de tyrosines.

7.3 Les objectifs

1. Comparer l'impact de l'introduction de 13 gènes des opérons EPS de *L. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M sur la production d'EPS chez *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363.
2. Déterminer l'effet de la phosphorylation de la protéine Wzd sur les interactions entre les protéines responsables de la biosynthèse des EPS chez *L. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M.

Chapitre 2

Étude de la fonctionnalité des gènes de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595 codant pour la production d'exo-polysaccharides chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Study of the function of the *eps* gene cluster from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M and ATCC 9595 expressed in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363

Résumé

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M et ATCC 9595 possèdent des opérons codant pour la biosynthèse d'exopolysaccharides (EPS) et ces gènes sont identiques à 99 %. Cependant, ces deux souches produisent des quantités différentes d'EPS (543 vs 108 mg l⁻¹). Les gènes responsables de la biosynthèse des EPS, codés par l'ADN chromosomique, ont une taille de 18,5 kpb codant pour 17 gènes. Le transfert de ce groupe de gènes chez la souche non productrice d'EPS, *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 permet de montrer l'effet de ces gènes sur la production des EPS et d'étudier la phosphorylation des protéines pouvant être impliquées dans la polymérisation. Les transformants *L. lactis* contenant les opérons EPS issus de RW-9595M et ATCC 9595 produisent des quantités similaires de 326 et 302 mg l⁻¹ d'EPS, respectivement. La protéine co-polymérase (Wzd) est proposée comme participant à la détermination de la longueur de chaîne des polymères EPS. La présente étude montre que Wzd est présente sous forme phosphorylée en présence de la kinase phosphorylée (Wze), tandis qu'aucune protéine phosphorylée n'a été détectée lorsque les neuf tyrosines de Wzd ont été substituées par la phénylalanine. Ainsi, la protéine Wzd phosphorylée est essentielle pour la phosphorylation de Wze.

Abstract

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M and ATCC 9595 possess biosynthetic operons EPS which are 99 % identical but produce different amounts of exopolysaccharides (EPS) (543 vs 108 mg l⁻¹). The genes responsible for EPS biosynthesis are 18.5 kb encoding for 17 genes on chromosomal DNA. Transfer of this gene cluster into non-EPS-producing strain, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 allows to show the effect of this *eps* gene cluster on production EPS and to study the phosphorylation of proteins which may be involved in polymerization. *L. lactis* transformed with the operons from RW-9595M and ATCC 9595 produce EPS as 326 and 302 mg l⁻¹, respectively. The co-polymerase (Wzd) protein is proposed to participate in the determination of the chain length of the EPS polymers. This study shows that Wzd was in phosphorylated form in presence of the phosphorylated kinase (Wze), while no phosphorylated proteins were detected when all nine tyrosines of Wzd were mutated to phenylalanine. Thus, phosphorylated Wzd is essential for phosphorylation of Wze.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) can synthesize and secrete polysaccharides which can be slightly or non attached to their surface (EPS; exopolysaccharide) (Cerning, 1994). EPS derived from LAB may have beneficial effects on human health through immunomodulation (Vinderola *et al.*, 2006), antitumour (Kitazawa *et al.*, 1998) and cholesterol-lowering activity (Nakajima *et al.*, 1992). In the food industry, EPS produced by LAB function as viscosifiers, stabilizers, emulsifiers and gelling agents (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilan, 2005). The EPS are classified as homopolysaccharides and heteropolysaccharides by their composition. EPS from LAB display a great variety of structures and different sugar moieties (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002) and the genetic diversity of EPS gene clusters has been shown with many different bacterial strains. The molar mass of EPS is an important determinant of intrinsic viscosity, and may be the key physicochemical parameter to determine their capacity for immunomodulation, along with their charge (Van Den Berg *et al.*, 1995; Faber *et al.*, 1998; Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012).

Biosynthesis of heteropolysaccharides (HePs) is the result of polymerization of repeating units composed of monosaccharides. The sugars transported into the cytoplasm are converted to nucleotide sugars to be used as EPS precursors for the biosynthesis of the repeating unit. The repeating units are exported outside the cell membrane and polymerized. EPS production requires genes coding for repeat unit assembly, regulation, polymerization, chain length determination and export (Vuyst and Degeest, 1999; De Vuyst *et al.*, 2001). In *Streptococcus pneumoniae*, CpsB, CpsC and CpsD were shown to regulate CPS production by reversible phosphorylation events. CpsD is an autophosphorylating protein tyrosine kinase and CpsC (the co-polymerase) is required for the phosphorylation of CpsD (Bender *et al.*, 2003; Morona *et al.*, 2003). Similar systems have been proposed for EPS production by *S. thermophilus*. EpsC (the co-polymerase) is necessary for EpsD (kinase) phosphorylation while both EpsC and EpsD are required for the activity of EpsE (priming glycosyltransferase), thus enabling EPS repeat unit biosynthesis (Minic *et al.*, 2007).

Some strains of *Lactobacillus rhamnosus* are capable of producing EPS. For example, *L.*

rhamnosus GG (LGG) produces a galactose-rich surface polysaccharide. This strain is a probiotic with the various health benefits. LGG could prevent and relieve atopic disease and certain types of diarrhea such as children's rotavirus diarrhea. It could also influence inflammatory bowel disease (Kalliomaki *et al.*, 2001; Zocco *et al.*, 2006; Guarino *et al.*, 2009). The EPS of this strain is important for probiotics to survive and to persist inside the host, because EPS molecules protect the strain during GIT transit and these molecules are one of the factors determining biofilm formation (Branda *et al.*, 2005; Lebeer *et al.*, 2007; Lebeer *et al.*, 2008; Lebeer *et al.*, 2010).

L. rhamnosus RW-9595M is one of the highest EPS-producing strains of LAB, as 2350 mg l⁻¹ are produced in supplemented whey permeate (SWP) medium (Bergmaier *et al.*, 2003). The EPS of this strain is composed of L-rhamnose, D-glucose and pyruvate substituted D-galactose in a ratio of 4 : 2 : 1. Such a high rhamnose content (57%) is unusual (Van Calsteren *et al.*, 2002). The closely-related strain *L. rhamnosus* ATCC 9595 also produces EPS, but ATCC 9595 produces only 116 mg l⁻¹ while RW-9595M produces 1611 mg l⁻¹ in the same medium (Péant *et al.*, 2005). The EPS of RW-9595M is capable of immunomodulation by stimulating proinflammatory cytokines and by inducing anti-inflammatory cytokine production when the EPS was hydrolyzed (Chabot *et al.*, 2001; Bleau *et al.*, 2010). Bleau *et al.* (2010) discovered the different stimulation of cytokines between ATCC 9595 (pro-inflammatory) and RW-9595M (Bleau *et al.*, 2010). The highly-similar EPS biosynthesis gene clusters of the two strains code for 17 ORFs (18.5 kb) on chromosomal DNA. They have six putative glycosyltransferases for biosynthesis of the repeating unit and four *rml* genes involved in the anabolism of dTDP-L-rhamnose. Three genes related to chain-length determination were detected. The first two genes located at the 5' region of the gene cluster are proposed to be a co-polymerase and a kinase, respectively. In the 3' region of the gene clusters, gene *wzb* is a homolog of the phosphotyrosine protein phosphatase from *S. pneumoniae* and its phosphatase activity has been verified (LaPointe *et al.*, 2008). The transcription of EPS biosynthesis genes may be initiated by five different promoters (Péant *et al.*, 2005). In this study, the genes from *L. rhamnosus* ATCC 9595 and RW-9595M were transferred to *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in order to determine how the host species affects EPS yield. We also show the phosphorylation state of the proteins which are proposed to be involved in polymerization

and the impact of tyrosine mutation on the phosphorylation state of Wzd in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids for this study are listed in Table 2.1. All strains were stored at -80 °C in growth medium supplemented with 15 % glycerol. *L. rhamnosus* strains ATCC 9595 and RW-9595M were grown without agitation at 37 °C in MRS (Man Rogosa Sharpe Broth; EMD chemicals Inc., Darmstadt, Germany) medium supplemented with 0.5 % (w/v) glucose.

L. lactis subsp. *cremoris* MG1363 was grown in M17 broth (Quelab, Montreal, QC) supplemented with either 0.5 % or 2 % (w/v) glucose (GM17) incubated at 30 °C. GM17 agar medium containing 0.08 % ruthenium red (Sigma, St. Louis, MO, USA) was designated RGM17 and was used to confirm EPS production, as non EPS-producing *L. lactis* colonies are colored red on this medium (Dabour and LaPointe, 2005). Ruthenium red can bind with the charged polysaccharide pellicle of *L. lactis* (Chapot-Chartier *et al.*, 2010). *Escherichia coli* was grown at 37 °C in low salt Luria Bertani (LB) medium with agitation or on LB solidified with 1.5 % agar (EMD chemicals Inc., Darmstadt, Germany). Antibiotics were added at the following concentrations: erythromycin and chloramphenicol for *L. lactis* strains, 5 µg ml⁻¹ and kanamycin for *E. coli* strain 50 µg ml⁻¹, when necessary.

Table 2.1 Bacterial strains used in this study.

Strain	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	Low EPS-producing strain (116 mg l ⁻¹)	ATCC ¹
<i>L. rhamnosus</i> RW-9595M	High EPS-producing strain (1611 mg l ⁻¹)	Denis Roy ²
<i>E. coli</i> Top 10	Cloning host (F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1</i> λ-)	Invitrogen
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Plasmid free (Lac ⁻ Prt ⁻)	(Gasson, 1983)
<i>L. lactis</i> MG1363 (pEPS1R and pEPS2R)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pEPS1R and pEPS2R, pIL253 and pNZ124 based vectors, respectively, containing the entire <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M <i>eps</i> gene cluster without <i>rmlA-D</i>	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pEPS1A and pEPS2A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pEPS1A and pEPS2A, pIL253 and pNZ124 based vectors, respectively, containing the entire <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 <i>eps</i> gene cluster without <i>rmlA-D</i>	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ1R or pHJ1A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ1R or pHJ1A, pMG36CT based vector containing <i>wzd</i> , <i>wze</i> and <i>wzb</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ2R or pHJ2A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ2R or pHJ2A, pMG36CT based vector containing <i>wzd</i> and <i>wze</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ3R or pHJ3A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ3R or pHJ3A, pMG36CT based vector containing <i>wzd</i> and <i>wzb</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ4R or pHJ4A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ4R or pHJ4A, pMG36CT based vector containing <i>wze</i> and <i>wzb</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ5R or pHJ5A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ5R or pHJ5A, pMG36CT based vector containing <i>wzd</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ6R or pHJ6A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ6R or pHJ6A, pMG36CT based vector containing <i>wze</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ7R or pHJ7A)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ7R or pHJ7A, pMG36CT based vector containing <i>wzb</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
<i>L. lactis</i> MG1363 (pHJ8R)	<i>L. lactis</i> MG1363 harboring pHJ8R, pMG36CT based vector containing <i>wzd</i> mutated 9 tyrosine, <i>wze</i> and <i>wzb</i> of <i>L. rhamnosus</i> RW-9595M	This study

1 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ; Qiagen S.A. (Courtaboeuf, France) ; Stratagene (LaJolla, CA, USA); Amersham Biosciences (Orsay, France).

2 Original source: Denis Roy, INAF, Université Laval. (Dupont *et al.*, 2000)

Table 2.2 Plasmids used in this study.

Plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
pIL253	Em, 4.9 kb, pAM β 1 replicon	(Simon and Chopin, 1988)
pNZ124	Cm, 2.8 kb, pSH71 replicon	(Platteeuw <i>et al.</i> , 1994)
pMG36CT	Cm, 3.7 kb, pWV01 replicon	(Van de Guchte <i>et al.</i> , 1989)
pCR-XL-topo	Km, T- overhangs for ligation of long PCR products	Invitrogen
pEPS1R and pEPS1A	pIL253 containing 10 kb BamHI-SalI PCR amplicon (genes <i>wzd</i> to <i>wzm</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pEPS2R and pEPS2A	pNZ124 containing 3.7 kb PvuII-PstI PCR amplicon (gene <i>welE</i> to <i>wzb</i>) from either RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ1R and pHJ1A	pMG36CT containing 2.6 kb SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzd</i> , <i>wze</i> and <i>wzb</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ2R and pHJ2A	pMG36CT containing 1.8 kb SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzd</i> and <i>wze</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ3R and pHJ3A	pMG36CT containing 1.8 kb SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzd</i> and <i>wzb</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ4R and pHJ4A	pMG36CT containing 1.6 kb SacI-AatII PCR amplicon (<i>wze</i> and <i>wzb</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ5R and pHJ5A	pMG36CT containing 923 bp SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzd</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ6R and pHJ6A	pMG36CT containing 856 bp SacI-AatII PCR amplicon (<i>wze</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ7R and pHJ7A	pMG36CT containing 835 bp SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzb</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)	This study
pHJ8R	pMG36CT containing 2.6 kb SacI-AatII PCR amplicon (<i>wzd</i> 9 mutated tyrosines, <i>wze</i> and <i>wzb</i>) from RW9595M	This study

2.2 DNA manipulation and transformation

Genomic DNA was extracted from *L. rhamnosus* with the method of Audy *et al.* (2010). The Phase Lock Gel Heavy tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) was utilized for the phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25: 24: 1, by vol.) extraction. Plasmid DNA extraction from *L. lactis* was performed with the method of O'Sullivan and Klaenhammer (1993). Plasmid DNA extraction from *E. coli* was completed by the plasmid mini prep kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). PCR was performed with the primers listed in Table 2.3 by Biometra T-Gradient thermocycler in a total volume of 50 μ l containing 1 U Taq DNA polymerase (Feldan-bio, Québec, QC, Canada), 1X PCR buffer, 0.2 μ M of each primer, 0.4 mM of dNTP Mix and 50 ng DNA. The initial denaturation was 2 min at 94 °C. Amplification consisted of 15 s denaturation step at 94 °C, a 1 min annealing step at T_m depends on primer and a 1 min/kb extension step at 72 °C. After 30 cycles of amplification, there was a final extension step for 5 min at 72 °C. LongAmp Taq DNA polymerase (Feldan) was used for amplifying gene fragments longer than 4 kb. This long range PCR was performed using conditions as above, but the elongation step was performed at 68 °C. Negative control reactions were performed for all amplifications. Target genes were amplified using genomic DNA of *L. rhamnosus* strain as template and the amplicons were digested and purified by Qiaquick PCR purification kit or Qiaquick gel purification kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The digested products were ligated with linearized vector using T4 DNA ligase (New England Biolab, Pickering, ON, Canada), and a molar ratio of vector and insert was 1:2 or 1:3. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 was transformed with the ligated DNA by electroporation and recombinant plasmids were verified by digestion with restriction enzymes after plasmid DNA extraction as well as by DNA sequencing with an ABI Prism 3100 apparatus (Holo and Nes, 1989).

2.3 EPS isolation and quantification

L. lactis subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1 and pEPS2) was cultured twice for 20 h in GM17 before inoculation at 2 % (v/v) in 250 ml M17 medium supplemented with 0.5 % glucose and 5 μ g ml⁻¹ erythromycin and chloramphenicol respectively for 24 h at 30 °C.

EPS were extracted from the culture supernatant from 50 ml growth medium incubated for 0 h and 24 h, and following the method of Cerning (Cerning *et al.*, 1994) with some modifications. The bacterial cells were removed by centrifugation at 12 000 x g for 30 min at 4 °C, and the EPS in supernatant was precipitated with 3 volumes of ethanol. The precipitated EPS was dialyzed for a total of five days, three days against distilled water and two days against demineralized water. EPS quantity is expressed in equivalent glucose units as determined by the phenol/sulfuric acid method (Dubois *et al.*, 1951).

2.4 Western immunoblotting

A volume of 1 ml of bacterial cells grown to 5×10^8 CFU/ml (A_{600} of 0.65) in GM17 were centrifuged at 20, 000 x g for 10 min at 4 °C. The pellets were suspended in sample buffer (0.1 M Tris-HCl(pH 6.8), 2 % SDS, 20 % glycerol, 0.005 % bromophenol blue and 1/10 (v/v) β -mercaptoethanol) then boiled for 8 min (Morona *et al.*, 2000; Bender *et al.*, 2003). Twenty microliters were separated by SDS-PAGE and transferred by semi-dry electroblotting onto polyvinylidene difluoride membrane with the Trans-Blot SD semi-Dry transfer cell (company) under constant current of 5.5 mA cm^{-2} for 30 min and the membranes were blocked for 1 h with Block-PO Noise cancelling reagents (Millipore). Mouse monoclonal IgG anti phosphotyrosine 4G10 (Millipore) was added at 1:1,000 dilution overnight at 4 °C to detect phosphotyrosine protein. After six 5 min washes with Tris buffered saline (TBS) (100 mM Tris, pH 7.4, 0.9 % NaCl) with 0.05 % Tween 20 (TBST), membranes were incubated for 1 h with 1:20,000 dilution of secondary antibody (mouse anti-IgG) coupled with horseradish peroxydase (HRP) (Millipore). After 6 washes as above, 0.12 ml cm^{-2} of Supersignal solution (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) was used for HRP detection and visualized by exposure to Amersham Hyperfilm ECL (GE life science, Buckingham, UK).

Table 2.3 Oligonucleotide primers used in this study.

Name	Sequence ¹	T _m (°C)
P1wzdBamHI	CCG <u>GAT CCG</u> GGT ATT ATG CTT GGG AGT G	58
WzmXhoI	GGC <u>TCG AGC</u> AAC AAA GCC ATC ATT ACC AG	58
P3welEcoRV	CCG <u>ATA TCT</u> GAG ATT TCA CAC TGG TTA GTG	57
wzbNsil	GCA <u>TGC ATA</u> TGA AAT TAG CAC TCG CAC AAC C	57
wzdRSacI	CGG <u>AGC TCA</u> AGA GCA AAT TGA CCT TGC AC	58
wzdFAatII	CGG <u>ACG TCT</u> CTC CTC AAT ACT TAA ACG CGT C	58
wzdFXbaI	CGT <u>CTA GAT</u> ACT TAA ACG CGT CTC CGG CTT CG	58
wzdF-wzb	ATA CTA TCT AAG CTC AAT ACT TAA ACG CGT CTC CGG	58
wzeRSacI	CGG <u>AGC TCA</u> ATT TTC ATT AGA GAA AAT TTT GC	58
wzeRXbaI	GCG <u>TCT AGA</u> TTG AGG AGA AAA AAC ATG AAT TTT TC	58
wzeFAatII	CGG <u>ACG TCT</u> CGT ACT TAT CAC CAT TCG GTT GAC	58
wzeF-wzb	AAT ACT ATC TAA GGC ATG CTA TTT ATT AGA TTC GTT CCC	58
wzbRsacI	CGG <u>AGC TCT</u> TGA TGT GCA TTG CCA TAT GTT ACC	58
wzbFAatII	CGG <u>ACG TCA</u> TGA AAT TAG CAC TCG CAC AAC C	58
wzbR-wzd	TTA AGT ATT GAG CTT AGA TAG TAT TGG AAG GGG AAC	58
wzbR-wze	ATA AAT AGC ATG CCT TAG ATA GTA TTG GAA GGG GAA C	58
pMG36R	AAA TGG CAA TCG TTT CAG CAG	56
pMG36F	CGT CGC CTT TAC CAA CTG TC	56

¹ Restriction sites in primers are indicated with double underlined letters.

3. Results

3.1 Transfer of EPS biosynthesis gene clusters from two strains of *L. rhamnosus* to *L. lactis* subsp. *cremoris*

3.1.1 Construction of recombinant, EPS producing *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363

Long range PCR was carried out to amplify a 10,565 bp fragment coding for genes *wzd* to *wzm* (primers P1wzdBamHI and wzmXhoI; T_m; 58 °C) and a 3,747 bp fragment coding for genes *welE* to *wzb* (primers P3welEEcoRV and wzbNsiI with T_m of 57 °C), using as template the chromosomal DNA from each strain ATCC 9595 and RW-9595M. The PCR products were purified after gel electrophoresis from agarose gel stained with crystal violet and the four products were cloned into the pCR-XL-TOPO vector. *E. coli* TOPO10 was transformed with the two recombinant plasmids. The restriction enzyme BglII was utilized for digestion to confirm the success of cloning with genes *wzd* to *wzm* and two fragments, 3,790 bp and 10,295 bp were visualized on agarose gel (Figure 2.1 A). For the cloning with genes *welE* to *wzb*, restriction enzyme HindIII was utilized and the plasmid was digested into three fragments 157 bp, 1924 bp and 5185 bp, of which the latter two fragments were also confirmed by visualization on agarose gel (Figure 2.1 B).

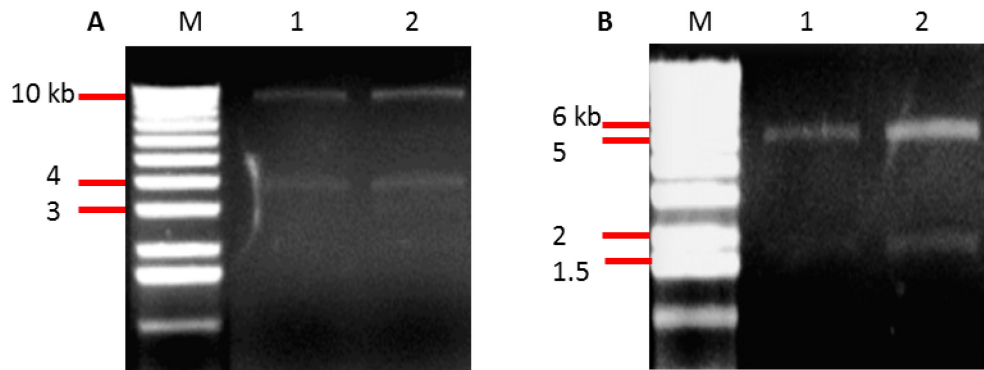


Figure 2.1 Size determination of cloned plasmid inserts (0.8 % agarose gel).

A) Digestion pCR-XL-TOPO + *wzd* to *wzm* (14 kb) from two *L. rhamnosus* strains RW-9595M (1) or ATCC 9595 (2) with BglII which produce two bands corresponding to the 3790 bp and 10295 bp. B) Digestion pCR-XL-TOPO + *welE* to *wzb* (7.2 kb) from strains RW-9595M (1) or ATCC 9595 (2) with HindIII which produces three bands

Recombinant plasmid pCR-XL-TOPO with *wzd* to *wzm* was digested using BamHI/XhoI, then purified and ligated to pIL253 linearized with BamHI/SalI (Figure 2.2 A), resulting in plasmids pEPS1A and pEPS1R (15,281 bp) coding for genes *wzd* to *wzm* of two *L. rhamnosus* strain ATCC 9595 and RW-9595M, respectively. These recombinant plasmids have the endogenous P1 promoter from each strain (Figure 2.3 A). Plasmid pEPS2 (6322 bp) was constructed with *welE* to *wzb* digested by NsiI/EcoRV and ligated to pNZ124 linearized by PstI/PvuII (Figure 2.2 B). pEPS2A and pEPS2R include the endogenous P3 promoter from each strain. MG1363 was transformed by electroporation with plasmids pEPS1A and pEPS2A or pEPS1R and pEPS2R (Figure 2.3). Several colonies for each transformation were tested by restriction enzyme digests to confirm the construction. The plasmid pEPS1 is a total of 15,281 bp, so it was above 12 kb and provides a weak band (Figure 2.4 A). To verify the inserts of pEPS1, PCR was performed to amplify *wzd* to *wze* (1795 bp) and amplified fragments were between 1,500 and 2,000 bp in size. The size of plasmid pEPS2 (6322 bp) was verified by gel electrophoresis (Figure 2.4 B), and EcoRI digestion was utilized to confirm insert size by the presence of two bands at 2,496 bp and 3,765 bp (Figure 2.4 C), while the smallest fragment of 61 bp was too short for detection under the conditions used. Transformants having incorporated the correct plasmids were retained to test EPS production.

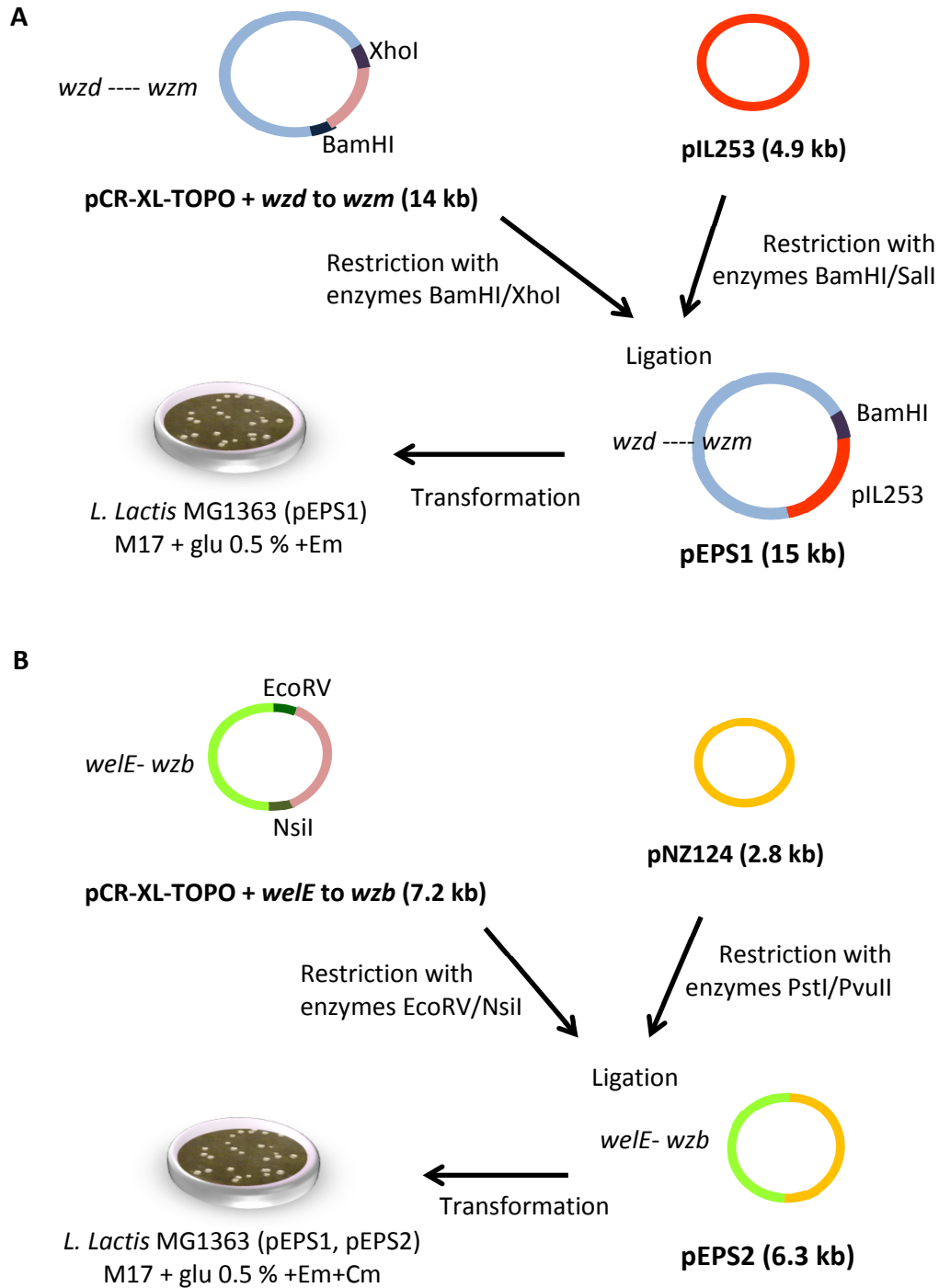


Figure 2.2 Construction of pEPS1 and pEPS2.

A) The plasmid pEPS1 contains genes *wzd-wzm* amplified from two *L. rhamnosus* strains cloned into pIL253 B) plasmid pEPS2 contains genes *weE-wzb* from two *L. rhamnosus* strains cloned into pNZ124.

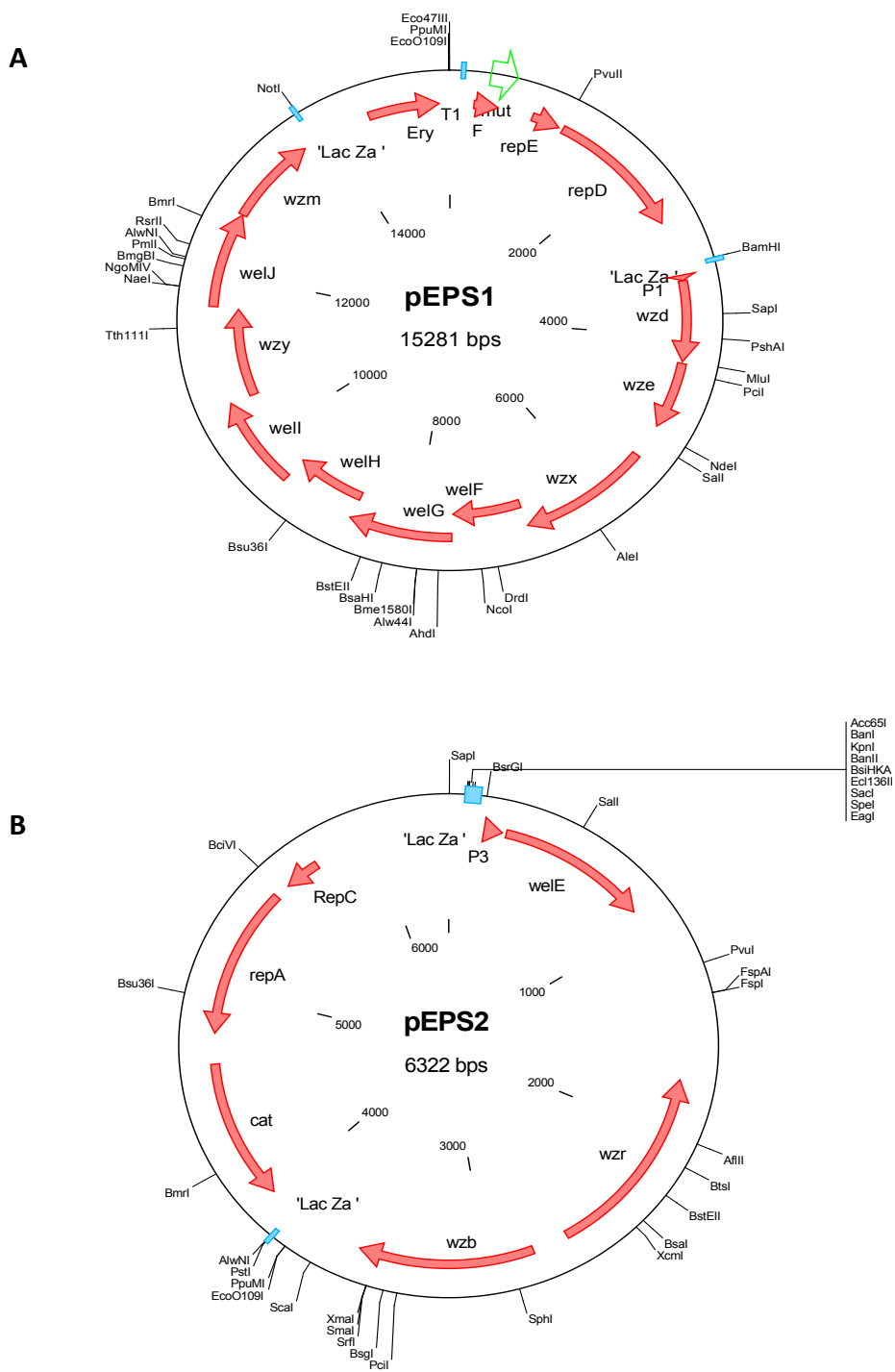


Figure 2.3 Genetic organization of pEPS1 and pEPS2.

Genetic organization of plasmids with cloned gene clusters from two *L. rhamnosus* strains (R: RW-9595M; A: ATCC 9595) A) Genes *wzd-wzm*: pEPS1R and pEPS1A B) Genes *welE-wzb*: pEPS2R and pEPS2A.

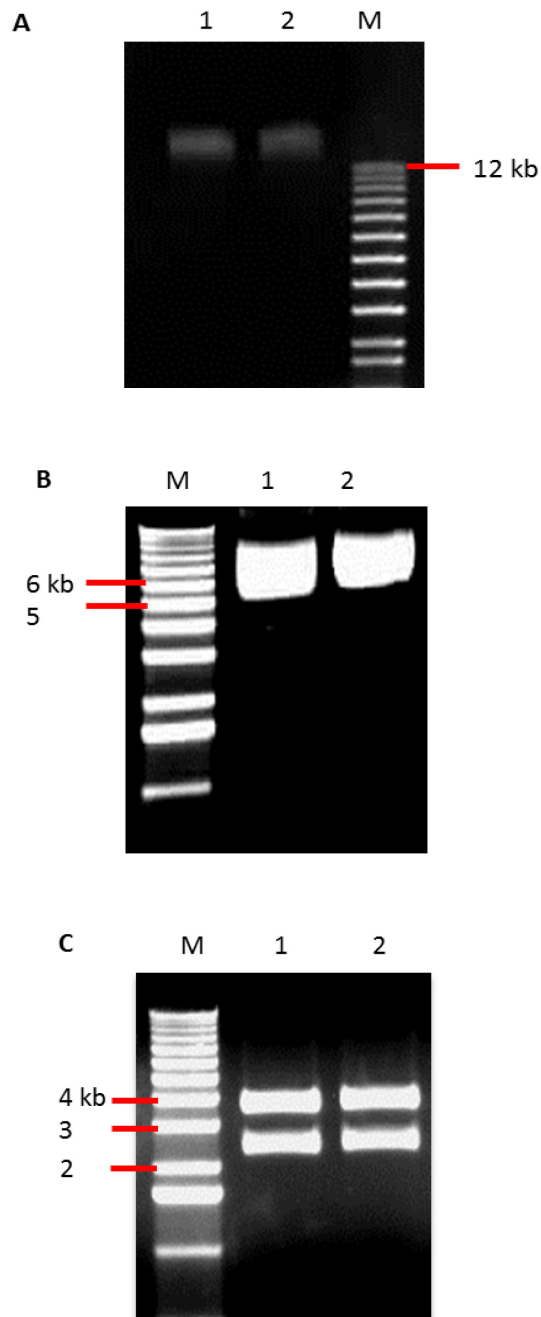


Figure 2.4 Determination of inserts of recombinant plasmids (0.8 % agarose gel).

A) pEPS1 (15kb) : Plasmids with cloned gene clusters from two *L. rhamnosus* strains (R: RW-9595M; A: ATCC 9595) Genes *wzd-wzm*: pEPS1R (1) and pEPS1A (2) B) pEPS2 (6.3 kb): Plasmids with cloned gene clusters from two *L. rhamnosus* strains (R: RW-9595M; A: ATCC 9595) Genes *welE-wzb*: pEPS2R (1) and pEPS2A (2) C) Digestion pEPS2R (1) and pEPS2A (2) with EcoRI which produces three fragments of 61 bp, 2496 bp and 3765 bp (of which two are visible).

3.1.2 Growth of recombinant *L. lactis* subsp. *cremoris* strains

The growth of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pIL253 and pNZ124) and the two recombinants was monitored in liquid GM17 medium (Figure 2.5) starting with equivalent initial viable counts of 5×10^7 CFU/ml. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) and (pEPS1A and pEPS2A) have identical growth curves. The two recombinant strains reached the stationary phase at 8 h, when the cell density was about 3×10^9 CFU/ml. In contrast, the stationary phase was attained sooner for strains of MG1363 carrying only the vector plasmids (pIL253 and pNZ124), at 6 h of incubation and at a slightly higher viable count of 4×10^9 CFU/ml.

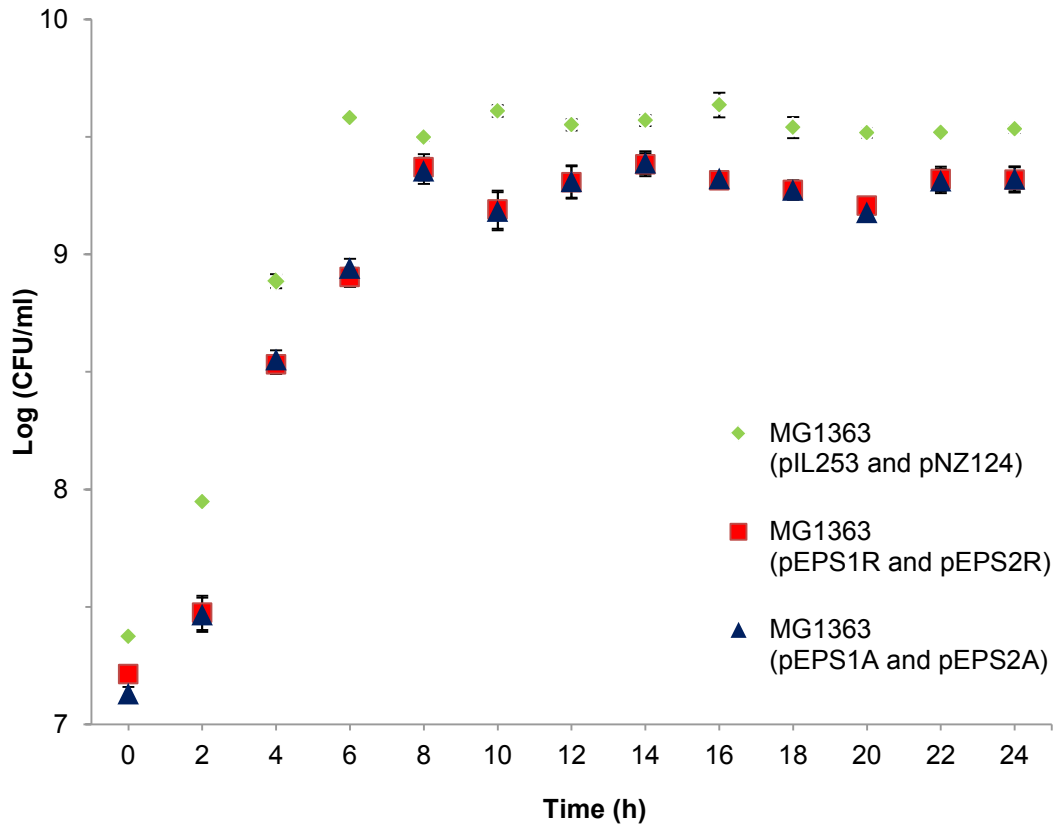


Figure 2.5 Growth of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pIL253 and pNZ124), MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) and MG1363 (pEPS1A and pEPS2A) in GM17 at 30 °C.

3.1.3 EPS production by recombinant *L. lactis*

The presence of EPS of the two recombinant strains was verified on RGM17 with 0.5 % or 2 % glucose. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) had two types of colonies, which were red and white on the plate with 0.5 % glucose, while only red colonies were present on the plates containing 2 % glucose (Figure 2.6). Red and moderately rough colonies exhibited a phenotype similar to the wild-type strain *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Rosy white colonies were smooth, large and shiny and this mucoid colony phenotype resembles that of the strain of origin for the genes, *L. rhamnosus* RW-9595M. The colonies of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1A and pEPS2A) were identical to those of the recombinant strain carrying the genes of RW-9595M, with red and white colonies on 0.5 % glucose and red colonies on 2 % glucose.

The white colonies were chosen for incubation in GM17 to quantify EPS production in GM17 medium containing either 0.5 % or 2 % glucose. The fermentation for EPS production was for 24 h without pH control, and EPS were isolated and purified from the medium. No detectable EPS were produced in GM17 with 2 % glucose, as the values remained similar to non-fermented GM17 medium. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 with ORFs of RW-9595M and ATCC 9595 produce 302 and 326 mg l⁻¹, respectively (Table 2.4), which is not significantly different (Student's t test, P = 0.46).

Table 2.4 EPS production by recombinant strains of *L. lactis*.

Strain	EPS production (mg l ⁻¹)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (pIL253 and pNZ124)	30.8 ± 9.0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (pEPS1R and pEPS2R)	302.7 ± 6.2
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (pEPS1A and pEPS2A)	326.8 ± 26.4

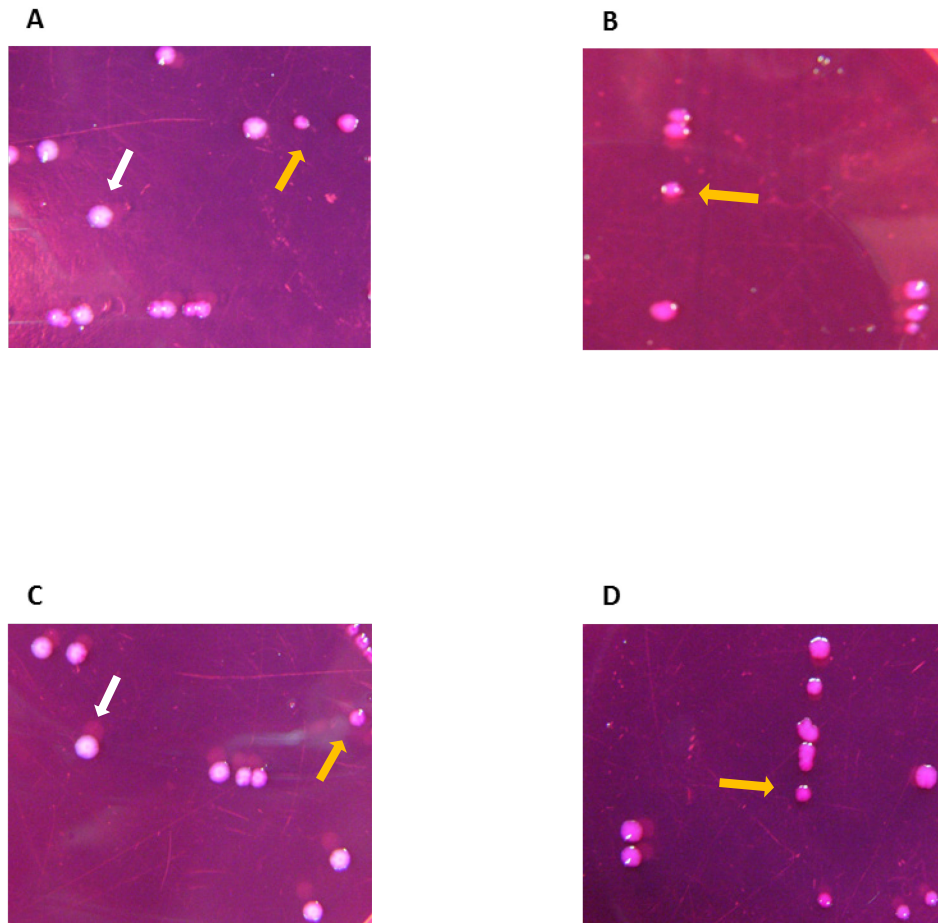


Figure 2.6 Detection of the EPS producing derivatives of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 on GM17 plates containing two concentrations of glucose.

Ruthenium red plate assay showing two different colony types of *L. lactis*. Orange and white arrows show small red colonies and large rosy white colonies, respectively. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) with 0.5 % (A) and 2 % (B) glucose. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pEPS1A and pEPS2A) with 0.5 % (C) and 2 % (D) glucose.

3.2 Tyrosine phosphorylation of Wzd and Wze in *L. lactis* subsp. *cremoris*

3.2.1 Deletion of Wzd, Wze, or Wzb, and tyrosine mutation of Wzd in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363

Transformed *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 were constructed to produce combinations of the proteins Wzd, Wze or Wzb (Table 2.2). The genes *wzd*, *wze* and *wzb* were cloned into pMG36CT, in combinations designed to eliminate each of the genes in turn, and to be able to replace the wild type *wzd* gene with genes containing either 1 or 9 point mutations.

The PCR was carried out to amplify genes for cloning into pMG36CT and the chromosomal DNA from each strain ATCC 9595 and RW-9595M was utilized for the PCR reaction. Genes *wzd*, *wze* or *wzb* were amplified with the primers *wzd*RSacI and *wzd*FAatII, *wze*RSacI and *wze*FAatII, or *wzb*RSacI and *wzb*FAatII, respectively and then each PCR product was cloned into pMG36CT linearized with SacI/AatII for pHJ5, pHJ6, or pHJ7, respectively. Genes *wzd* and *wze* were amplified together using *wzd*RSacI and *wze*FAatII and cloned into pMG36CT linearized with SacI/AatII for the deletion of *wzb* (pHJ2). For the deletion of *wzd*, two genes, *wze* and *wzb*, were amplified separately with primers *wze*RSacI/*wze*F-*wzb* and *wzb*R-*wze*/*wzb*FAatII, respectively. The second step consisted of diluting both amplicons 1:50 and mixing them in equimolar ratio in order to amplify the combined two genes using primers *wze*RSacI and *wzb*FAatII. The amplification product of the combined genes was cloned into pMG36CT digested with SacI/AatII (pHJ4). For the deletion of *wze*, primers *wzd*RSacI/*wzd*F-*wzb* and *wzb*R-*wzd*/*wzb*FAatII were utilized for the first PCR. Two amplicons, *wzd* and *wzb*, were combined by PCR using *wze*RSacI as reverse primer and *wzb*FAatII as forward primer, and the combined product was cloned into pMG36CT (pHJ3). For pMG36CT containing the 2.6 kb SacI-AatII PCR amplicon (*wzd*, *wze* and *wzb*) from either RW-9595M or ATCC 9595 (pHJ1), *wze* and *wzb* were cloned into the plasmid first (Figure 2.7). Two genes were amplified with primers *wze*RXbaI/*wze*F-*wzb* and *wzb*R-*wze*/*wzb*FAatII for the first PCR, and two amplicons, *wze* and *wzb*, were combined by PCR using *wze*RXbaI as reverse primer and *wzb*FAatII as forward primer. The combined genes were cloned into pMG36CT digested with XbaI/AatII. The *wzd* gene

was amplified using primers *wzdRSacI* and *wzdFXbaI*, and then cloned into pMG36CT-*wzewzb* digested with *SacI/XbaI*. Nine separate tyrosine mutations to phenylalanine in the nucleotide sequence of *wzd* were constructed by gene synthesis along with a tenth including all nine mutations simultaneously (Table 2.5) (GenScript, USA). Each tyrosine mutated *wzd* gene was cloned into pMG36CT-*wzewzb* as done with the original *wzd* gene (pHJ8).

Table 2.5 Comparison of the sequences of all tyrosine substituted and wild *wzd* genes.

	Wild <i>wzd</i> *	Tyrosine to phenylalanine substituted <i>wzd</i>
Y33F	547-ATG TTT ATT GCA <i>TAT</i> TTC-564	ATG TTT ATT GCA <u>TTT</u> TTC
Y44F	580-ATT GCC CCA AAA <i>TAT</i> TCG-597	ATT GCC CCA AAA <u>TTT</u> TCG
Y77F	682-ATT AAT ACA <i>TAT</i> AAG GAC-699	ATT AAT ACA <u>TTT</u> AAG GAC
Y110F	781-AAA GCC GTC <i>TAT</i> GGT ACA-798	AAA GCC GTC <u>TTT</u> GGT ACA
Y114F	796-ACA CGA <i>TAT</i> AAT GCT GCT-813	ACA CGA <u>TTT</u> AAT GCT GCT
Y124F	820-GTT CGT GAA CGT <i>TAT</i> GTA-837	GTT CGT GAA CGT <u>TTT</u> GTA
Y134F	853-CCG GCA AAA <i>TAC</i> AAA TTA-870	CCG GCA AAA <u>TTT</u> AAA TTA
Y141F	871-AAA CCA GCA AAG <i>TAC</i> GCA-888	AAA CCA GCA AAG <u>TTT</u> GCA
Y266F	1255-AAT <i>TAT</i> GTG CAA CGG ATG-1272	AAT <u>TTT</u> GTG CAA CGG ATG

The codons encoding tyrosine are in italics and the codons encoding phenylalanine are underlined.

*The sequence of *wzd* is from GenBank (AY659979)

3.2.2 Determination of the phosphorylation state of Wzd, Wze, Wzb and Wzd9YF containing nine mutated tyrosine residues.

As negative controls, there was no phosphorylated protein when *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 or MG1363 with pMG36CT extracts were probed with the anti-phosphotyrosine antibody. The results did not differ between the recombinant strains carrying genes from ATCC 9595 or from RW-9595M. When the three proteins were expressed separately in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ5), (pHJ6) and (pHJ7), no phosphorylated tyrosine residues were detected (Figure 2.8 and Table 2.6). Two tyrosine-phosphorylated proteins were detected with *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ2), one was the size of Wzd (33 kDa), and another was the size of Wze (27 kDa). On the other hand, the antibody did not detect either the 33 kDa or the 27 kDa protein in extracts of the Wze or Wzd deletion mutants, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ3) or (pHJ4) respectively. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ1) produces three proteins, Wzd, Wze and Wzb giving identical results as with *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ2); the two bands were of the expected sizes of 33 kDa and 27 kDa. As Wzb is 29 kDa, Wze and Wzb cannot be distinguished in the pHJ1 protein extract. The signals of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pHJ1) or (pHJ2) by anti-phosphotyrosine antibody were very faint on the blot obtained after separation by 12 % SDS-PAGE. They were detected clearly on 15 % polyacrylamide gel, where two proteins, Wzd (33 kDa) and Wze (27 kDa), were not well separated by their size. When all 9 tyrosines were mutated in the Wzd sequence, no phosphorylated proteins were detected.

A

PCR amplification of *wze* using primers *wzeRXbaI/wzeF-wzb*



PCR amplification of *wzb* using primers *wzbR-wze/wzbFAaII*



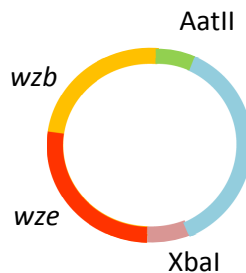
PCR amplification of *wzewzb* using primers *wzeRXbaI/wzbFAaII*



pMG36CT (3.7 kb)

Restriction with enzymes *XbaI/AaII*

Ligation



pMG36CT + *wze, wzb* (5.5 kb)

Figure 2.7 A Construction of pHJ1.

Construction of pMG36CT+ *wze, wzb*: The plasmid used as the vector for cloning with *wzd* was constructed with *SacI* and *AaII*. Two PCR products, *wze* and *wzb* were amplified together in another PCR reaction.

B

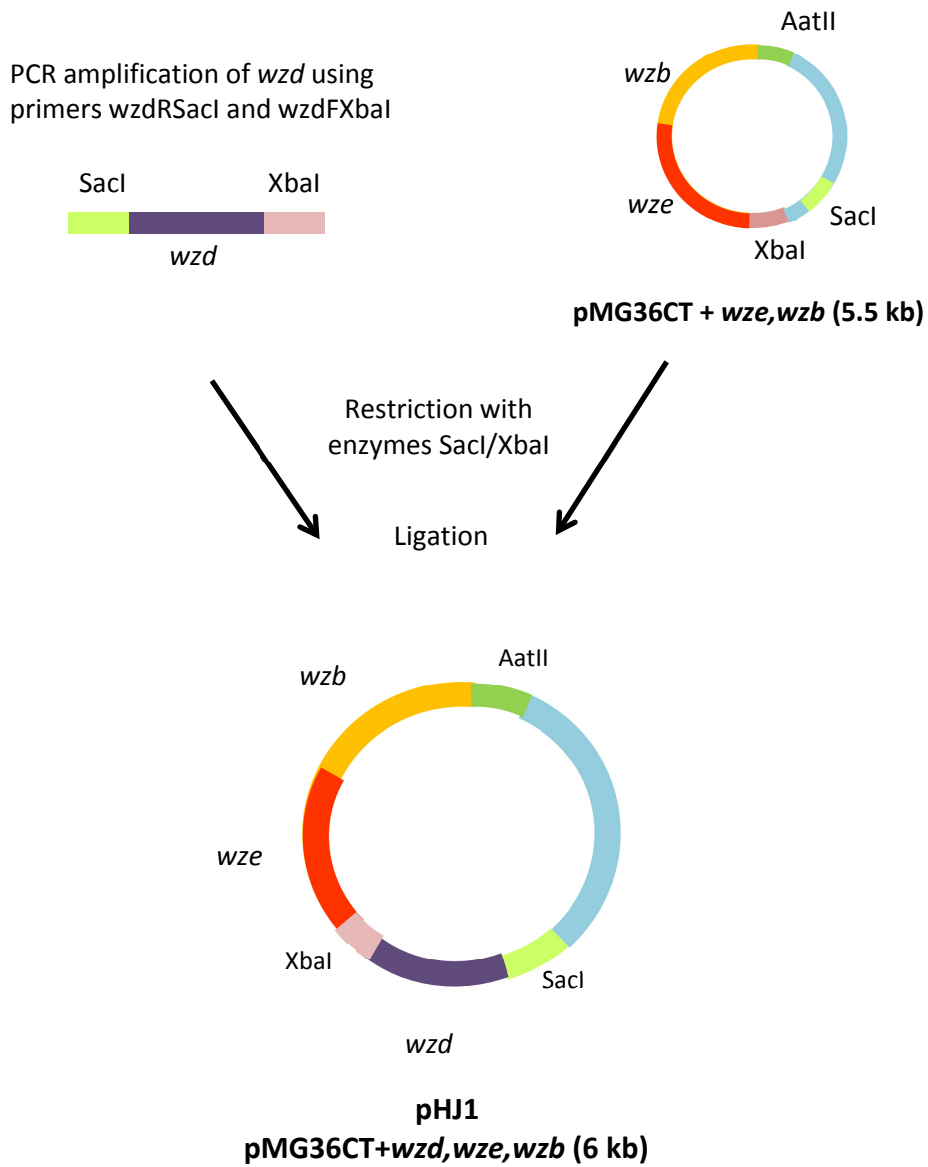


Figure 2.7 B Construction of pHJ1.

The PCR product of *wzd* was used as insert, and the plasmid pMG36CT+ *wze,wzb* (A) was the recipient vector. The insert and vector were digested with SacI and XbaI, and ligated.

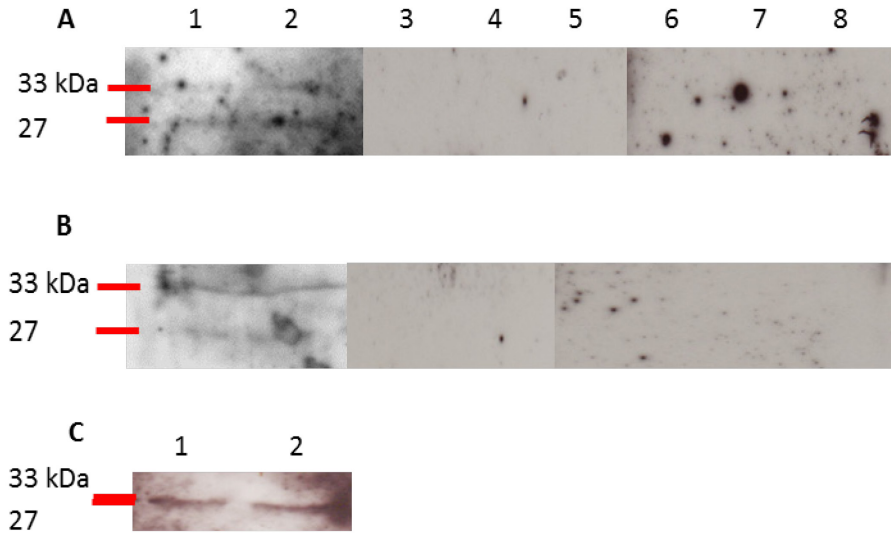


Figure 2.8 Western immunoblot of the phosphorylation state of Wzd and Wze proteins expressed in *L. lactis*, probed with mouse monoclonal anti phosphotyrosine antibody.

The proteins were separated by 12% SDS-PAGE (A) Detection of tyrosine phosphorylated Wzd (33 kDa) and Wze (27 kDa) expressed in *L. lactis* with pHJ1R (1), pHJ2R (2), pHJ3R (3), pHJ4R (4), pHJ8R (5), pHJ5R (6), pHJ6R (7) and pHJ7R (8). (B) Detection of tyrosine phosphorylated Wzd and Wze expressed in *L. lactis* with pHJ1A (1), pHJ2A (2), pHJ3A (3), pHJ4A (4), pHJ5A (5), pHJ6A (6), pHJ7A (7) and pMG36CT (8). (C) Cell lysates of *L. lactis* with pHJ1R (1) and pHJ2R (2) were separated by 15 % SDS-PAGE and tyrosine phosphorylated proteins were detected, but with little separation.

Table 2.6 Summary of tyrosine phosphorylation state of proteins produced in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 transformed with recombinant plasmids combining one, two or three genes coding for Wzd, Wze and Wzb.

	Wzd	Wzd	Wzd	Wzd9YF	Wzd	Wzd	Wzd
	Wze	Wze	Wze	Wze	Wze	Wze	Wze
	Wzb	Wzb	Wzb	Wzb	Wzb	Wzb	Wzb
Wzd	+	+	-	-	-	-	-
Wze and/or Wzb	+	+	-	-	-	-	-

4. Discussion

4.1 EPS production by *L. lactis* subsp. *cremoris* transformants

L. rhamnosus RW-9595M and ATCC 9595 produce different quantities of EPS, although their ORFs are 99 % identical (Péant *et al.*, 2005). The 13 out of 17 genes of the *eps* gene clusters from two strains were successfully cloned and transferred to a non-EPS-producing host, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Four genes (*rmlA*, *B*, *C* and *D*) for synthesis of dTDP-rhamnose were excluded, because the MG1363 genome already codes for these functions. *L. lactis* (pEPS1R and pEPS2R) or (pEPS2A and pEPS2A) were capable of producing EPS in greater amount than other *L. lactis* subsp. *cremoris* strains such as SMQ-461 (152 mg l⁻¹ in M17 with 2 % lactose (Dabour and LaPointe, 2005). The NIZO B40 *eps* gene cluster from *L. lactis* NZ9000 (pNZ4030) produced only 93 mg l⁻¹ with 6 % glucose when transferred to strain MG1363 (Boels *et al.*, 2003). However, the identical *eps* gene cluster transferred to the high copy number plasmid pIL253 lead to increased EPS production at 343 mg l⁻¹ in the same strain. In this study, the *eps* genes were cloned into high copy number plasmids, pIL253 and pNZ124 and thus pIL253 can be estimated as 45-80 copies per chromosome equivalent (Simon and Chopin, 1988). Therefore, the transformed *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 strains may produce more EPS than SMQ-461, because of the copy number of lactobacillus *eps* genes provided by the recombinant plasmids.

EPS production requires sugar transportation into the cytoplasm in order to form precursors for the biosynthesis of repeating unit, so sugar concentration affects EPS production (Cerning *et al.*, 1994). Increased carbon source generally leads to raised EPS production in lactic acid bacteria. EPS production is also associated with growth as *L. rhamnosus* R started the production of EPS at the end of the exponential phase (Pham *et al.*, 2000). The synthesis was carried on beyond the decline growth phase with glucose. In our study, EPS producing mutants reached stationary phase later than the non EPS producing strain, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (pIL253 and pZN124). The recombinant *L. lactis* strains produced more EPS with 0.5 % than with 2 % glucose. This might mean that

transcription and exopolysaccharide production are regulated by catabolite repression by glucose, analogous to the catabolite repression of the *gal* operon, suggested in a previous study (Luesink *et al.*, 1998). In Gram positive bacteria, catabolite repression could be regulated by CcpA which binds to DNA target sites, catabolite-responsive elements (*cre*). The activity of a promoter which is located upstream of *cre* is down regulated by CcpA, while the transcription is activated by binding of CcpA to *cre* upstream of the promoter. The repression also occurred when CcpA binds to a *cre* site which overlaps the promoter (Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Muscariello *et al.*, 2001; Abdou *et al.*, 2008). Upstream DNA of the *eps* cluster may eliminate catabolite repression by CcpA in *L. rhamnosus*. Alternatively, the CcpA protein of *L. lactis* may recognize a box near the P1 promoter.

A previous study reported the presence of consensus sequences similar to CRP, FNR and FLP identified in the P1 promoter (Péant *et al.*, 2005). CRP (cAMP receptor protein) and FNR (regulator for fumarate and nitrate reduction) are regulators which control transcription in Gram negative bacteria and FLP (FNP-like protein) was discovered as a regulator in *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* (Irvine and Guest, 1993; Green *et al.*, 2001; Körner *et al.*, 2003). The previous study suggested that FLP is a regulator of *arc* operon (arginine deminase system) expression in *S. gordonii* (Dong *et al.*, 2004). Flp deficient mutant showed an 11 fold decrease in expression compared with the result of the wild type strain. Therefore, three consensus sequences in the promoter of *eps* operons could be regulation sites in recombinant *L. lactis* strains.

L. rhamnosus RW-9595M produces 1161 mg l⁻¹ EPS and ATCC 9595 has about 60 mg l⁻¹ EPS after 24 h fermentation controlled at pH 6.0 with 4 % glucose. A study underway by our team so far suggests that expression of *eps* genes did not differ between these two strains (N. Mecheri, personal communication). The EPS quantity of two recombinant *L. lactis* subsp. *cremoris* strains of the present study was not significantly different either. In the present study, only 13 genes were transferred to *L. lactis*. The whole genome sequence of *L. rhamnosus* strains was not determined, while 17 ORFs have been identified as putative EPS biosynthesis genes. Therefore, it is also possible that these two *L. rhamnosus* strains have another system to regulate production or to add to the biosynthesis of EPS. However, *L. lactis* expressing the genes from ATCC 9595 is able to synthesize over twice

the amount of EPS as the original strain. Thus, *L. lactis* produces the same amount of EPS irrespective of gene source. This means that either ATCC 9595 metabolism may not be able to provide enough precursors to allow the same level of production as RW-9595M, or that gene regulation in RW-9595M provides more precursors. Previous studies showed that different quantity and structure of EPS were produced in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 expressing *eps* genes from *S. thermophilus* (Stingele *et al.*, 1999). They suggest that these differences are because of the lack of a precursor, and the difficulty of certain glycosyltransferases to recognize the subunit. The polymerization machinery has a wide specificity, as it can still produce EPS even though the subunit is different.

4.2 Phosphorylation state of Wzd, Wze and Wzb proteins expressed in *L. lactis* subsp. *cremoris*.

The auto- and trans-phosphorylation of the CpsD protein tyrosine kinase (PTK) requires the presence of the CpsC co-polymerase accessory transmembrane protein, and appears to negatively affect CPS polymerization in one strain of *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2003), and a similar protein complex formation has been proposed in *L. lactis* (Groot and Kleerebezem, 2007) and *S. thermophilus* (Minic *et al.*, 2007). The proteins Wzd, Wze and Wzb predicted to be the co-polymerase, tyrosine kinase and protein tyrosine phosphatase may play a preponderant role in the control of EPS polymerization. In this study, these proteins were expressed in *L. lactis* by the genes *wzd*, *wze* and *wzb* from *L. rhamnosus* ATCC 9595 and RW-9595M. Using an antiphosphotyrosine antibody, the three proteins, Wzd, Wze and Wzb were not in a phosphorylated form when they were expressed individually. This suggests that the proteins are not phosphorylated by any protein of *L. lactis* nor are they auto-phosphorylated. Wzd and Wze were in phosphorylated form when expressed together. There were no phosphorylated proteins in the absence of Wzd or Wze, while deletion of Wzb did not influence the global phosphorylation state. This means that the Wzd co-polymerase is needed for auto- or trans-phosphorylation of the Wze kinase in *L. lactis*, as described for *S. pneumoniae* (Bender and Yother, 2001), but does not have kinase activity itself. Our study shows that Wze is also required for phosphorylation of Wzd. Moreover, the mutant Wzd protein showed identical results to that of the Wzd deletion. No

proteins were phosphorylated when all nine tyrosines in Wzd were mutated to phenylalanine. This result suggests that tyrosine phosphorylation of Wzd is necessary for the phosphorylation of Wze, but also that the presence and phosphorylation of Wze is required for the phosphorylation of Wzd.

The properties of EPS as food additives and their beneficial effects on human health such as immunomodulation are related to the chemical and physical properties of EPS. Increasing knowledge on biosynthesis of EPS will make it possible to enhance their production under defined conditions and to develop their application. These results show *L. lactis* could produce EPS with the *eps* gene clusters of *L. rhamnosus* under conditions of limited quantities of glucose. The phosphorylation of Wzd in lactic acid bacteria has never been demonstrated while the phosphorylation state of Wze was the focus of the protein complex for polymerization of EPS in many previous studies. The phosphorylation of the co-polymerase may be a supplemental step for EPS polymerization. Future experiments will use the *L. lactis* expression system to determine the role of Wzd and the impact of tyrosine phosphorylation on EPS biosynthesis, in order to determine their function in modulating the biosynthesis of exopolysaccharides.

Abbreviations

EPS ; exopolysaccharide, *L. rhamnosus* ; *Lactobacillus rhamnosus*, *S. pneumonia* ; *Streptococcus pneumonia*, *S. thermophilus* ; *Streptococcus thermophilus*, *L. lactis* ; *Lactococcus lactis*, *E. coli* ; *Escherichia coli*

5. Acknowledgments

This work was supported by a NSERC (Natural Sciences and Engineering Council of Canada) discovery grant awarded to G. LaPointe. We thank Mathilde Guzzo and Marion Neuille for their technical assistance.

6. References

- Abdou, L., Boileau, C., de Philip, P., Pages, S., Fiérobe, H.-P., Tardif, C.** (2008) Transcriptional regulation of the *Clostridium cellulolyticum* *cip-cel* operon: a complex mechanism involving a catabolite-responsive element. *Journal of Bacteriology* 190: 1499-1506.
- Audy, J., Labrie, S., Roy, D., LaPointe, G.** (2010) Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. *Microbiology* 156: 653-664.
- Bender, M., Cartee, R., Yother, J.** (2003) Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 185: 6057-6066.
- Bender, M., Yother, J.** (2001) CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47966-47974.
- Bergmaier, D., Champagne, C., Lacroix, C.** (2003) Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1049-1057.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., Lamontagne, L.** (2010) Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology* 108: 666-675.
- Boels, I. C., van Kranenburg, R., Kanning, M. W., Chong, B. F., de Vos, W. M., Kleerebezem, M.** (2003) Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 *eps* gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5029-5031.
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R.** (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13: 20-26.
- Cerning, J., Renard, C., Thibault, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L.** (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3914-3919.
- Chapot-Chartier, M.-P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M.-Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C.** (2010) Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *Journal of Biological Chemistry* 285: 10464-10471.

- Chabot, S., Yu, H. L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D.** (2001) Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Le Lait* 81: 683-697.
- Dabour, N., LaPointe, G.** (2005) Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7414-7425.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B.** (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 687-707.
- Dong, Y., Chen, Y.-Y. M., Burne, R.** (2004) Control of expression of the arginine deiminase operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. *Journal of Bacteriology* 186: 2511-2514.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F.** (1951) A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168: 167.
- Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F.** (1998) The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research* 310: 269-276.
- Gasson, M. J.** (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology* 154: 1-9.
- Green, J., Scott, C., Guest, J. R.** (2001) Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Advances in Microbial Physiology* 44: 1-34.
- Groot, N., Kleerebezem, M.** (2007) Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2645-2656.
- Guarino, A., Vecchio, A. L., Canani, R. B.** (2009) Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Current Opinion in Gastroenterology* 25: 18-23.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., Clara, G., Suárez, A., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P.** (2012) Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4: 227-237.
- Holo, H., Nes, I. F.** (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of

- Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Applied and Environmental Microbiology 55: 3119-3123.
- Irvine, A. S., Guest, J. R.** (1993) *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family. Nucleic Acids Research 21: 753.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E.** (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 357: 1076-1079.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T.** (1998) Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. International Journal of Food Microbiology 40: 169-175.
- Körner, H., Sofia, H. J., Zumft, W. G.** (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS Microbiology Reviews 27: 559-592.
- LaPointe, G., Atlan, D., Gilbert, C.** (2008) Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. BMC Biochemistry 9: 10.
- Lebeer, S., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Shen, C., Lambrichts, I., Ceuppens, J. L., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C.** (2008) Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Applied and Environmental Microbiology 74: 4711-4718.
- Lebeer, S., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C.** (2010) Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. Microbial biotechnology 4: 368-374.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Vélez, M. P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C.** (2007) Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Applied and Environmental Microbiology 73: 6768-6775.
- Luesink, E. J., Van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P., De Vos, W. M.** (1998) Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. Molecular Microbiology 30: 789-798.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D., Renault, P.** (2007) Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in

- Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. Journal of Bacteriology 189: 1351-1357.
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., Paton, J. C.** (2003) Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Bacteriology 185: 3009-3019.
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., Morona, R.** (2000) Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Microbiology 35: 1431-1442.
- Muscariello, L., Marasco, R., De Felice, M., Sacco, M.** (2001) The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology 67: 2903-2907.
- Nakajima, H., Suzuki, Y., Hirota, T.** (1992) Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. Journal of Food Science 57: 1327-1329.
- O'Sullivan D, J., Klaenhammer, T. R.** (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology 59: 2730-2733.
- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., Roy, D.** (2005) Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. Microbiology 151: 1839-1851.
- Pham, P., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J.** (2000) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. Applied and Environmental Microbiology 66: 2302-2310.
- Platteeuw, C., Simons, G., De Vos, W.** (1994) Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 60: 587-593.
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P., Martin-Verstraete, I.** (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 181: 6889-6897.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C. G.** (2005) Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science 88: 843-856.

- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P.** (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12: 163-171.
- Simon, D., Chopin, A.** (1988) Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70: 559-566.
- Stingele, F., Vincent, S. J., Faber, E. J., Newell, J. W., Kamerling, J. P., Neeser, J. R.** (1999) Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology* 32: 1287-1295.
- Van Calsteren, M.-R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., Roy, D.** (2002) Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal* 363: 7.
- Van de Guchte, M., Van der Vossen, J., Kok, J., Venema, G.** (1989) Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 224-228.
- Van Den Berg, D., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J., Ledebor, A. M., Verrips, C. T.** (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2840-2844.
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Farnworth, E., Matar, C.** (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* 36: 254-260.
- Vuyst, L., Degeest, B.** (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 153-177.
- Zocco, M., Dal Verme, L. Z., Cremonini, F., Piscaglia, A., Nista, E., Candelli, M., Novi, M., RIGante, D., Cazzato, I., Ojetti, V.** (2006) Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23: 1567-1574.

Chapitre 3

Un commutateur de la phosphorylation de tyrosine contrôle l'interaction entre la co-polymérase Wzd et la tyrosine kinase Wze chez *Lactobacillus rhamnosus*

A tyrosine phosphorylation switch controls the interaction between the co-polymerase Wzd and the tyrosine kinase Wze of *Lactobacillus rhamnosus*

Résumé

Le rôle de la protéine auxiliaire co-polymérase dans le complexe de polymérisation pour la production de polysaccharides extracellulaires n'est pas bien compris. Les trois séquences protéiques déduites des gènes *wzb*, *wzd* et *wze* de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 contiennent les motifs retrouvés dans les protéines correspondant respectivement à une tyrosine phosphatase, une co-polymérase et une tyrosine kinase. Il a été démontré que la protéine co-polymérase Wzd est phosphorylée sur ses résidus tyrosines et se lie avec la phosphotyrosine kinase Wze. La présence d'ATP interfère avec cette interaction. La protéine Wze réalise ainsi la phosphorylation de la/des tyrosine(s) de Wzd en plus de s'autophosphoryler.

Abstract

The role of the co-polymerase accessory protein is not well understood in the polymerization complex for the production of extracellular polysaccharides. Three protein sequences deduced from the *wzb*, *wzd* and *wze* genes from *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 contain motifs found in the corresponding proteins tyrosine phosphatase, co-polymerase and tyrosine kinase. The co-polymerase protein, Wzd, was found to be tyrosine phosphorylated and binds with the phosphotyrosine kinase Wze. The presence of ATP interferes with this interaction. The Wze protein thus carries out tyrosine phosphorylation of Wzd in addition to trans-phosphorylation of the tyrosine kinase itself.

1. Introduction

Polysaccharides secreted by Gram positive bacteria are synthesized by either a processive or a non-processive mechanism [1]. The Wzy-dependent non-processive mechanism involves the coordinated action of intracellular and membrane proteins with extracellular domains [1,2]. Inside the cell, glycosyltransferases use sugar nucleotides as substrates in order to assemble individual repeating units linked to a lipid carrier such as undecaprenyl-phosphate. When complete, each repeating unit is then transferred to the cell surface where the repeating units are assembled by a Wzy-dependent polymerization complex [1]. These polymers can then be covalently linked to the cell surface as capsules (CPS) in streptococci and staphylococci or released as exopolysaccharides (EPS) by lactic acid bacteria such as lactococci, streptococci or lactobacilli [2].

As components of the Wzy-dependent mechanism, the proteins proposed to be involved in controlling the chain length of surface polysaccharides include a protein tyrosine phosphatase (PTP), a protein tyrosine kinase (PTK) and a co-polymerase accessory membrane protein (PCP) [1,2]. In *Streptococcus pneumoniae*, three proteins with homologous functions named CpsB (PTP), CpsC (PCP) and CpsD (PTK) have been proposed to have a regulatory role in CPS polymerization and attachment [3]. Functional studies in *S. pneumoniae* have shown that CPS polymerization is regulated by reversible tyrosine phosphorylation events within the polymerization complex [4-6]. A stable complex consisting of CpsB, CpsC, CpsD and ATP is proposed to enhance capsule synthesis in *S. pneumoniae* strain D39 [5]. The amount of phosphorylated PTK is positively correlated with cell wall-attached capsule in *S. pneumoniae* strain D39 [4] and could also slow the rate of polysaccharide synthesis [3,7]. In this model, the transphosphorylation of the CpsD (PTK) requires the presence of the CpsC co-polymerase and dephosphorylation of CpsD is carried out by the phosphatase CpsB, which can also inhibit the phosphorylation of CpsD. Similar systems have been proposed for EPS elongation by *Lactococcus lactis* [8] and *Streptococcus thermophilus* [9]. Recent data suggests that the PCP/PTK complex plays a role in coordinating with cell wall growth by spatial regulation of capsule synthesis at the division septum in *S. pneumoniae* [10]. Furthermore, analogous chain length regulator protein Wzz is proposed to aid the Wzy polymerase by maintaining the nascent

polysaccharide chain in a conformation conducive to continuing polymerization [11].

The function of the complete polymerization complex and the precise role of each protein are not yet clearly understood, and may in fact differ among strains and species. Our previous work has shown the phosphatase activity of Wzb from *L. rhamnosus* ATCC 9595 [12]. In the present study, the purification of the three proteins (Wzb, Wzd, Wze) is described and their interactions are demonstrated *in vitro*. This work shows tyrosine phosphorylation of the co-polymerase Wzd from *L. rhamnosus* ATCC 9595 and the impact of this phosphorylation on its interaction with the tyrosine kinase Wze.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth condition

L. rhamnosus strain ATCC 9595 was grown without agitation at 37 °C in MRS medium [13]. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in low salt Luria Bertani (LB) medium with agitation. For *E. coli* transformants, ampicillin was added at 100 µg/ml.

2.2 Plasmid construction and verification

PCR was performed using standard conditions [14] with *Taq* Polymerase (Promega) and the primers listed in Table 3.1 specific for the *wzb*, *wzd* and *wze* sequences from *L. rhamnosus* strain ATCC 9595 (GenBank Acc. No. AY659976) [15]. The amplicons were ligated to the vectors pQE30 and pGEX-6-P and *E. coli* was transformed with the resulting recombinant plasmids. The inserts of selected constructs were confirmed by sequencing with an ABI Prism 3100 apparatus.

Table 3.1 Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotide primers.

Strain, plasmid, or primer	Relevant characteristic(s) or sequence (5' to 3')	Source, reference or target
Strains		
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	Low EPS-producing strain (116 mg/L)	ATCC ¹
<i>E. coli</i> NM522	Cloning host (<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5</i> (rK ⁻ mK ⁻) [F' <i>proAB lacI^aZΔM15</i>])	Stratagene ¹
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Expression host (B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i>)	EMD Chemicals
<i>E. coli</i> C41	Expression host derived from BL21	[24]
Plasmids		
pQE30	His-tag fusion protein expression vector; Cm ^r , Am ^r	Qiagen ¹
pQE31	His-tag fusion protein expression vector; Cm ^r , Am ^r	Qiagen ¹
pGEX-6P-3	GST fusion protein expression vector	Amersham Biosciences ¹
pGSTWze	779 bp digested PCR fragment (<i>wze</i>) cloned into the <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I site of pGEX-6P-3	GST-tag Wze; This study
pQEWzd	912 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I digested PCR fragment (<i>wzd</i>) cloned into the <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I site of pQE30	His-tag Wzd ; This study
pQEWze	819 bp digested PCR fragment (<i>wze</i>) cloned into the <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site of pQE31	native Wze ; This study
pQEWzb	805 bp <i>Sst</i> I- <i>Kpn</i> I digested fragment (<i>wzb</i>) from pCRB cloned into the <i>Sst</i> I- <i>Kpn</i> I site of pQE31	native Wzb ; This study
Primers²		
WzdSBamI	CGg gat ccA TTG ACC TTG CAC GAC TTT GG	Wzd
WzdRXhoI	CCG ctc gag TAC TTA AAC GCG TCT CCG GC	Wzd
WzeSBamI	CGg gat ccT CAT TAG AGA AAA TTT TGC ATA GAC	Wze
WzeRXhoI	CCG ctc gag GAC AGT TAG AAG CGC ATG CT	Wze
WzbSEcoI	Gga att cGA TTG ATG TGC ATT GCC ATA TG	Wzb
WzbRXhoI	CCG ctc gag TAC CTT AAT ACC GCG ACA ACA AAC	Wzb
WzeRhamS	CGg gat cca GAC GCG TTT AAG TAT TGA GGA G	Wze
WzeRhamR	CCC aag ctt TGA CAG TTA GAA GCG CAT GC	Wze

¹ ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ; Qiagen S.A. (Courtaboeuf, France) ; Stratagene (LaJolla, CA, USA); Amersham Biosciences (Orsay, France).

² Restriction sites in primers are indicated in lower case letters.

2.3 Production and purification of native and fusion proteins

An overnight culture was diluted 100-fold with fresh LB broth supplemented with ampicillin, which was incubated at 37 °C with shaking until A_{600} reached 0.5 to 0.6. Induction was initiated by adding IPTG to 1 mM and incubation continued for 3 h with shaking at 37 °C. Cells were centrifuged at 18,000 x g for 20 min at 4 °C and the pellet was suspended in 15 ml STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA) containing 200 µg/ml lysozyme. After 10 min incubation on ice, the cells were sonicated (40 W, 5 min) and then centrifuged at 18,000 x g for 20 min at 4 °C [16]. The cell pellet was suspended in 2 ml ST buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM ZnCl₂ and 20 mM β-mercaptoethanol) containing 10 % sarcosyl and incubated overnight at 4 °C [17]. The resulting suspensions of proteins were diluted 10 times with PBS (phosphate-buffered saline). The 20 ml suspension of His₆-Wzd was added to 1 ml Ni²⁺-NTA-agarose resin (Qiagen) with 20 mM imidazole. Batch binding was carried out overnight (18 h) with gentle stirring at 4 °C. When needed to ensure complete dephosphorylation, a 0.3 ml aliquot of resin-bound His₆-Wzd was treated with 600 U YOP protein tyrosine phosphatase (YOP PTP, New England BioLabs) at 30°C for 3 h, then inactivated by heat (65 °C for 1 h). YOP-treated and untreated aliquots (0.3 ml) were then transferred to columns and washed 3 times with PBS containing 20 mM imidazole.

For proteins without any tag, the cell pellet from 100 ml of induced culture was suspended in 15 mL PBS (pH 7.3) then incubated for 20 minutes at 25 °C with 200 µg/ml lysozyme. Lysis was completed by two passages on a French Press (138 MPa, 6 °C) followed by centrifugation at 18,000 x g 15 min, then the pellet was washed three times with PBS containing 5 % Triton X-100 and 2 M urea, followed by two washes with PBS. The washed pellet was suspended in 5 ml PBS containing 2 % sarcosyl then proteins were precipitated by adding 7.5 ml acetone followed by centrifugation for 30 min at 18 000 x g. Sarcosyl was eliminated by two washes with 2.5 ml 70 % ethanol then the pellet was suspended in 1 ml PBS containing 5 mM MgCl₂ and 1 mM DTT.

2.4 Protein-protein interaction assay

The *in vitro* protein interaction was carried out by His-pull down assay. Either 1 ml of purified Wze or 10 ml of diluted cell lysate of GST-Wze with 20 mM imidazole were added to an aliquot (300 μ l) of the resin-conjugated His₆-Wzd and incubated overnight (18 h) with stirring at 4 °C. In some samples, either 200 μ M or 10 mM ATP (Sigma) was added. The protein mixtures were then transferred to a column and washed with PBS containing 20 mM imidazole. When necessary, elution was carried out with 1 M imidazole.

2.5 Phosphotyrosine protein detection by Western blot

The proteins were separated by SDS-PAGE and transferred by semi-dry electroblotting onto polyvinylidene difluoride membrane. Phosphotyrosine protein detection was carried out with primary antibodies: the membrane blots were incubated overnight at 4 °C using a 1:1,000 dilution of mouse monoclonal IgG anti-phosphotyrosine 4G10 antibody (Millipore), then incubated for 1 h with 1:20,000 dilution of secondary antibody (goat anti mouse IgG) coupled with horseradish peroxidase (HRP) (Millipore). Supersignal substrate (Thermo scientific) was used for HRP detection and visualised by exposure to Amersham Hyperfilm ECL (GE).

3. Results

Details of comparative sequence analysis of Wzb, Wzd and Wze can be found in the Supplementary Material.

3.1 Expression and purification of His₆-Wzd, native and GST-Wze and Wzb

Overexpression of the 34 kDa His₆-Wzd protein from *L. rhamnosus* ATCC 9595 was achieved in IPTG-induced *E. coli* strain NM522 carrying pQEWzd (data not shown), but a

higher level of production could be attained using strain BL21 (DE3) or C41 (Fig. 3.1 A). Purified His₆-tagged Wzd was eluted as a single band of the predicted molecular mass (Fig. 3.1 A). An acceptable level of Wzb and Wze proteins was obtained in *E. coli* strain NM522 carrying either pQEWzb (Fig. 3.1 B) or pQEWze. Purified native Wzb was eluted as a single band of the predicted molecular mass (Fig. 3.1 B). An adequate level of GST-Wze protein was obtained using *E. coli* strain C41 or BL21 (DE3) carrying pGSTWze (Fig. 3.1 B).

3.2 Tyrosine phosphorylation of His₆-Wzd and GST-Wze

The purified His₆-Wzd expressed in *E. coli* BL21 (DE3) was shown to be in tyrosine phosphorylated form with recognition by the anti-phosphotyrosine antibody in the absence of added ATP (Fig. 3.2 C). On the other hand, when purified after expression by strain C41, the similar amount of His₆-Wzd was not phosphorylated after incubation either with or without ATP (Fig. 3.2 D). However, the anti-phosphotyrosine antibody detected GST-Wze in cell lysates of *E. coli* C41 (Fig. 3.2 E). In the presence of 10 mM ATP, the level of phosphorylated GST-Wze protein was not higher than in the absence of ATP. As a control, GST expressed alone was not detected by the phosphotyrosine antibody.

3.3 Interaction of His₆-Wzd with Wzb and Wze

Native Wzb and Wze were tested for their affinity to His₆-Wzd as these native forms were not retained by the nickel column matrix. The results showed that Wzb was eluted during washing, and thus was not retained by association with His₆-Wzd, suggesting that no stable interaction was present between these two proteins (data not shown). Wze was able to interact strongly enough with Wzd to be retained using the same washing conditions (Fig. 3.3 A). In contrast, Wze protein was released in each of three washing steps (Fig. 3.3 B), when 200 μM ATP was added to the washing solution after interaction between His₆-Wzd and Wze. After washing, only a small quantity of Wze remained with His₆-Wzd. Moreover, using the anti-phosphotyrosine antibody, the Wzd protein was revealed to be tyrosine-

phosphorylated (Fig. 3.3 C).

GST-Wze also did not bind to the Ni²⁺ resin in the absence of His₆-Wzd (data not shown). A cell lysate of *E. coli* pGSTWze was passed through a column containing purified His₆-Wzd expressed by either *E. coli* BL21 (His₆-Wzd_{BL21}) or C41 (His₆-Wzd_{C41}) and bound to the Ni²⁺ resin (Fig. 3.4). GST-Wze was retained by His₆-Wzd_{BL21}, both in the presence and absence of 10 mM ATP (Fig. 3.4 A). There was no distinguishable change of tyrosine phosphorylation of His₆-Wzd_{BL21} in the presence of ATP after the interaction (Fig. 3.4 B). GST-Wze was also retained by dephosphorylated His₆-Wzd_{C41}, in the presence and absence of 10 mM ATP while YOP PTP was retained as well (Fig. 3.4 C). In the presence or absence of ATP, His₆-Wzd_{C41} on the resin with GST-Wze was not phosphorylated (Fig. 3.4 D). GST-Wze showed slightly more phosphorylated protein in the presence of ATP, but the difference does not appear significant and there was no discernible change in phosphorylation before and after the interaction with His₆-Wzd.

In contrast, the phosphorylation state of GST-Wze in the wash fractions was very different from that bound to His₆-Wzd. For the same amount of protein (Fig. 3.5 A, lanes 1, 2 and 3), GST-Wze was found in the wash fraction with a high phosphorylation level (Fig. 3.5 B, lanes 7, 8 and 9), after interacting with His₆-Wzd_{BL21} in the presence of ATP. For the same amount of protein (Fig. 3.5 A, lanes 4 to 6), the phosphorylated GST-Wze signal in the wash fraction was much lower (Fig. 3.5 B, lanes 10 to 12) in the absence of ATP. There appears to be some phosphorylated Wze retained by Wzd, but the highly phosphorylated Wze did not bind strongly to Wzd. After interacting with His₆-Wzd_{C41}, GST-Wze was washed out of the resin, and the low level phosphorylation does not appear to significantly differ in the presence or absence of ATP (Fig. 3.5 C and 6D).

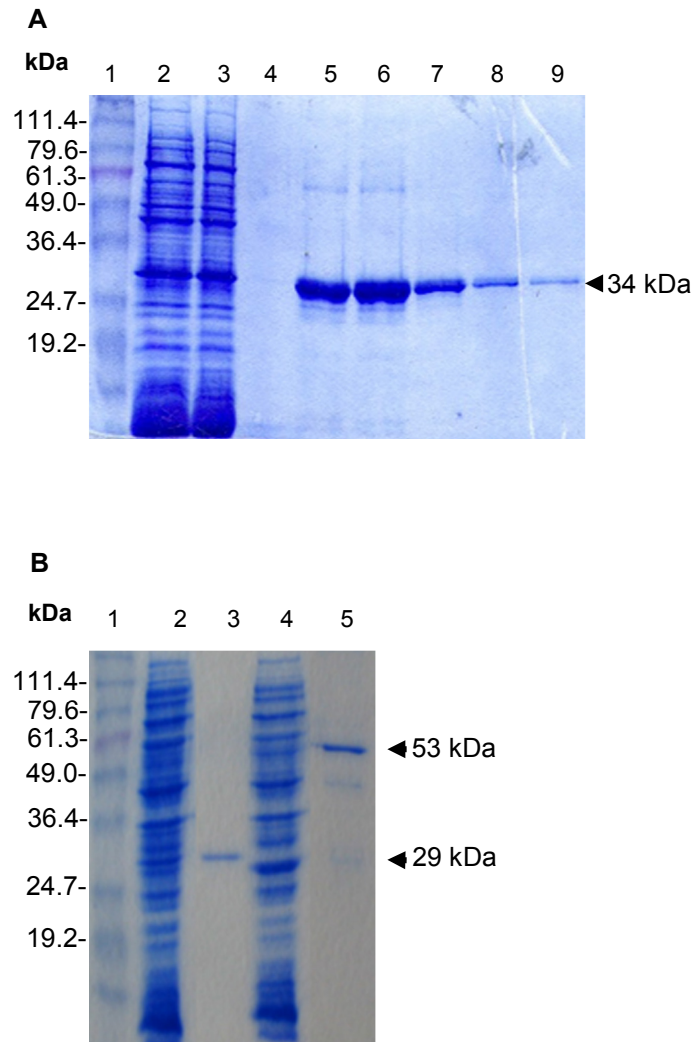


Figure 3.1 SDS-PAGE of induced cell extracts and purified Wzd, Wzb and GST-Wze.

(A) 34 kDa His₆-Wzd fusion protein purification by affinity chromatography from *E. coli* C41 (pQEWzd) IPTG-induced culture lysate. Lane 1: BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Lane 2: The flow through contains proteins not retained by the Ni column. Lanes 3 and 4: fractions from first and last column washes, respectively; Lane 5-9: fractions from the elution steps. (B) Wzb and GST-Wze purified from IPTG-induced culture lysates of *E. coli* NM522 (pQEWzb) and *E. coli* BL21 (pGSTWze) Lane 1: BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen); Lanes 2 and 4: lysed culture supernatant; lanes 3 and 5: purified Wzb (29 kDa) and GST-Wze (53 kDa) proteins.

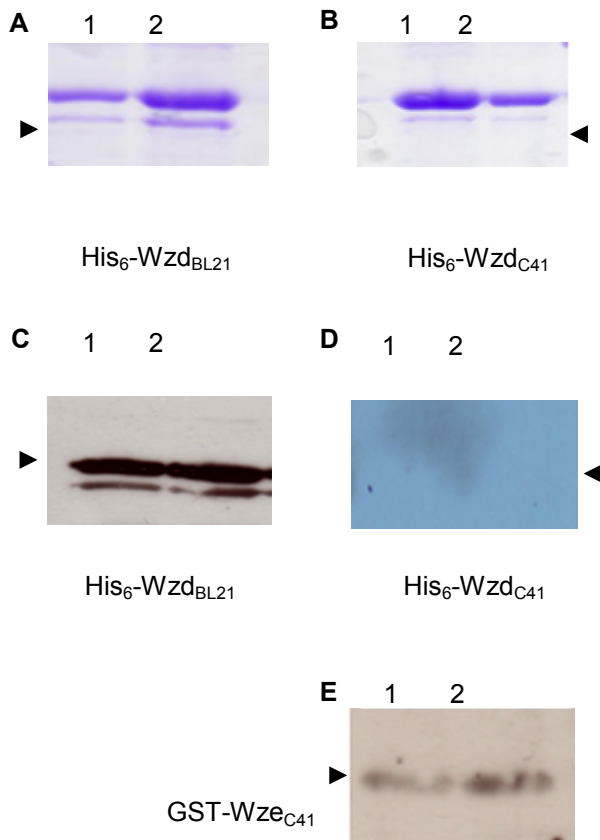


Figure 3.2 Western immunoblot of the phosphorylation state of His₆-Wzd and GST-Wze proteins expressed in *E. coli*, probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody.

Coomassie stained 12 % SDS-PAGE gel of His₆-Wzd expressed in *E. coli* BL21 (A) and C41 (B) incubated with 10 mM ATP (Lane 1) and without ATP (Lane 2). (C) Detection of tyrosine phosphorylated His₆-Wzd expressed in *E. coli* BL21 and incubated with 10 mM ATP (Lane 1) and without ATP (Lane 2). (D) Detection of tyrosine phosphorylated His₆-Wzd expressed in *E. coli* C41 and incubated with 10 mM ATP (Lane 1) and without ATP (Lane 2). (E) Detection of tyrosine phosphorylated GST-Wze expressed in *E. coli* C41 incubated with 10 mM ATP (Lane 1) and without ATP (Lane 2).

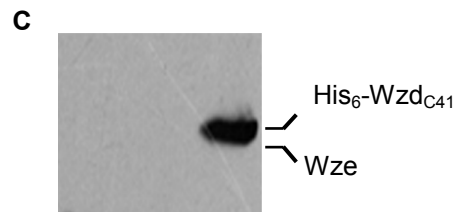
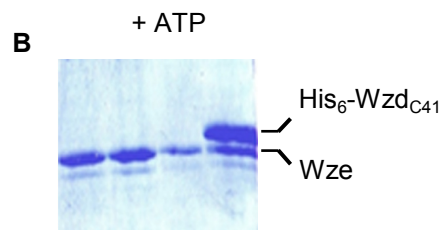
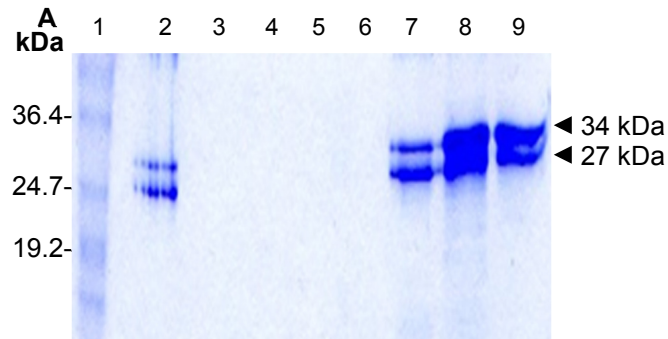


Figure 3.3 *In vitro* interaction assay between resin-bound His₆-Wzd_{C41} (34 kDa) and native Wze (27 kDa) proteins.

(A) Lane 1 contains the BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen). The two proteins were incubated together in a 1 : 1 ratio with the Ni²⁺ charged resin for 4 h at 16 °C (Lane 2 on A in 2.5 ml buffer B1 containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaH₂PO₄, 50 mM imidazole, 1 % Triton, 5 mM MgCl₂). Lanes 3 to 6 : 5 ml wash fractions with buffer B1 on A and B (in B, wash fractions in lanes 4 to 6 were obtained from samples to which 200 μM ATP were added). Lanes 7 to 9 : elution of 1 ml fractions using buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaH₂PO₄, 1 M imidazole, 1 % Triton, 5 mM MgCl₂, 2 % sarcosyl. (C) Western blot of Gel B, detection was carried out using anti-phosphotyrosine antibody.

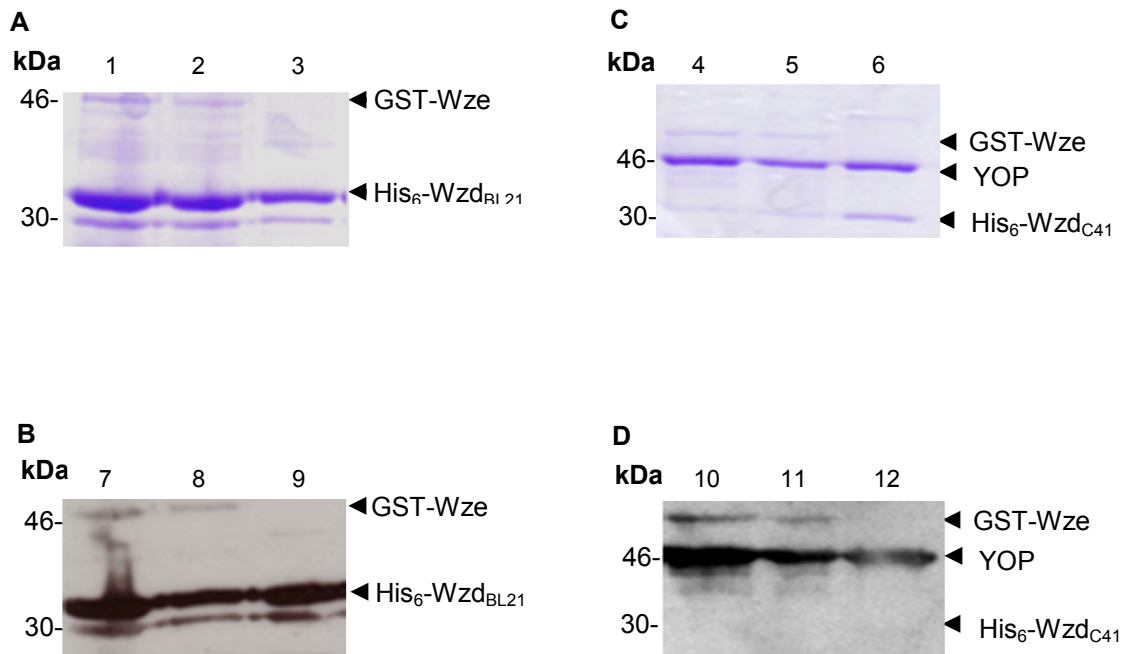


Figure 3.4 *In vitro* interaction assays between His₆-Wzd (34 kDa) and GST-Wze (53 kDa) proteins.

His₆-Wzd bound to Ni²⁺ charged resin was incubated with the cell lysate of GST-Wze in the presence of 10 mM ATP (lanes 1, 4, 7 and 10) or absence of ATP (lanes 2, 5, 8 and 11). Lanes 3, 6, 9 and 12 contain native His₆-Wzd alone on the Ni²⁺ resin. Interaction of GST-Wze with His₆-Wzd expressed by *E. coli* BL21: (A) Coomassie stained 12 % SDS-PAGE gel and (B) Western blot probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. Interaction of GST-Wze with resin-bound His₆-Wzd expressed by *E. coli* C41: (C) Coomassie stained 12 % SDS-PAGE gel and (D) Western blot probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody.

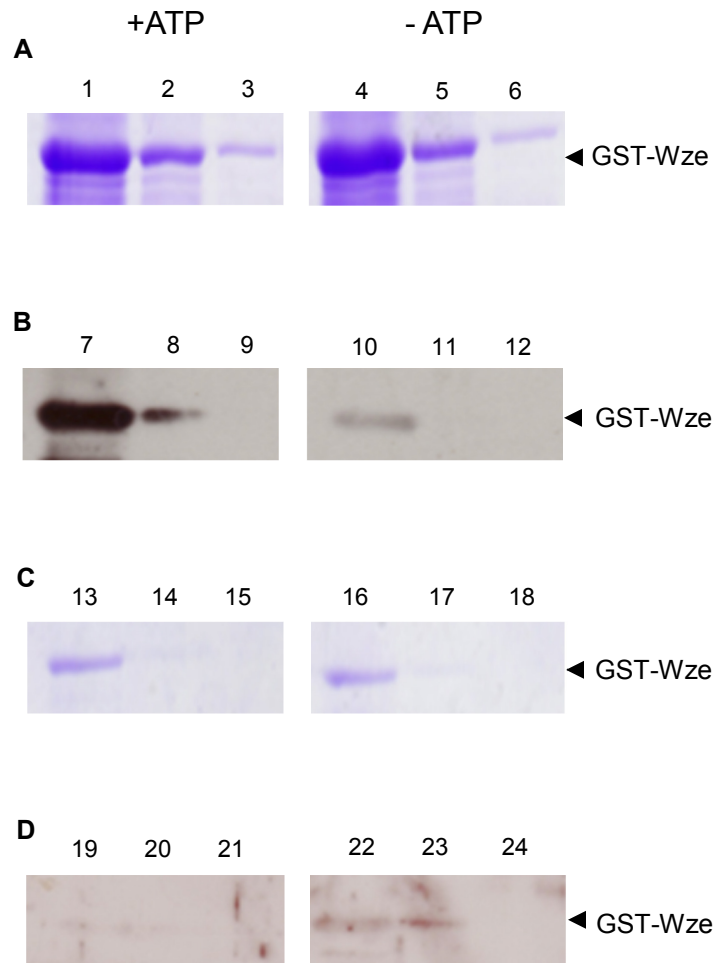


Figure 3.5 Detection of tyrosine phosphorylated GST-Wze released in the wash fractions.

GST-Wze in wash fractions in the presence of 10 mM ATP (1-3 and 7-9) and absence of ATP (4-6 and 10-12) from interaction of GST-Wze with resin-bound His₆-Wzd expressed by *E. coli* BL21: A) Coomassie stained 12 % SDS-PAGE gel and B) Western blot probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. GST-Wze in wash fractions in the presence of 10 mM ATP (13-15 and 19-21) and absence of ATP (16-18 and 22-24) from interaction of GST-Wze with His₆-Wzd expressed by *E. coli* C41: C) Coomassie stained 12 % SDS-PAGE gel and D) Western blot probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody.

4. Discussion

Using genes from *L. rhamnosus* ATCC 9595 whose protein products may play a role in the control of EPS polymerization at the cell surface, three proteins, namely Wzb (phosphatase), Wzd (co-polymerase) and Wze (phosphotyrosine kinase), were produced in an *E. coli* expression system. The goal of this work was to obtain protein fractions that could be used for examining protein interactions *in vitro*.

While GST-Wze was slightly phosphorylated in all *E. coli* host strains, the tyrosine phosphorylation of His₆-Wzd depended on the strain of *E. coli* used for expression. The level of phosphorylation of these two proteins did not change when ATP was added. Phosphorylation of His₆-Wzd may be carried out by a PTK of *E. coli* BL21 (DE3), as was observed in studies of other proteins [18]. UDP-glucose dehydrogenase YwqF from *B. subtilis* was phosphorylated by PTK Wzc from *E. coli*, showing that Gram negative PTK is capable of phosphorylating proteins from Gram positive species. Wze possesses a tyrosine in a similar position as the tyrosine 569 implicated in autophosphorylation of Wzc (PTK) in *E. coli* [19]. The autophosphorylation of tyrosine 569 did not occur without the N-terminal domain of Wzc, which is similar to the co-polymerase from Gram positive bacteria [20]. Thus, initial phosphorylation of GST-Wze implies that the presence of the GST tag may play a role as co-polymerase or that a protein of *E. coli* carries out tyrosine phosphorylation. Although serine phosphorylation of GST has been demonstrated previously [21], no tyrosine phosphorylation of GST itself was detected in our study. GST may, however, possibly be phosphorylated by Wze. Nevertheless, there is no evidence of higher phosphorylation when GST-Wze is expressed alone, although the kinase has phosphorylation activity. This means that the Wzd co-polymerase is required for higher levels of phosphorylation of the Wze kinase, as described by Bender [5].

The results of this study show that no strong protein association was formed between Wzb and Wzd, while Wze interacts with phosphorylated as well as non-phosphorylated Wzd. When only slightly phosphorylated, GST-Wze did not affect the phosphorylation of Wzd, while Wzd was phosphorylated after interaction with non-phosphorylated Wze. This result shows that non-phosphorylated Wze is able to phosphorylate Wzd. In the presence of

10 mM ATP, the unbound Wze was highly phosphorylated after interaction with phosphorylated Wzd, whereas Wze released from interaction with non-phosphorylated Wzd was not changed. The phosphorylation state of Wze retained with Wzd on the resin did not change after the interaction, regardless of the phosphorylation state of Wzd. These results show that phosphorylated Wzd and ATP are necessary to attain a higher phosphorylation state of Wze and phosphorylated Wze does not remain in close association with phosphorylated Wzd.

Cefalo [22] detected the interaction between Wzd (co-polymerase accessory protein) and Wze (tyrosine kinase) in *S. thermophilus* and previous work done in *S. pneumoniae* [7] showed that CpsC/CpsD (accessory/kinase) complex formation is necessary to detect tyrosine phosphorylated CpsD (kinase). Our work shows evidence for this complex formation in *L. rhamnosus* and for kinase phosphorylation as well. However, to our knowledge, no previous study detected the phosphorylation of the co-polymerase protein in other Gram-positive bacterial species. The co-polymerase has been considered as the accessory protein for the phosphorylation of the tyrosine kinase. A previous study observed that the C-terminal cytoplasmic domain of CapA (co-polymerase) was essential for phosphorylation of CapB (kinase) in *Staphylococcus aureus* [23]. EPS was not produced after deletion of EpsC (co-polymerase) in *S. thermophilus* CNRZ1066 [9]. The Wzd accessory protein could be involved in the production of EPS as proposed for EpsC. Indeed, several mutations occurring in the CpsC co-polymerase of *S. pneumoniae* lead to defective cell wall attachment of CPS [3]. These include two tyrosine mutations yielding a mucoid colony phenotype.

Our study shows that the activity of Wzd is also modulated through tyrosine phosphorylation, allowing the autophosphorylation of Wze. This new information suggests that further modification of the model for the control of EPS elongation can be proposed (Fig. 3.6). The non-phosphorylated complex may allow polysaccharides to be released instead of attached to the cell wall. When Wze phosphorylates Wzd, interaction of Wzd with the polymerase may promote polysaccharide elongation [11]. Destabilization of the protein interaction between Wzd and Wze liberates Wze to interact with other non-phosphorylated Wzd or Wze proteins. When Wzd is phosphorylated and ATP is present, a

transitory interaction allows Wze to auto-phosphorylate or transphosphorylate other Wze proteins, possibly slowing polymerization and leading to the attachment of polysaccharide to the cell wall if a ligase is present. Future experiments will focus on the role of the Wzb phosphatase in complex formation or dissociation, the relationship between the Wzd/Wze complex formation and EPS polymerization as well as the interaction of other proteins with this complex, including interactions of the polymerization complex with the proteins involved in synthesizing and transporting the repeat units. This approach will contribute to determining their function in modulating the biosynthesis of exopolysaccharides on the surface of *L. rhamnosus*.

5. Acknowledgments

This work was supported by a NSERC (Natural Sciences and Engineering Council of Canada) discovery grant awarded to GL.

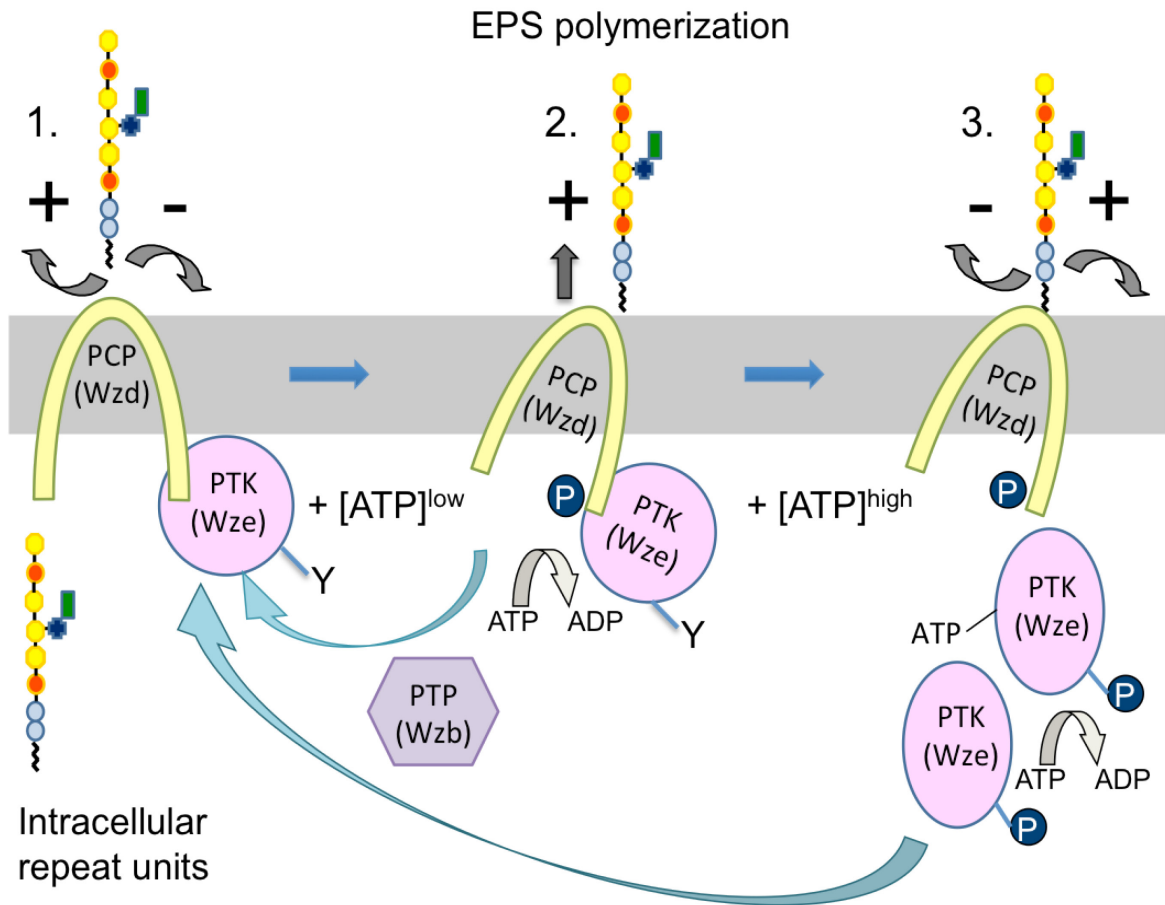


Figure 3.6 Model proposed for the tyrosine switch controlling EPS polymerization and attachment.

1. Non-phosphorylated Wzd and Wze interact by forming a complex leading to release of EPS (+) rather than attachment (-). 2. In the presence of ATP, Wze phosphorylates Wzd, allowing chain elongation by the polymerase (+). This phosphorylation of Wzd destabilizes the protein interaction with Wze, allowing Wze to either bind with other non-phosphorylated Wzd proteins, or undergo auto- or trans-transphosphorylation. 3. A transitory interaction between phosphorylated Wzd and Wze in the presence of ATP is necessary for the phosphorylation of Wze, possibly allowing the attachment of polysaccharide to the cell wall (+). Phosphatase activity of Wzb for dephosphorylating Wzd and Wze would return the cycle to the non-phosphorylated Wzd/Wze complex that allows release of polysaccharide polymers (+).

6. References

- [1] Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 563-581.
- [2] De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 687-707.
- [3] Morona, J.K., Morona, R. and Paton, J.C. (2006). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8505.
- [4] Bender, M., Cartee, R. and Yother, J. (2003). Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185, 6057-6066.
- [5] Bender, M. and Yother, J. (2001). CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 276, 47966-47974.
- [6] Morona, J.K., Paton, J.C., Miller, D.C. and Morona, R. (2000). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 35, 1431-1442.
- [7] Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C. and Paton, J.C. (2003). Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185, 3009-3019.
- [8] Groot, N. and Kleerebezem, M. (2007). Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2645-2656.
- [9] Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J.M., Mercier, G., Ehrlich, D. and Renault, P. (2007). Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J. Bacteriol.* 189, 1351-1357.
- [10] Henriques, M.X., Rodrigues, T., Carido, M., Ferreira, L. and Filipe, S.R. (2011).

- Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Mol. Microbiol.* 82, 515-534.
- [11] Kalynych, S., Valvano, M.A. and Cygler, M. (2012). Polysaccharide copolymerases: the enigmatic conductors of the O-antigen assembly orchestra. *Protein Eng. Des. Sel.* 25, 797-802.
- [12] LaPointe, G., Atlan, D. and Gilbert, C. (2008). Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochem.* 9, 10.
- [13] De Man, J., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 23, 130-135.
- [14] Sambrook, J. and Russell, D.W. (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York USA.
- [15] Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. and Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology* 151, 1839-1851.
- [16] Zhuo, Q., Piao, J., Wang, R. and Yang, X. (2005). Refolding and purification of non-fusion HPT protein expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 41, 53-60.
- [17] Tao, H., Liu, W., Simmons, B.N., Harris, H.K., Cox, T.C. and Massiah, M.A. (2010). Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques* 48, 61-64.
- [18] Mijakovic, I. *et al.* (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO. J.* 22, 4709-4718.
- [19] Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A.J. and Doublet, P. (2003). Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 278, 39323-39329.
- [20] Wugeditsch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummel-Smith, J., Forrester, C. and Whitfield, C. (2001). Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*

276, 2361-2371.

- [21] Rodriguez, P., Mitton, B. and Kranias, E.G. (2005). Phosphorylation of glutathione-S-transferase by protein kinase C- α implications for affinity-tag purification. *Biotechnol. Lett.* 27, 1869-1873.
- [22] Cefalo, A.D., Broadbent, J.R. and Welker, D.L. (2011). Protein–protein interactions among the components of the biosynthetic machinery responsible for exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* MR-1C. *J. Appl. Microbiol.* 110, 801-812.
- [23] Olivares-Illana, V. *et al.* (2008). Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol.* 6, e143.
- [24] Miroux, B. and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289-298.

7. Supplementary Material

7.1 Comparative sequence analysis of Wzb, Wzd and Wze

Among four strains of *L. rhamnosus* (ATCC 9595, RW-9595M, R, RW-6541M), Wzb is 100 % identical for three strains while for a one amino acid change (T53 to A) occurs for the Wzb of strain RW-6541M (GenBank Acc. No. AY659977) [1]. Phosphoesterase activity was predicted for Wzb, based on alignment of deduced amino acid sequences with PHP superfamily members (PHP domain, PF02811). Four conserved motifs of the PHP (polymerase and histidinol phosphatase) domain identified by Aravind & Koonin [2] were located in the amino acid sequence of Wzb. These motifs consist of conserved histidine and aspartic acid residues. Previous work [3] has demonstrated the phosphatase activity of Wzb.

Wzd is a 34 kDa protein coded by the 915 bp *wzd* gene located at the beginning of the gene clusters coding for EPS biosynthesis in *L. rhamnosus* ATCC 9595, just downstream of promoter P1 [1]. Hydrophobicity analysis predicts two transmembrane domains (amino acids 18 to 36 and 219 to 238, TMpredTM; Hofmann et Stoffel, 1993; http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), which were confirmed by SAPS (Statistical Analysis of Protein Sequences; Brendel *et al.*, 1992: http://www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS_form.html). In addition, this protein contains a coiled-coil region (not a leucine zipper) in the C-terminal intracellular region (amino acids 263 to 290). Comparison of the hydrophobicity profile of Wzd with that of CpsC from *S. pneumoniae* Rx1-19F (Fig. S1) suggests the function of co-polymerase. Comparison with similar proteins from other bacterial genera showed that Wzd corresponds to the N-terminal region of Wzc et ExoP, respectively from *E. coli* [4] et *S. meliloti* [5] and is an ortholog of EpsC from *S. thermophilus* as well as EpsA from *L. lactis*.

Wze is coded by the second gene of the locus responsible for EPS biosynthesis and is cotranscribed with *wzd*. The 753 bp *wze* gene codes for a 27 kDa protein that is predicted by TMpredTM to be cytoplasmic due to the absence of any transmembrane sequences. Wze has an ATP-binding site consisting of a Walker A sequence ([AG]X₄GK[ST] where X is any

amino acid and two Walker B sequences (hhhD, where h represents a hydrophobic amino acid) in the N-terminus and a C-terminus containing a tyrosine-rich region. The Walker A site is considered a common structural motif for prokaryotic protein kinases [6]. Finally, Wze has a tyrosine residue similar to the tyrosine 569 which was described as being implicated in autophosphorylation of Wzc in *E. coli* [7]. Alignment of this sequence with proteins proposed to have a role in polysaccharide production suggests that Wze would function as a protein tyrosine kinase, orthologous to CpsD from *S. pneumoniae* Rx1-19F, to EpsD from *S. thermophilus* Sfi6 and EpsB from *L. lactis* subsp. *cremoris* [8]. In addition, Wze corresponds to the C-terminus of the Wzc protein from *E. coli* [4] as well as ExoP from *S. meliloti* [5].

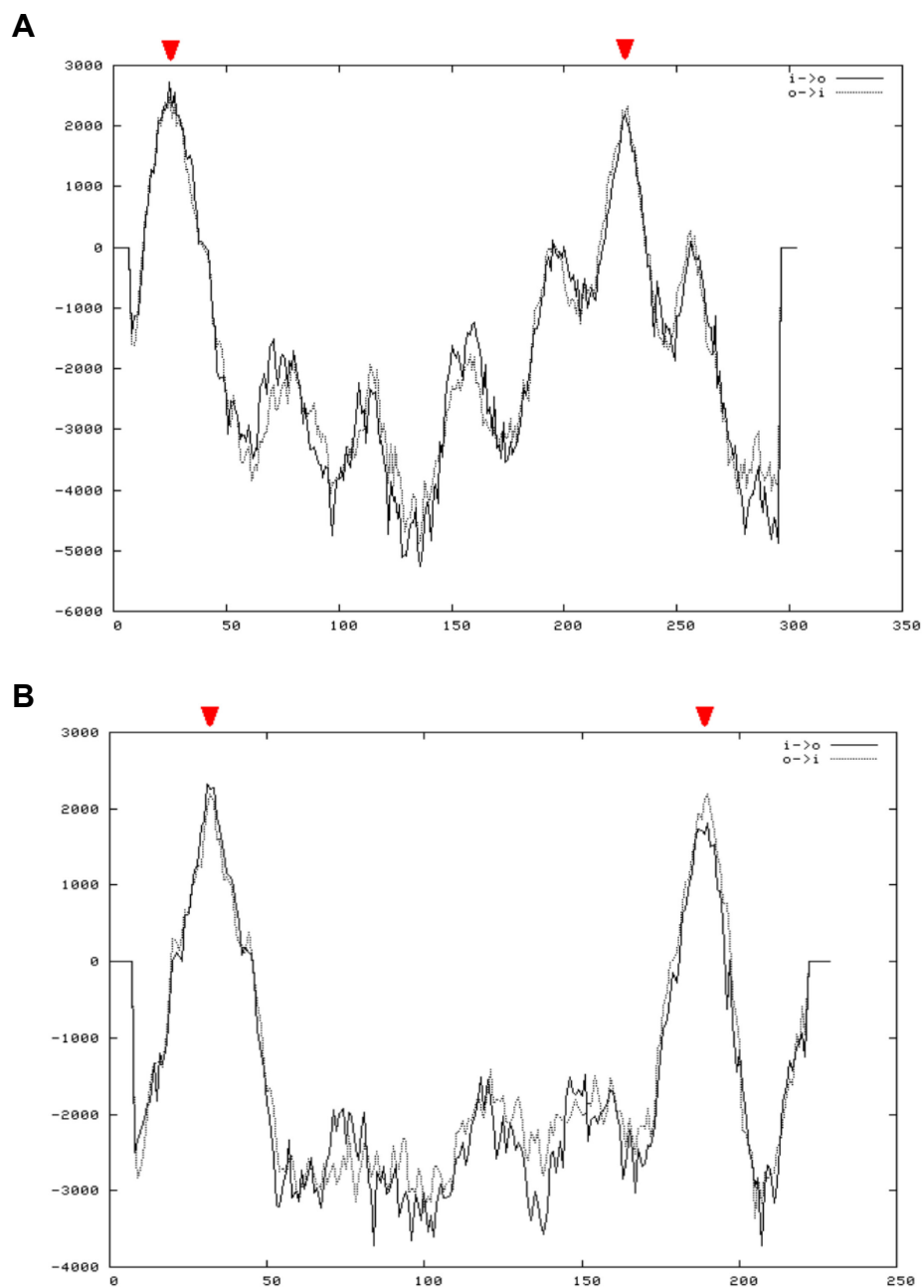


Figure S1. Comparison of transmembrane helix score plot of Wzd (A) from *L. rhamnosus* and CpsC19f (B) (GenBank Accession number U09239).

Arrows indicate transmembrane domains (TMS1, 2). Transmembrane prediction was carried out with TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Hofmann et Stoffel, 1993). The preferred orientation is in-out for TMS1 and out-in for TMS2.

7.2 References

- [1] Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. and Roy, D. (2005) Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology* 151, 1839-1851.
- [2] Aravind, L. and Koonin, E.V. (1998) Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res.* 26, 3746.
- [3] LaPointe, G., Atlan, D. and Gilbert, C. (2008) Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochemistry* 9, 10.
- [4] Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A.J. and Duclos, B. (1999) Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* 181, 3472.
- [5] Glucksmann, M., Reuber, T. and Walker, G. (1993) Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175, 7045.
- [6] Doublet, P., Vincent, C., Grangeasse, C., Cozzone, A. and Duclos, B. (1999) On the binding of ATP to the autophosphorylating protein, Ptk, of the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *FEBS Lett.* 445, 137-143.
- [7] Grangeasse, C., Doublet, P. and Cozzone, A.J. (2002) Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *J. Biol. Chem.* 277, 7127.
- [8] Morona, J.K., Paton, J.C., Miller, D.C. and Morona, R. (2000) Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 35, 1431-1442.

Chapitre 4

Discussion générale, conclusion et perspectives

Certaines souches de *Lactobacillus rhamnosus* ont montré la capacité de produire des EPS. Les souches sélectionnées pour cette étude sont les souches *L. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M. Bien que ATCC 9595 produise peu d'EPS, cette souche a un variant surproducteur RW-9595M qui possède un locus *eps* à plus de 99 % identique avec ATCC 9595. Dix-sept gènes potentiels impliqués dans la biosynthèse des EPS chez ces souches ont été identifiés dans une étude précédente (Péant *et al.*, 2005).

La présente étude visait à déterminer l'effet de la phosphorylation de la co-polymérase sur son interaction avec les deux autres protéines impliquées dans la biosynthèse d'EPS chez *L. rhamnosus*. En raison des difficultés associées à la transformation de *L. rhamnosus* et de la faible stabilité des mutants en résultant, les opérons EPS de *L. rhamnosus* ont été transférés chez *L. lactis*, un système d'étude beaucoup plus stable et facile à manipuler. Les opérons EPS provenant de deux souches de *L. rhamnosus*, ATCC 9595 et RW-9595M ou seulement les gènes *wzd*, *wze* et *wzb* dont les protéines produites sont une co-polymérase, une kinase et une phosphatase respectivement, qui peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la polymérisation des EPS, ont été transférés. L'utilité du système d'expression chez *L. lactis* réside dans l'analyse de la fonctionnalité des gènes et des protéines *in vivo*. De plus, ces trois gènes ont aussi été transférés chez *E. coli* pour produire et purifier les protéines dans le but d'effectuer des interactions *in vitro* en contrôlant les conditions, surtout la présence d'ATP. Par conséquent, l'objectif de cette étude consistait à évaluer l'impact des opérons EPS provenant de deux souches sur la production d'EPS par *L. lactis* et l'effet de la phosphorylation de la protéine Wzd, co-polymérase, sur les interactions entre les protéines responsables de la biosynthèse des EPS.

Les résultats obtenus par le transfert des opérons EPS ont permis de démontrer qu'il n'y a pas de différence entre les deux ensembles d'opérons sur la production d'EPS chez *L. lactis*. Ainsi, le métabolisme de la bactérie hôte (*L. rhamnosus*), potentiellement la glycolyse et la synthèse des sucres nucléotidiques utilisés comme précurseurs, serait en grande probabilité responsable de la différence de rendement entre les souches. C'est maintenant une preuve de concept pour un modèle pour les études fonctionnelles. Il était donc possible de faire les mutations des tyrosines de la co-polymérase et l'étude *in vivo* (chez *L. lactis*) ou *in vitro* (chez *E. coli*) sur les protéines. Par contre, le niveau de production des protéines est plus

faible chez *L. lactis* que chez *E. coli*, et ne peut pas être contrôlé par l'induction comme les constructions transférées chez *E. coli*. Cependant, certaines difficultés doivent être considérées pour la manipulation de constructions contenant des mutations qui changent la configuration originale des gènes (voir la section 1 pour une analyse plus approfondie).

Néanmoins, le transfert des opérons EPS a aidé à comprendre les facteurs qui peuvent influencer la biosynthèse des EPS et l'étude des protéines a prouvé la phosphorylation de Wzd. Cette étude propose une modification de l'interaction entre les deux protéines Wzd et Wze, ce qui permet la compréhension de la polymérisation des EPS par le mécanisme Wzy-dépendant.

1. Impact des facteurs génétiques sur la biosynthèse d'EPS

Une étude est en cours dans notre laboratoire sur la comparaison de l'expression globale des gènes entre la souche ATCC 9595 et RW-9595M par l'analyse RNA-seq. Les premiers résultats indiquent très peu de différences significatives au niveau transcriptomique entre ces deux souches (N. Mecheri, communication personnelle). De plus, il n'y a pas de différence de l'expression des gènes *eps* entre ces deux souches. Dans notre étude, il n'y avait pas de différence significative de la quantité d'EPS produits par deux mutants, *L. lactis* MG1363 (pEPS1R et pEPS2R) et (pEPS1A et pEPS2A). Ce résultat nous permet de proposer que le niveau d'expression des gènes *eps* ne cause pas de différences de production d'EPS entre la souche ATCC 9595 et RW-9595M.

Chez *L. johnsonii*, la tyrosine kinase putative, EpsC, est proposée comme facteur expliquant les différences entre les souches FI9785 et FI10386 - un mutant spontané de FI9785 (Horn *et al.*, 2013). La souche FI10386 produit un peu plus d'EPS en quantité (un phénotype de colonie plus opaque) et son adhésion à la lignée cellulaire HT29 a notamment été réduite à moins de 20 % par rapport au type sauvage. Les séquences protéiques des deux EpsC ne variaient que par un seul acide aminé, D88 (Figure 4.1), et la co-expression des deux kinases, *epsC* (type sauvage) et *epsC*^{D88N} (mutant spontané) a conduit à l'apparition des deux phénotypes simultanés : rugueux (type sauvage) et lisse (mutant).

Les gènes codant pour la co-polymérase Wzd sont identiques à 100 %, mais la séquence de la tyrosine kinase possède un acide aminé différent entre les deux souches RW-9595M et ATCC 9595 (Figure 4.1). Chez *L. johnsonii*, l'acide aminé variant (D88N) de EpsC est situé avant deux acides aminés d'un résidu aspartate (D90) qui peut être important pour l'activité ATPase (Horn *et al.*, 2013). Dans la présente étude, le résidu D88 se localise dans une région similaire à la région Walker B retrouvée dans Wze de *L. rhamnosus*. De plus, le résidu D88 semble équivalant au résidu d'aspartate qui participe à la stabilisation de network avec Mg^{2+} pour l'interaction entre le phosphate d'ADP et le P-loop de la kinase chez *Staphylococcus aureus* (Olivares-Illana *et al.*, 2008). Dans le cas de Wze, le résidu distinguant les deux souches suit une région Walker A. Cette différence n'a cependant pas entraîné de différences significatives dans la production d'EPS entre les transformants de *L. lactis* MG1363 exprimant les gènes *eps* provenant de l'une ou l'autre des deux souches de *L. rhamnosus*. Il apparaît donc que les différences dans les quantités d'EPS produites par les deux opérons de *L. rhamnosus* ne peuvent être associées aux différences de séquences de Wze.

La localisation des gènes *eps* peuvent expliquer les différentes quantités des EPS entre *L. lactis* transformés et *L. rhamnosus*. Les gènes *eps* étaient codés par des plasmides recombinants chez *L. lactis*, alors les opérons EPS sont codés par le chromosome chez *L. rhamnosus*. Il est possible que les gènes soient en multiples copies chez *L. lactis*, par rapport à une seule copie des gènes sur le chromosome de *L. rhamnosus*. La relation entre le nombre de copies et la production d'EPS a été démontrée chez *L. lactis* (Boels *et al.*, 2003). Cette étude précédente a démontré que la production d'EPS pourrait être directement corrélée positivement au niveau de l'expression du gène *eps*, car il y avait plus d'EPS lorsque les gènes codés par un plasmide étaient exprimés à un nombre de copies élevé. Dans notre étude, les plasmides à haut nombre de copies, pIL253 et pNZ124, ont été utilisés. Or, pIL253 présente 45-80 copies par cellule (Simon et Chopin, 1988). Les gènes *eps* dans ces plasmides chez *L. lactis* mutants pourraient induire la production de quantité d'EPS plus élevée que chez la souche parente ATCC 9595.

```

WzeR      MNFSLEKILHRHKE--DQETQKNGVMLVTFAEPKHVVSEQFRTVVRTNIEF  48
WzeA      MNFSLEKILHRHKE--DQETQKNGVMLVTFAEPKHVVSEQFRTVVRTNIEF  48

EpsC      MG-----LFNRRKKRGTDETMQYGAKLITLAKPQNPVSEQFRTVKTNIDF  45
EpsCD88N  MG-----LFNRRKKRGTDETMQYGAKLITLAKPQNPVSEQFRTVKTNIDF  45
          * .           : : * * * :   : * . * : * * : * : : * * * * * : * * * : *

          Walker A  A/GXXXXGKS/T           Walker B hhhD

WzeRW     AGAALDQCQVVMFTSSAMSEGKSKV SANVAVTWAQAGKKVLLIDADLRRP  98
WzeATCC   AGAALDQCQVVMFTSSAMSEGKSTV SANVAVTWAQAGKKVLLIDADLRRP  98

EpsC      TSVD-HQIKALAFTSANISEGKSTVTVNTAVTMAQSGKKVLLIDADLHRP  94
EpsCD88N  TSVD-HQIKALAFTSANISEGKSTVTVNTAVTMAQSGKKVLLINADLHRP  94
          : . . . * . * : : * * * : : * * * * . * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * *

WzeRW     TVHATFRTLNLNDGVTTVLVTGKEKP---DDVVEETFVDNMSIITSGPVPPN  145
WzeATCC   TVHATFRTLNLNDGVTTVLVTGKEKP---DDVVEETFVDNMSIITSGPVPPN  145

EpsC      TLHQTFDIPNRVGLTTILTSHSNEVDMADIVKEDIIPNLSIMPAGPIPPN  144
EpsCD88N  TLHQTFDIPNRVGLTTILTSHSNEVDMADIVKEDIIPNLSIMPAGPIPPN  144
          * : * * * * * * * * * * : : * : * * * * : : * : * * * : : * : * * * *

          Walker B hhhD

WzeRW     PSELLNSKRMAGLLEWAREKYDIIIVLDAPPVLAVSDVQVLVPKTDGVVVV  195
WzeATCC   PSELLNSKRMAGLLEWAREKYDIIIVLDAPPVLAVSDVQVLVPKTDGVVVV  195

EpsC      PAQLLGSNRMRAFLNMVKEHYDLVVLDDLAPVLEVSDTQILASEMDGVVVLV  194
EpsCD88N  PAQLLGSNRMRAFLNMVKEHYDLVVLDDLAPVLEVSDTQILASEMDGVVVLV  194
          * : : * * . * : * * * . : * : . : * : * * * : * * * * * . * : * . : * * * * *

WzeRW     ANMGKTLKGD LKRTVEVLKLANAKILGSVERVKAKHGDRG YGYGYGYGYG  245
WzeATCC   ANMGKTLKGD LKRTVEVLKLANAKILGSVERVKAKHGDRG YGYGYGYGYG  245

EpsC      VRQGV TQKAGIERAIEMLNLT KTHVLGYVMN-DVRTGPDG YGYGYGYGYG  243
EpsCD88N  VRQGV TQKAGIERAIEMLNLT KTHVLGYVMN-DVRTGPDG YGYGYGYGYG  243
          . . * * * . . : : * : * : * : * : * : * * * * * * . . . : * * * * * * * * * *

WzeRW     -----NESNK 250           * : Résidu identique
WzeATCC   -----NESNK 250           : : Substitution conservatrice

EpsC      YGYGY S QEKDTETK 257       . : Substitution semi-conservatrice
EpsCD88N  YGYGY S QEKDTETK 257       - : intervalle
          : . . . *

```

Figure 4.1 Alignement de la séquence de Wze (*L. rhamnosus*) avec la séquence de EpsC (*L. johnsonii*).

WzeRW de RW-9595M et WzeATCC de ATCC 9595 ont été comparées à EpsC de *L. johnsonii* F19785 et EpsC^{D88N} de la souche mutante F110386. Les motifs Walker A (GKT/S) et Walker B (hhhD) sont en surbrillance grise. Les régions riches en tyrosines sont encadrées et les tyrosines dans les régions sont bleues. Les différences d'acides aminés entre les deux Wze et entre les deux EpsC sont en surbrillance jaune. L'acide aminé impliqué dans la liaison de nucléotides de EpsC est souligné. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Le transfert des gènes EPS de *S. thermophilus* chez *L. lactis* MG1363 a entraîné la production d'un EPS de structure différente ($\rightarrow 3$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow pour *L. lactis* mutant par rapport à $\rightarrow 3$)[α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow pour *S. thermophilus* Sfi6) et de quantité différente (10 mg l⁻¹ pour *L. lactis* mutant par rapport à 100 mg l⁻¹ pour *S. thermophilus* Sfi6) (Stingele *et al.*, 1999). Cette étude suggère que les glycosyltransférases pourraient, selon l'organisme dans lequel elles se trouvent, avoir de multiples spécificités, que ce soit lorsque les précurseurs sont absents ou que les protéines déterminant la longueur de la chaîne polymérisent l'EPS de manière différente. Dans notre étude, les productions d'EPS variables entre *L. lactis* mutants et *L. rhamnosus* ont été observées. Notamment, les mutants ont produit plus que la souche parentale ATCC 9595, mais moins que le variant RW-9595M. Les opérons EPS de *L. rhamnosus* pourraient, comme pour *S. thermophilus*, en fonction de l'organisme hôte, présenter une multi-fonction ou présenter un mécanisme de polymérisation variable. De plus, il est possible que le métabolisme de *L. lactis* puisse fournir suffisamment de précurseurs afin de permettre production plus importante que la souche ATCC 9595, mais moins que chez le variant RW-9595M.

Les quatre gènes *rmlA-rmlD* étaient exclus du clonage, car *L. lactis* MG1363 a déjà ces gènes. Chez nos recombinants *L. lactis*, le dTDP-rhamnose peut être présent en quantité limitée. Donc, les EPS produits par ces recombinants peuvent avoir différents en structure de ceux produits par les souches *L. rhamnosus*. Une étude a présenté que la limitation de ce précurseur interfère dans la production de la paroi cellulaire et qu'il est important pour la biosynthèse des EPS, qui contiennent du rhamnose (Boels *et al.*, 2004). Lors de leur étude de l'effet de la limitation du dTDP-rhamnose sur la production des EPS., les résultats ont suggéré que le précurseur dTDP-rhamnose est préférentiellement utilisé pour la formation des polysaccharides des parois cellulaires plutôt que pour la production d'EPS. De plus, il y avait un changement de la proportion des sucres et de la masse moléculaire, lorsque les gènes *rmlBD* étaient mutés. L'EPS produit par le mutant était constitué de glucose, de galactose et de rhamnose en ratio molaire 1 : 0,3 : 0,2, par rapport au ratio 1 : 0,6 : 0,4 chez la souche sauvage. En plus, sa masse moléculaire était quatre fois plus élevée, malgré que le rayon de giration fût deux fois plus petit que celui de la souche sauvage. L'EPS produit

par le mutant est donc un polymère de plus grande taille et plus compact, probablement liée à sa structure modifiée.

Le modèle d'expression des gènes *eps* chez *L. lactis* serait utile à l'avenir pour caractériser l'impact des trois protéines, Wzd, Wze et Wzb, et pour évaluer l'effet de la phosphorylation de Wzd sur la biosynthèse des EPS. Cette étude contribue la preuve de concept que les gènes de *L. rhamnosus*, lorsque transférés à *L. lactis*, peuvent conférer le phénotype de production d'EPS lorsque la configuration originale des gènes est conservée lors du clonage. Il reste à démontrer si le phénotype peut être maintenu lorsque l'organisation originale des gènes est modifiée lors du clonage.

Le clonage de treize gènes dans les deux plasmides (pIL253 et pNZ124) a été réussi, car les transformants obtenus avec pEPS1 et pEPS2 ont été en mesure de produire des EPS. Les constructions pEPS1 et pEPS2 séparent les gènes *wzd* et *wze* de *wzb* sur deux plasmides, mais conservent la configuration originale des opérons provenant de *L. rhamnosus*. En vue de tester l'impact de modifications aux trois protéines sur la biosynthèse des EPS, il est nécessaire de réussir une construction rassemblant *wzd*, *wze* et *wzb* en un seul plasmide pour faciliter les délétions et les substitutions ciblées (Fig. 4.2). Cette construction a été réussie en utilisant le plasmide vecteur pMG36CT (chapitre 2).

Pour ensuite assurer l'expression du phénotype de production d'EPS, il faut compléter avec l'expression des gènes *welE* et *wzx* à *wzm* rassemblés sur un autre plasmide, ce qui ne maintient pas la configuration originale des gènes chez *L. rhamnosus* (Fig. 4.2). Plusieurs stratégies de clonage de ces neuf gènes ont été mises en oeuvre en utilisant les plasmides pIL253 (haut nombre de copies) et pIL252 (faible nombre de copies) (Simon et Chopin, 1988), mais sans succès.

La transcription des gènes, *wzd* à *wzm*, chez pEPS1 est initiée au niveau du promoteur P1 provenant de l'opéron original de *L. rhamnosus*. De plus, trois promoteurs de l'opéron original de *L. rhamnosus*, P3, P4 et P5 sont indispensables à la transcription des gènes, *welE*, *wzr* et *wzb* respectivement, dans pEPS2. Par contre, les plasmides pIL252 et pIL253 n'ont pas de promoteur, mais les gènes *wzx* à *wzm* ont été clonés en aval des gènes assurant la répllication du plasmide (*repD* et *repE*). L'expression de *repD* et *repE* pourrait donc

assurer l'expression de *wzx* à *wzm*, ce qui pourrait poser un problème en absence des protéines régulatrices. L'expression des gènes *wzd*, *wze* et *wzb* étaient sous contrôle du promoteur P32 de *Lactococcus*, dans pMG36CT. L'utilisation de promoteurs autres que les promoteurs originaux de *L. rhamnosus* pourrait causer des difficultés et donc interférer avec la récupération des gènes chez *L. lactis*.

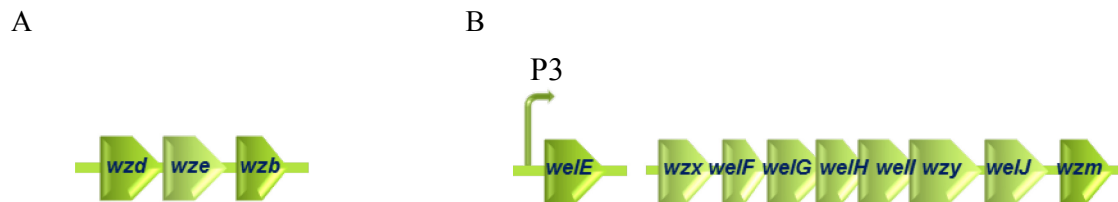


Figure 4.2 L'organisation du groupe de gènes de biosynthèse EPS de *L. rhamnosus*.

A) Trois gènes codant pour les protéines impliquées dans la polymérisation, clonés chez pMG36CT B) Neuf gènes (l'ensemble des gènes de groupe *eps*, sauf *rmlA-rmlD* (4 gènes), dont les gènes *wzx* à *wzm* sont clonés chez pIL253 avec le promoteur original P3 du gène *welE* de *L. rhamnosus*.

Cinq gènes de glycosyltransférase existent entre *wzx* à *wzm*. Ces protéines pourraient être létales chez *L. lactis* MG1363, lorsqu'elles s'expriment séparément des gènes *wzd* et *wze*. La surexpression des glycosyltransférases a conduit à l'inhibition de la croissance des ovocytes chez le hamster (Umaña *et al.*, 1999). Bien que ce résultat ait été obtenu chez des eucaryotes, la surexpression des glycosyltransférases en absence des protéines régulatrices pourrait également interférer avec la croissance des bactéries, surtout lorsque leur expression n'est pas coordonnée avec les gènes codant pour le contrôle de la polymérisation (*wzd*, *wze* et *wzb*).

Néanmoins, plusieurs plasmides recombinants obtenus dans cette étude ont été utiles pour démontrer les rôles de trois protéines dans la phosphorylation des tyrosines *in vivo* chez *L. lactis* ssp. *cremoris*. Ainsi, les protéines Wzd et Wze sont phosphorylés sur un ou plusieurs tyrosines même en présence de Wzb. En absence de Wze et en présence de Wzb, Wzd ne maintient pas la phosphorylation. Dans le cas contraire, en absence de Wzd et en présence de Wzb, Wze ne maintient pas non plus la phosphorylation. Un ou plusieurs résidus tyrosines sont nécessaires pour la phosphorylation des deux protéines Wzd et Wze.

Une étude précédente a montré un résultat similaire (Groot et Kleerebezem, 2007). La kinase de *L. lactis* NIZO B40 a été phosphorylée en présence de la co-polymérase chez autre *L. lactis* (la souche NZ9000). Une faible phosphorylation de la kinase a été détectée en présence de la phosphatase et de la co-polymérase. Par contre, il n'y avait pas de protéine phosphorylée en présence de la co-polymérase avec toutes les autres protéines codées par les gènes des opérons EPS. Les auteurs ont proposé que la kinase puisse être phosphorylée partiellement dans la situation de type sauvage (la présence de toutes les protéines codées par les gènes des opérons EPS) et qu'il y ait d'autres protéines que la co-polymérase influençant la phosphorylation de la kinase. Avec les protéines de notre étude, il est possible que la kinase Wze soit phosphorylée en présence de Wzb (phosphatase) en raison de l'absence des autres protéines sauf Wzd. Nous avons détecté la phosphorylation de la co-polymérase, malgré que la précédente étude ne l'ait pas fait.

La dynamique de l'interaction de ces protéines (Wzd, Wze et Wzb) est discutée plus en profondeur dans la section 3 traitant des résultats obtenus avec le modèle *in vitro* des protéines produites chez *E. coli*.

2. Impact de l'environnement sur la biosynthèse d'EPS

2.1 Le besoin en énergie

Chez *S. thermophilus*, la production d'EPS augmente parallèlement avec la croissance et atteint un maximum à la fin de la phase exponentielle (Degeest et De Vuyst, 1999). La production des EPS chez *L. rhamnosus* R commence à la fin de la phase exponentielle et cette synthèse continue au-delà de la phase de déclin (Pham *et al.*, 2000). La croissance des bactéries a donc une relation avec la biosynthèse des EPS.

La production d'énergie à partir de la fermentation des sucres reste limitée dans la cellule, donc la production d'EPS pourrait être fortement limitée. En plus, la limitation de la formation de biomasse, due à un manque d'énergie, affecte la production d'EPS (De Vuyst *et al.*, 1998). Les souches transformées productrices d'EPS atteignent plus tard la phase stationnaire que la souche non productrice d'EPS, *L. lactis* MG1363 (pIL253 et pNZ124). Ce résultat pourrait s'expliquer par le besoin en énergie pour la biosynthèse d'EPS : l'utilisation des sucres, la formation des liaisons glycosidiques, le transport des unités à l'extérieur de la cellule, et enfin, la polymérisation et la formation du matériel extracellulaire.

L'ATP est nécessaire pour l'activation des sucres. L'hexose doit être converti en hexose phosphorylé (ex. glucose-6-P). Pour la synthèse du sucre nucléotidique et la phosphorylation du transporteur lipidique, l'ATP est également nécessaire. La même source d'énergie est donc indispensable à la fois pour la croissance et la synthèse des EPS. L'efficacité de la production d'EPS est augmentée si l'ATP est présent en excès par rapport aux besoins pour la synthèse des composantes de la cellule (Looijesteijn *et al.*, 2000; De Vuyst *et al.*, 2001).

La polymérisation des EPS est régulée par les événements de phosphorylation réversibles au sein du complexe de polymérisation (Morona *et al.*, 2000a; Bender et Yother, 2001; Bender *et al.*, 2003). La phosphorylation des protéines est l'ajout d'un groupe phosphate à partir d'un nucléoside triphosphate (habituellement l'ATP) sous l'action de la kinase. L'ATP est utilisé pour l'auto-phosphorylation de la kinase en présence de la co-

polymérase. Dans notre étude, nous avons démontré la phosphorylation de la copolymérase. Ce phénomène n'avait jamais été mis en évidence. La disponibilité de l'ATP pourrait donc être un frein à la biosynthèse des EPS par ce mécanisme.

2.2 La répression catabolique

Les hétéropolysaccharides sont synthétisés à partir de sucres nucléotidiques et les sucres sont importés du milieu extracellulaire. Le type et la quantité de la source de carbone ont un effet sur la biosynthèse des EPS, et spécialement, l'augmentation de la concentration des sucres conduit à la production de plus d'EPS (Cerning *et al.*, 1994; Rusinova-Videva *et al.*, 2011). Une étude a vérifié les effets de différentes sources de carbone à différentes concentrations sur la production d'EPS chez *L. casei* CG11 (Cerning *et al.*, 1994). La souche est capable de produire plus d'EPS en augmentant la concentration des différents sucres ajoutés (glucose, lactose, galactose, etc.). Notre étude a observé la diminution de la production d'EPS en présence d'une plus grande quantité de glucose chez les souches transformées. Cela peut être le résultat de la répression catabolique par le glucose.

Chez *Rhizobium leguminosarum*, le glucose régule négativement la production des EPS (Janczarek et Skorupska, 2007; Janczarek et Skorupska, 2009). RosR est une protéine régulatrice qui influence positivement la régulation de la production d'EPS, mais la transcription de *rosR* est activée en l'absence du glucose. Cette souche a produit 1,5 fois plus d'EPS avec le glycérol qu'avec le glucose dans un milieu minimal M1. Il s'agit là d'un exemple de la répression catabolique sur la production d'EPS.

Chez les Gram positif, les protéines, HPr (histidine-containing PTS phosphotransferase), HPr kinase/phosphatase (HPrK/P), et CcpA (protéine de contrôle catabolique régulatrice du métabolisme du carbone) participent à la régulation de la consommation de carbone (Titgemeyer et Hillen, 2002; Görke et Stülke, 2008). En présence d'une source de carbone pour la répression, le résidu sérine de HPr est phosphorylée (HPr-ser-P). HPr-ser-P se lie à la protéine CcpA et cette interaction est renforcée par des intermédiaires glycolytiques, tels que le fructose-1,6-bisphosphate (FBP) et le glucose-6-phosphate (Glu-6-P). Le complexe

de CcpA et HPr-ser-P se lie aux sites *cre* (catabolite-responsive element) sur l'ADN et réprime la transcription des gènes du catabolisme.

La localisation du site *cre* est importante pour contrôler l'activation ou la répression de l'expression des gènes. Une régulation négative de l'opéron Gal par le glucose a été vérifiée (Luesink *et al.*, 1998). Cette étude a proposé la perturbation de la CcpA, car le site *cre* est situé dans la région du promoteur *galA*. Chez *L. plantarum*, l'expression du gène *bglH* (β -glucosidase H) est régulée par la liaison de CcpA et *cre*. En croissance avec glucose, la répression du promoteur qui est positionné en amont de *cre* a été vérifiée en présence de la CcpA activée (Muscariello *et al.*, 2001). Chez *B. subtilis*, la transcription du gène *pta* (phosphoacétyltransférase) est activée par la liaison de la CcpA en amont du promoteur (Presecan-Siedel *et al.*, 1999).

Plusieurs opérons pour le catabolisme des substrats PTS sont contrôlés par les régulateurs de transcription qui contiennent les domaines de PTS réglementaires (PRD) en double, chez *B. subtilis* (Görke et Stülke, 2008; Krüger *et al.*, 1999). Ces régulateurs peuvent agir comme des activateurs de transcription ou d'antitermination des protéines liant l'ARN. Un régulateur, LicT (un antitermineur) contrôle l'expression de l'opéron *bglPH* pour l'utilisation des aryl- β -glucosides, mais il est inactivé en présence du glucose. Dans le deux PRD de régulateur, le deuxième doit être phosphorylé pour être activé. Seulement en absence du glucose, cette phosphorylation est catalysée par HPr-His-P (HPr histidine phosphorylée) qui contribue également à l'interaction avec CcpA.

Chez *L. lactis* MG1363, l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme du carbone et de l'azote a été activée ou réprimée par la CcpA (Zomer *et al.*, 2007). Chez les deux transformants MG1363, la phosphorylation de HPr peut être induite par le glucose pour interagir avec la CcpA. Cette interaction pourrait perturber la transcription des opérons EPS de *L. rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595. Une étude précédente a identifié une séquence similaire au site *cre* qui est localisée en amont du promoteur P1 (Péant *et al.*, 2005). Dans notre étude, ce site *cre* potentiel n'était pas inclus dans la construction d'ADN transférée à MG1363. Donc, une répression par le complexe CcpA se liant à un site *cre* n'est pas possible. Cependant, il y a des séquences consensus similaires de CRP (cAMP receptor protein), FNR (regulator for fumarate and nitrate reduction) et FLP (FNP-like

proteins) identifiés autour du promoteur P1 (Péant *et al.*, 2005). Ces séquences sont des sites qui peuvent participer au contrôle de la transcription (Irvine et Guest, 1993; Körner *et al.*, 2003). Les gènes *fnr* et *crp* qui codent FNR et CRP sont soumis à l'autorégulation et à la répression par le glucose. Ces trois séquences consensus dans le promoteur des opérons EPS pourraient être un site contribuant à la régulation chez les souches recombinantes.

Par ailleurs, le gène régulateur *wzr* de RW-9595M et ATCC 9595 a aussi été transformé de concert avec les opérons EPS. Ce régulateur pourrait contribuer à la répression en présence de glucose, comme chez *B. subtilis*. Chez *L. lactis*, une autre possibilité serait l'absence d'un facteur permettant d'augmenter l'expression lors de la présence de glucose en quantité plus élevée. Ainsi, il reste des perspectives d'investigation de la régulation des opérons en élucidant la fonction du gène *wzr*. Par exemple, le clonage du promoteur en amont d'un gène rapporteur pourrait être utilisé pour déterminer l'effet de la source de carbone sur l'expression du gène rapporteur en présence ou en absence du régulateur *wzr*.

3. Le mécanisme de la polymérisation

Chez *S. pneumoniae*, les polymères naissants s'attachent très faiblement à la paroi cellulaire en comparaison au type sauvage, en raison des deux protéines, CpsC (co-polymérase) et CpsD (kinase), éliminées. En plus, les mutations des résidus, y compris deux tyrosines de CpsC, conduisent à un défaut de fixation à la paroi (Morona *et al.*, 2000a; Morona *et al.*, 2006). Les EPS n'ont pas été produits lorsque les protéines EpsA (co-polymérase) et EpsB (kinase) étaient mutées. Par contre, la mutation de phosphatase (EpsC) n'était pas essentielle pour la production chez *L. lactis* (Groot et Kleerebezem, 2007). Les résultats similaires ont été observés chez la souche productrice d'EPS *S. thermophilus* CNRZ1066 (Minic *et al.*, 2007).

Chez *S. thermophilus* MR-1C, l'interaction entre Wzd (la co-polymérase) et Wze (la kinase) a été étudiée en utilisant le système à deux hybrides dans la levure (Cefalo *et al.*, 2011). Les tyrosines de la kinase (EpsD) ont été détectées en état phosphorylé chez *S. thermophilus* CNRZ1066. Cependant, aucune protéine phosphorylée n'a été observée lorsque la co-

polymérase ou la kinase ont été mutées (Minic *et al.*, 2007). Un résultat similaire a été rapporté chez *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2000a). La phosphorylation de CpsD a conduit à réduire le taux global de biosynthèse de CPS et à augmenter l'attachement et la quantité CPS à la paroi cellulaire (Morona *et al.*, 2006; Bender *et al.*, 2003). Donc, l'importance de la présence de la co-polymérase pour la phosphorylation de la kinase a été clairement démontrée, mais aucune étude ne propose la phosphorylation de la co-polymérase

Nos travaux étaient concentrés sur la phosphorylation et l'interaction entre les protéines Wzd (co-polymérase), Wze (kinase) et Wzb (phosphatase). Ces protéines produites à l'aide d'un système d'expression chez *E. coli* ont été purifiées et utilisées pour tester des interactions *in vitro*. La phosphorylation de ces protéines a également été vérifiée *in vivo* chez *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Le test *in vitro* permet de contrôler certaines des conditions et de tester l'interaction entre les protéines en état phosphorylée ou non. Les essais *in vivo* ont permis de vérifier les états de phosphorylation en présence ou en absence des autres protéines et d'aider à comprendre la phosphorylation avec le résultat *in vitro*.

Wzd et Wze peuvent être essentielles pour la production des EPS comme chez les autres bactéries productrices d'EPS et cela peut être contrôlé par la phosphorylation de Wzd et Wze. Les résultats *in vivo* et *in vitro* ont montré que Wzd et Wze ont besoin de l'une et de l'autre pour la phosphorylation. Les résultats obtenus ont aussi montré que Wzd forme un complexe avec Wze non-phosphorylé. Pendant l'interaction entre Wzd et Wze non-phosphorylée, Wzd a été phosphorylée, et après Wze a été libérée par la déstabilisation de l'interaction. Ensuite, Wze a été autophosphorylée en présence de Wzd phosphorylée et l'ATP par l'interaction transitoire. Ces résultats suggèrent que la co-polymérase est nécessaire à la phosphorylation de la kinase comme dans l'étude de Minic (2007). C'est entièrement original d'avoir démontré l'inverse, que la kinase est nécessaire pour la phosphorylation de Wzd.

Le nouveau mécanisme identifié dans cette étude ne peut donc pas encore être généralisé pour toutes les bactéries à Gram positif produisant des hétéropolysaccharides. La production d'EPS est très variable d'une souche à l'autre (Macedo *et al.*, 2002). Le mécanisme de production des EPS peut aussi différer selon les bactéries. Par exemple, la kinase (EpsC) de *L. delbrueckii* n'a pas de région riche en tyrosine (Lamothe *et al.*, 2002).

Cela veut dire que la régulation de la production des EPS pourrait être contrôlée par des sites de phosphorylation alternatifs ou par d'autres mécanismes différents. La co-polymérase et la kinase sont indispensables pour la production des EPS chez *L. lactis* et *S. thermophilus* (Groot et Kleerebezem, 2007; Minic *et al.*, 2007). Par contre, ces deux protéines sont responsables de l'attachement des polymères et il y avait des produits de faible masse moléculaire qui ont été identifiés lorsqu'elles étaient mutées chez *S. pneumoniae* (Morona *et al.*, 2000a; Bender *et al.*, 2003; Morona *et al.*, 2006). De plus, la phosphorylation de la co-polymérase semble différente selon les bactéries, ainsi, Wzd était phosphorylée alors que CpsC était non-phosphorylée.

3.1 La fonction des tyrosines chez la co-polymérase

La co-polymérase, une protéine membranaire, a été considérée comme la protéine accessoire pour l'auto-phosphorylation de la kinase lors de la polymérisation EPS chez les bactéries à Gram positif (Morona *et al.*, 2000a). Notre étude a montré l'état phosphorylé de cette protéine et que les résidus tyrosine étaient indispensables à cette phosphorylation.

Dans les études précédentes, la possibilité que la co-polymérase soit phosphorylée n'a pas été considérée. Chez *S. pneumoniae*, une protéine phosphorylée a été détectée par les essais d'immunobuvardage. Cette protéine a été considérée comme une kinase, car elle est située dans la fraction cytoplasmique et non dans la membrane et elle a été détectée par l'anticorps anti-CpsD (Morona *et al.*, 2000a). Par contre, une protéine phosphorylée a été détectée dans la fraction membranaire chez *S. thermophilus* CNRZ1066 (Minic *et al.*, 2007). Cette étude a proposé que cette protéine soit la kinase (EpsD) et qu'elle se lie à la co-polymérase (EpsC) lorsqu'elle est phosphorylée. Or, cette protéine phosphorylée pourrait être également EpsC qui a une taille similaire (25 kDa) à la kinase (27 kDa). Par conséquent, il est possible que la co-polymérase soit aussi phosphorylée chez cette bactérie.

Wzd possède neuf tyrosines, dont une est située près de la région transmembranaire C-terminale (Figure 4.3). Une autre Wzd chez *L. rhamnosus* GG possède aussi les tyrosines situées à des positions semblables. Les protéines homologues EpsA (*L. lactis* ssp. *cremoris*

NIZO B40 ou Ropy 352) et EpsB (*L. johnsonii* F19785) possèdent 7 et 5 tyrosines, respectivement. En plus, elles possèdent aussi une tyrosine située près de la région transmembranaire C-terminale. CpsC (*S. pneumoniae* Rx1-19F) ne possède pas de tyrosine située près de la région transmembranaire C-terminale (Voir figure 1.17 dans le chapitre 1). Ainsi, le mécanisme de polymérisation pourrait différencier entre les streptocoques et les lactocoques ou lactobacilles.

Une étude précédente a démontré que le domaine cytoplasmique de la région transmembranaire C-terminal de la co-polymérase (CpsA) est nécessaire pour l'autophosphorylation intermoléculaire de la kinase (CpsB) chez *S. aureus* (Olivares-Illana *et al.*, 2008). La tyrosine dans ce domaine pourrait participer à la phosphorylation, mais cette tyrosine est absente chez *S. pneumoniae*. Il est donc possible que la forme de Wzd phosphorylée ait été détectée, alors que ce n'est pas le cas pour CpsC, car le mécanisme d'interaction serait différent. Cependant, un rôle de ce résidu tyrosine dans la stabilisation des hélices alpha a été proposé, sans aucune phosphorylation (Tocilj *et al.* 2008).

Lorsque la protéine CpsC (co-polymérase) est absente par délétion du gène, les polymères naissants s'attachent faiblement à la paroi cellulaire en comparaison au type sauvage. (Morona *et al.*, 2000a). Par contre, les EPS n'ont pas été produits lorsque la protéine EpsA (co-polymérase) était mutée, chez *L. lactis* (Groot et Kleerebezem, 2007). Les bactéries des genres *Lactobacillus* et *Lactococcus* qui produisent les EPS mais ne produisent pas de CPS semblent avoir cette tyrosine chez leur co-polymérase (Figure 4.3). La tyrosine située près de la région transmembranaire C-terminale pourrait donc être associée à l'attachement des polymères, contribuant à différencier la production de CPS de la production d'EPS.

La phosphorylation de Wzd et Wze peut contrôler la production des EPS, comme mentionné ci-dessus. Ces deux protéines n'étaient pas phosphorylées, lorsque toutes les neuf tyrosines de Wzd étaient mutées. Pour déterminer la tyrosine qui est responsable de la phosphorylation, il reste à vérifier les états de phosphorylation avec les mutants de chacune des neuf tyrosines de Wzd. Il est possible que la tyrosine positionnée dans la région C-terminal cytoplasmique puisse être responsable de la phosphorylation de Wzd.

```

EpsA (NIZO B40) --MQETQEQTIDLRGIFKIIKRLGLILFSALIVTILGSIYTFFFIASPVY 48
EpsA (Ropy 352) --MQETQEQTIDLRGIFKIIKRLGLILFSALIVTILGSIYTFFFIASPVY 48
Wzd (RW ou ATCC) -----MNEQIDLARLWNVFKHSFIVMILLGLLGMFIAYFGAKTFIAPKY 44
Wzd (GG) -----MNEQIDLAQLWNVFKRSFLAMIVFGIIGMAAAYFGAKAFIAPKY 44
EpsB MENSTKTENTIDLRRLWMLLRAHIWSIILWAIGLGAVGFVLAAFVVEPKY 50
      :: ***  :: : : :  :  : :  . . .  . * *

EpsA (NIZO B40) TASTQLVVKLPNSDNSAAYAG-EVTGNIQMANTINQVIVSPVILDKVRSN 97
EpsA (Ropy 352) TASTQLVVKLPNSEHSAAYAG-EVTGNIQMANTINQVIVSPVILDKVQSN 97
Wzd (RW ou ATCC) SASTSMLVNRKQ-DNNPNMQLNAQQADIQIINTYKDII TRPVILREVADD 93
Wzd (GG) ESDTSLLVNRKQ-DNDPNMQLNAQQADIQIINTYKDII TRPVVQLQAVED 93
EpsB TSTTQILVNQKRNAVDAQAYNAQQADVQVINTYKDIVTSPVILKDKASKW 100
      : * . : : * : . . . . . : : * : * * : : : . * : * . .

EpsA (NIZO B40) LNLS----- 101
EpsA (Ropy 352) LNLS----- 101
Wzd (RW ou ATCC) LTSPPRRVKVKKAKAVYGTRYNAATGVRERYVVKEEQPAKYKLKPAKYAN 143
Wzd (GG) LTSPQRMVKKAKPAVYGTRYNAATGTRERYVTEEAQPAKYKLKPAKYSN 143
EpsB IKNP-TEVVKPAKKAKYKT---LADGTTK--LVRPAEPAVIRRAGRYN- 143
      : . .

EpsA (NIZO B40) --DDSFQKQVTAANQTNSQVIMLTVKYSNPYIAKKIADETAKIFSSDAK 149
EpsA (Ropy 352) --DGSFQKQVTVANQTDSQVITLTVKYSNPYIAQKIADETAKIFSSDAK 149
Wzd (RW ou ATCC) ISEDDLKMSVSNAQNSQVFTVNVRDTDPVRAKDVANEIAKVFKAKIAS 193
Wzd (GG) ISEEDLTKMVSVSTQQNSQVFTVNVKDTSPVRARDIANEIAKVFEKKIAK 193
EpsB VSAKEMQKAVSVTTQQQSQVFTISAKSNDPEKSQAIANAVAQTFFKNKIKS 193
      . : * : : : . : * : : : . : * : : : * : * : . . .

EpsA (NIZO B40) LLNVTNVNILSKAKAQTTPISPKPKYLYLAISVIAGLVLGLAIALLKELFD 199
EpsA (Ropy 352) LLNVTNVNILSKAKAQTTPISPKPKYLYLAISVIAGLVLGLAIALLKELFD 199
Wzd (RW ou ATCC) IMSVSNVSIVSRATADPTVTPNLKIASLIGLILGMVLAFTVGLIRELTD 243
Wzd (GG) IMSISNVSVVSRATANTIPVSPKLKLLSIVGLALGILIALSWGLVRELTD 243
EpsB IMNVNNTIVSPASVG-AKTFPKTTLFTLAGVVLGLIISVALIILRDSFN 242
      : : : . * . : : * * * : : : * : : : : : : : : : :

EpsA (NIZO B40) NKINK-EEDIEALGLTVLGVTSYDQMS-DFNKNTNKNGTQSGTKSSPPSD 247
EpsA (Ropy 352) NKINK-EEDIEALGLTVLGVTSYAQMS-DFNKNTNKNGTQSGTKSSPPSD 247
Wzd (RW ou ATCC) QTIKSIDFITNDLGLVNLGLVNYVQRMNDMDEAIARSKNKIIDSEAEPET 293
Wzd (GG) QTIKIDIDFITDDLGLVNLGIVNYVVRMKDMDQAIQQSRATDSGNDVQDDL 293
EpsB TTVRDDDYLTKELGLTNLGHVSHFHLSNKFSINNNDNSF----- 281
      . . . . : . * * . * * . . . . . : . . . .

EpsA (NIZO B40) HEVNRSSKRNKR- 259
EpsA (Ropy 352) HEVNRSSKRNKR- 259
Wzd (RW ou ATCC) TG--FPQRSRRRV 304
Wzd (GG) DGIDFPQRSRRRI 306
EpsB -----GKKKRV 287
      ..*

```

* : Résidu identique
: : Substitution conservatrice
. : Substitution semi-conservatrice
- : intervalle

Figure 4.3 Alignement de la séquence de Wzd avec les autres co-polymérase de *Lactococcus* et *Lactibacillus*.

Wzd (RW ou ATCC) de *L. rhamnosus* RW-9595M ou ATCC 9595 étaient comparées avec les protéines homologues comme Wzd de *L. rhamnosus* GG, EpsA de *L. lactis* ssp. *cremoris* NIZO B40 et Ropy 352 et EpsB de *L. johnsonii* F19785. Les régions correspondant aux motifs associés aux séquences transmembranaires sont en surbrillance jaune et la région coiled-coil est doublement soulignée. Les résidus tyrosine sont en rouge.

4. Conclusions et perspectives

L'hypothèse de recherche était que treize gènes provenant de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ou ATCC 9595 sont suffisants pour la biosynthèse et la polymérisation des EPS chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et que l'interaction entre les trois protéines Wzd, Wze et Wzb du complexe de polymérisation des EPS est gouvernée par des événements de phosphorylation réversible de tyrosines.

Les résultats obtenus convergent pour confirmer l'hypothèse. Les nouvelles souches *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 productrices d'EPS ont été construites et ont permis de voir l'impact des opérons EPS de *L. rhamnosus*. Ces recombinants produisent une quantité plus élevée d'EPS, par rapport aux autres souches *L. lactis* ssp. *cremoris*, même avec moins de sucre dans le milieu de culture. Ceci est probablement parce que les mutants ont les opérons EPS localisés sur des plasmides qui sont en plus grand nombre de copies que l'ADN génomique. De plus, ces résultats permettent de générer un modèle de polymérisation pour deux souches, *L. rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595, qui produisent les différentes quantités d'EPS. La capacité de ces opérons EPS plasmidiques sur la production des EPS a permis d'étudier la mécanisme de polymérisation des EPS chez *L. lactis*.

Les opérons EPS de *L. rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595 n'ont pas produit des quantités significativement différentes chez *L. lactis*, bien que les deux souches produisent des quantités très différentes. Il s'agit donc d'un résultat important pour la compréhension de l'impact des opérons EPS sur la différence entre RW-9595M et ATCC 9595. En plus, les recombinants peuvent être utilisés dans d'autres études pour comprendre la différence de production des EPS entre *L. lactis* et *L. rhamnosus*.

Les EPS produits par les mutants *L. lactis* sont peut-être différents en structure de ceux produits par les souches *L. rhamnosus*, en raison des différences de disponibilité de précurseurs. Cette différence de structure aiderait à mieux comprendre la relation entre les caractéristiques physicochimiques et les propriétés fonctionnelles de ces EPS, par rapport à ceux produits par *L. rhamnosus*. Par exemple, la masse moléculaire et la structure

permettront de comprendre leur impact sur l'immunomodulation ou sur l'inhibition de l'adhésion des probiotiques.

Les travaux réalisés ont permis de comprendre l'impact de la phosphorylation de la co-polymérase sur les interactions entre les protéines proposées pour participer à la polymérisation des exopolysaccharides. Au terme de cette étude, la phosphorylation de Wzd (co-polymérase) est proposée comme une étape supplémentaire à la phosphorylation réversible pour assurer la polymérisation des EPS. Toutes les études antérieures se sont concentrées sur la phosphorylation de la kinase, mais nous avons déterminé pour la première fois que Wzd phosphorylée est nécessaire à la phosphorylation de Wze. L'activité de Wzd est modulée par la phosphorylation de résidus tyrosine et contribue au contrôle de la polymérisation.

Chez les bactéries à Gram négatif, la co-polymérase participe à la détermination de la longueur de la chaîne des lipopolysaccharide (LPS) (Tocilj *et al.*, 2008; Morona *et al.*, 2009). Chez *S. pneumoniae* D39, la phosphorylation de la kinase est positivement corrélée avec l'attachement de CPS sur la paroi (Bender *et al.*, 2003; Morona *et al.*, 2006). En présence de Wzd phosphorylée, la phosphorylation de la kinase Wze pourrait ralentir la polymérisation et conduire à la fixation du polysaccharide à la paroi, comme pour la souche D39. La co-polymérase Wzd pourrait donc favoriser l'élongation de polysaccharides par la phosphorylation dans l'interaction avec la polymérase.

Cette étude a permis d'élucider une face cachée d'un des mécanismes de biosynthèse des EPS, fondé sur la polymérase Wzy. Cependant d'autres études demeurent nécessaires. La déphosphorylation de la co-polymérase (Wzd) et de la kinase (Wze) par la phosphatase (Wzb) doit être déterminée. Il est donc nécessaire d'étudier l'effet de la phosphatase Wzb sur l'interaction des protéines Wzd et Wze responsables de la polymérisation des EPS et d'observer si Wzb est également phosphorylée.

Ce projet a réussi à vérifier la capacité de production des EPS avec des opérons EPS de deux souches de *L. rhamnosus* et de générer un modèle de polymérisation pour les deux souches. En plus, nous avons proposé une nouvelle étape, la phosphorylation de la co-polymérase dans les mécanismes de contrôle de la polymérisation des EPS. Par contre,

l'effet des trois protéines proposées de contrôler la polymérisation sur la production d'EPS n'avait pas été vérifié. Il est donc nécessaire de réaliser d'autres études afin de vérifier leur impact sur la production des EPS pour compléter le mécanisme de polymérisation des EPS.

La compréhension du mécanisme de polymérisation des EPS pourrait amener à contrôler la longueur de la chaîne et donc d'obtenir différentes masses moléculaires. L'étude de l'effet de la masse moléculaire sur les fonctions technologiques ou biologiques des EPS sera rendue possible grâce à ce contrôle.

Dans une étude antérieure, les EPS hydrolysés ont stimulé les cytokines anti-inflammatoires, au contraire des EPS natifs qui ont induit une réponse pro-inflammatoire (Bleau *et al.*, 2010). La masse moléculaire semble donc affecter les propriétés d'immunomodulation. Ainsi, obtenir différents poids moléculaires sans traitement chimique des EPS a beaucoup plus d'avantages pour l'étude de la relation entre la masse moléculaire et la capacité immunomodulatrice.

La corrélation entre la masse moléculaire et la viscosité du lait fermenté a aussi été vérifiée avec plusieurs types d'EPS de produits par différentes souches de *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* (Gentès *et al.*, 2011). La viscosité, la fermeté et la rétention du lactosérum du lait fermenté ont été améliorées par les EPS ayant une haute masse moléculaire. Il n'est pas facile de comprendre les principes de la relation entre les fonctions et les caractéristiques des EPS, à cause de la diversité des EPS. Obtenir différents poids moléculaires des EPS est donc avantageux pour l'étude de la relation masse moléculaire et les propriétés rhéologiques.

Les conclusions de ce projet sont utiles à la compréhension du mécanisme de la polymérisation des EPS. Une meilleure connaissance des processus de biosynthèse permettra de comprendre les nombreux facteurs qui affectent la production des EPS. Il est d'ailleurs possible d'optimiser la production d'EPS et de présenter une structure modifiée qui sera adaptée aux études des propriétés des EPS. La possibilité de contrôler la production d'EPS serait très bénéfique pour l'industrie alimentaire pour d'avoir accès à des souches avec leur EPS pour remplacer les additifs alimentaires texturants.

Chapitre 5

Références

- Almirón-Roig, E., Mulholland, F., Gasson, M. J., Griffin, A. M.** (2000) The complete *cps* gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. *Microbiology* 146: 2793-2802.
- Anukam, K. C., Osazuwa, E. O., Osadolor, H. B., Bruce, A. W., Reid, G.** (2008) Yogurt containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 helps resolve moderate diarrhea and increases CD4 count in HIV/AIDS patients. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42: 239.
- Bastin, D.A., Stevenson, G., Brown, P.K., Haase, A., Reeves, P.R.** (1993) Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Molecular Microbiology* 7: 725-734.
- Bender, M., Cartee, R., Yother, J.** (2003) Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 185: 6057-6066.
- Bender, M., Yother, J.** (2001) CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47966-47974.
- Bibiloni, R., Perez, P. F., Antoni, G. L. d.** (1999) Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture. *Anaerobe* 5: 483-485.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., Lamontagne, L.** (2010) Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology* 108: 666-675.
- Boels, I. C., Beerthuyzen, M. M., Kusters, M. H., Van Kaauwen, M. P., Kleerebezem, M., De Vos, W. M.** (2004) Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* *rfb* operon, required for dTDP-rhamnose biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 186: 1239-1248.
- Boels, I. C., Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., de Vos, W. M.** (2001) Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 723-732.
- Boels, I. C., van Kranenburg, R., Kanning, M. W., Chong, B. F., de Vos, W. M., Kleerebezem, M.** (2003) Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 *eps* gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5029-5031.
- Bouazzaoui, K., LaPointe, G.** (2006) Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene

- expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*. Journal of Microbiological Methods 65: 216-225.
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M.** (1997) Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. Journal of Dairy Science 80: 2310-2317.
- Campbell, J., Davies, G., Bulone, V., Henrissat, B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. Biochemical Journal 326: 929.
- Cefalo, A. D., Broadbent, J. R., Welker, D. L.** (2011) Protein–protein interactions among the components of the biosynthetic machinery responsible for exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* MR-1C. Journal of Applied Microbiology 110: 801-812.
- Cerning, J.** (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 7: 113-130.
- Cerning, J.** (1995) Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Le Lait 75: 463-472.
- Cerning, J., Renard, C., Thibault, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L.** (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Applied and Environmental Microbiology 60: 3914-3919.
- Chabot, S., Yu, H. L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D.** (2001) Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. Le Lait 81: 683-697.
- Chassy, B. M., Thompson, J.** (1983a) Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. Journal of Bacteriology 154: 1204-1214.
- Chassy, B. M., Thompson, J.** (1983b) Regulation of lactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and beta-D-phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. Journal of Bacteriology 154: 1195-1203.
- Colby, S., Russell, R.** (2003) Sugar metabolism by mutans streptococci. Journal of Applied Microbiology 83: 80S-88S.
- Crescenzi, V.** (1995) Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. Biotechnology Progress 11: 251-259.

- Cuthbertson, L., Mainprize, I. L., Naismith, J. H., Whitfield, C.** (2009) Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 155-177.
- Dabour, N., Kheadr, E., Benhamou, N., Fliss, I., LaPointe, G.** (2006) Improvement of texture and structure of reduced-fat cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci. *Journal of Dairy Science* 89: 95-110.
- Dabour, N., Kheadr, E., Fliss, I., LaPointe, G.** (2005) Impact of ropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *International Dairy Journal* 15: 459-471.
- Daniels, C., Griffiths, C., Cowles, B., Lam, J. S.** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen chain length is determined before ligation to lipid A core. *Environmental Microbiology* 4: 883-897.
- De Vos, W. M., Simons, G.** (1994) Gene cloning and expression systems in lactococci. In M. J. Gasson and W. M. de Vos (ed.). *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria* (52-105). Blackie Academic & Professional. Glasgow UK
- De Vos, W. M., Vaughan, E. E.** (1994) Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 217-237.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B.** (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 687-707.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B.** (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1059-1068.
- Degeest, B., De Vuyst, L.** (1999) Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2863-2870.
- Degeest, B., De Vuyst, L.** (2000) Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3519-3527.
- Denou, E., Pridmore, R. D., Berger, B., Panoff, J. M., Arigoni, F., Brüssow, H.** (2008).

- Identification of Genes Associated with the Long-Gut-Persistence Phenotype of the Probiotic *Lactobacillus johnsonii* Strain NCC533 Using a Combination of Genomics and Transcriptome Analysis. *Journal of Bacteriology* 190: 3161-3168
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C.** (2001) *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 386s-392s.
- Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G.** (2000) Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 251-255.
- Franco, A. V., Liu, D., Reeves, P. R.** (1998) The Wzz (Cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *Journal of Bacteriology* 180: 2670-2675.
- Görke, B., Stülke, J.** (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6: 613-624
- Güler-akin, M., Serdar akin, M., Korkmaz, A.** (2009) Influence of different exopolysaccharide-producing strains on the physicochemical, sensory and syneresis characteristics of reduced-fat stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 62: 422-430.
- Gentès, M.-C., St-Gelais, D., Turgeon, S. L.** (2011) Gel formation and rheological properties of fermented milk with *in situ* exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology* 91: 645-661.
- Germond, J. E., Delley, M., D'Amico, N., Vincent, S. J.** (2001) Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *European Journal of Biochemistry* 268: 5149-5156.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B.** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412.
- Glucksmann, M., Reuber, T., Walker, G.** (1993) Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 175: 7045.
- Grangeasse, C., Doublet, P., Cozzone, A. J.** (2002) Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *Journal of Biological Chemistry* 277: 7127.
- Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Doublet, P.** (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine

phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 39323-39329.

- Grobben, G., Van Casteren, W., Schols, H., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M., Sikkema, J., De Bont, J.** (1997) Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 516-521.
- Groot, N., Kleerebezem, M.** (2007) Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2645-2656.
- Hassan, A., Corredig, M., Frank, J.** (2002) Capsule formation by nonropy starter cultures affects the viscoelastic properties of yogurt during structure formation. *Journal of Dairy Science* 85: 716-720.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., Clara, G., Suárez, A., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P.** (2012) Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4: 227-237.
- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S. R., Waldron, K. W., Bongaerts, R. J., Mayer, M. J., Narbad, A.** (2013) Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on *Lactobacillus johnsonii* surface characteristics. *PLoS One* 8: e59957.
- Irvine, A. S., Guest, J. R.** (1993) *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family. *Nucleic Acids Research* 21: 753.
- Janczarek, M., Skorupska, A.** (2007) The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 867-881.
- Janczarek, M., Skorupska, A.** (2009) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* gene expression is regulated by catabolic repression. *FEMS Microbiology Letters* 291: 112-119.
- Jolly, L., Stinglele, F.** (2001) Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 733-745.
- Körner, H., Sofia, H. J., Zumft, W. G.** (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 559-592.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E.** (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 361: 1869-1871.

- Kidd, P.** (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review* 8: 223-246.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T.** (1998) Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology* 40: 169-175.
- Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Yamaguchi, T.** (1996) Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *International Journal of Food Microbiology* 31: 99-106.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T.** (1991) Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian røpy sour milk, "viili". *Animal Science and Technology* 62: 277-283.
- Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., de Vos, W. M.** (1999) Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 357-365.
- Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E., Jackson, R.** (1953) Enzymatic synthesis of dextran acceptor specificity and chain initiation. *Journal of Biological Chemistry* 200: 793-801.
- Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J., Topisirovic, L.** (1992) Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 4086-4088.
- Kolida, S., Gibson, G. R.** (2007) Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition* 137: 2503S-2506S.
- Korakli, M., Vogel, R. F.** (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 790-803.
- Kranenburg, R. v., Marugg, J. D., Van Swam, I. I., Willem, N. J., De Vos, W. M.** (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 24: 387-397.
- Krüger, S., Gertz, S., Hecker, M.** (1996) Transcriptional analysis of *bgIPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *Journal of Bacteriology* 178: 2637-2644

- López, P., Monteserín, D. C., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Suárez, A., Ruas-Madiedo, P.** (2012) Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different *in vitro* responses upon interaction with human cells. *Food Research International* 46: 99-107.
- Lamothe, G., Jolly, L., Mollet, B., Stingle, F.** (2002) Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Archives of Microbiology* 178: 218-228.
- Landersjö, C., Yang, Z., Huttunen, E., Widmalm, G.** (2002) Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules* 3: 880-884.
- LaPointe, G., Atlan, D., Gilbert, C.** (2008) Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochemistry* 9: 10.
- Laws, A., Gu, Y., Marshall, V.** (2001) Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances* 19: 597-625.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C.** (2009) Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3554-3563.
- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Favre, N., Neeser, J. R.** (1997) Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and Sç12. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3512-3518.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J.** (2001) Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 64: 71-80.
- Looijesteijn, P. J., Van Casteren, W., Tuinier, R., Doeswijk-Voragen, C., Hugenholtz, J.** (2000) Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology* 89: 116-122.
- Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P., Hekmat, S., Reid, G.** (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clinical and Experimental Immunology* 149: 470-479.

- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Broadbent, J. R.** (1998) Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2147-2151.
- Luesink, E. J., Van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P., De Vos, W. M.** (1998) Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Molecular Microbiology* 30: 789-798.
- Macedo, M., Lacroix, C., Gardner, N., Champagne, C.** (2002) Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal* 12: 419-426.
- Martensson, O., Duenas-Chasco, M., Irastorza, A., Oste, R., Holst, O.** (2003) Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie* 36: 353-357.
- Mijakovic, I., Musumeci, L., Tautz, L., Petranovic, D., Edwards, R. A., Jensen, P. R., Mustelin, T., Deutscher, J., Bottini, N.** (2005) *In vitro* characterization of the *Bacillus subtilis* protein tyrosine phosphatase YwqE. *Journal of Bacteriology* 187: 3384.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Maréchal, P.** (2003) Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *The EMBO Journal* 22: 4709-4718.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D., Renault, P.** (2007) Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *Journal of Bacteriology* 189: 1351-1357.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M.** (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 675-685.
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., Paton, J. C.** (2002) *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *Journal of Bacteriology* 184: 577-583.
- Morona, J. K., Morona, R., Paton, J. C.** (2006) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8505.

- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., Morona, R.** (2000a) Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 35: 1431-1442.
- Morona, R., Purins, L., Tocilj, A., Matte, A., Cygler, M.** (2009) Sequence-structure relationships in polysaccharide co-polymerase (PCP) proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 34: 78-84.
- Morona, R., Van Den Bosch, L., Daniels, C.** (2000b) Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology* 146: 1-4.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Ohori, H.** (2004) Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International Journal of Food Microbiology* 90: 357-362.
- Muscariello, L., Marasco, R., De Felice, M., Sacco, M.** (2001) The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2903-2907.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T., Mori, Y.** (1994) Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17: 1012-1017.
- Nikolic, M., Lopez, P., Strahinic, I., Suarez, A., Kojic, M., Fernandez-Garcia, M., Topisirovic, L., Golic, N., Ruas-Madiedo, P.** (2012) Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BCGG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 158: 155-162.
- Olivares-Illana, V., Meyer, P., Bechet, E., Gueguen-Chaignon, V., Soulat, D., Lazereg-Riquier, S., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Lapr votte, O.** (2008) Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biology* 6: e143.
- P ant, B.** (2003) Identification et caractérisation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse et l'exportation des exopolysaccharides chez *Lactobacillus rhamnosus* ATTC 9595. Département des Sciences des Aliments et de Nutrition. Québec:Université Laval
- P ant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., Roy, D.** (2005) Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology* 151: 1839-1851.
- Parent, A.** (2003) Compréhension de la régulation de la biosynthèse des polysaccharides de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Département des Sciences des Aliments et de

Nutrition. Québec:Université Laval

- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A.** (2012) Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology* 52: 3-12.
- Perry, D. B., McMahon, D. J., Oberg, C. J.** (1998) Manufacture of low fat Mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures. *Journal of Dairy Science* 81: 563-566.
- Petersen, B., Dave, R., McMahon, D. J., Oberg, C., Broadbent, J.** (2000) Influence of capsular and ropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *Journal of Dairy Science* 83: 1952-1956.
- Pham, P., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J.** (2000) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2302-2310.
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P., Martin-Verstraete, I.** (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181: 6889-6897.
- Purins, L., Van Den Bosch, L., Richardson, V., Morona, R.** (2008) Coiled-coil regions play a role in the function of the *Shigella flexneri* O-antigen chain length regulator Wzz_{pHS2}. *Microbiology* 154: 1104-1116.
- Ramos, A., Boels, I. C., de Vos, W. M., Santos, H.** (2001) Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 33-41.
- Rioux, R.** (2009) Étude de l'expression différentielle des gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides chez quatre souches de *Lactobacillus rhamnosus*. Département des Sciences des Aliments et de Nutrition, Québec:Université Laval
- Roberts, I.** (1995) Bacterial polysaccharides in sickness and in health. *Microbiology* 141: 2023-2031.
- Ruas-Madiedo, P., Alting, A. C., Zoon, P.** (2005) Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *International Dairy Journal* 15: 155-164.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C. G.** (2005) Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88: 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Losreyes-Gavilan, C. G., Salminen, S.** (2006) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection* 69: 2011-2015.

- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P.** (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12: 163-171.
- Ruijsenaars, H. J., Stinglele, F., Hartmans, S.** (2000) Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. *Current Microbiology* 40: 194-199.
- Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., Georgieva, K.** (2011) Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL₆₂. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 25: 80-84.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E.** (2004) Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal* 14: 151-159.
- Sato, T., Nishimura-Uemura, J., Shimosato, T., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T.** (2004) Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* augments immunostimulatory effects by the introduction of phosphate groups. *Journal of Food Protection* 67: 1719-1724.
- Servin, A. L.** (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 405-440.
- Simon, D., Chopin, A.** (1988) Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70: 559-566.
- Stevenson, G., Kessler, A., Reeves, P. R.** (1995). A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiology Letters* 125: 23-30.
- Stinglele, F., Neeser, J.-R., Mollet, B.** (1996) Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* 178: 1680-1690.
- Stinglele, F., Newell, J. W., Neeser, J. R.** (1999) Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* 181: 6354-6360.
- Stinglele, F., Vincent, S. J., Faber, E. J., Newell, J. W., Kamerling, J. P., Neeser, J. R.** (1999) Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology* 32: 1287-1295.
- Sutherland, I.** (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* 16: 41-46.
- Sutherland, I. W.** (1993) Microbial polysaccharides. In R. L. Whistler, & J. N. Miller (ed.). *Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives* Academic Press. San Diego USA.

- Titgemeyer, F., Hillen, W.** (2002) Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59–71
- Tocilj, A., Munger, C., Proteau, A., Morona, R., Purins, L., Ajamian, E., Wagner, J., Papadopoulos, M., Van Den Bosch, L., Rubinstein, J. L., Fethiere, J., Matte, A., Cygler, M.** (2008) Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nature Structural and Molecular Biology* 15: 130-138.
- Umaña, P., Jean-Mairet, J., Bailey, J. E.** (1999) Tetracycline-regulated overexpression of glycosyltransferases in chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 65: 542-549.
- Van Calsteren, M.-R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., Roy, D.** (2002) Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal* 363: 7-17.
- Van Geel-Schutten, G., Faber, E., Smit, E., Bonting, K., Smith, M., Ten Brink, B., Kamerling, J., Vliegthart, J., Dijkhuizen, L.** (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3008-3014
- Van Kranenburg, R., Boels, I. C., Kleerebezem, M., de Vos, W. M.** (1999a) Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 498-504.
- Van Kranenburg, R., van, S., II, Marugg, J. D., Kleerebezem, M., de Vos, W. M.** (1999b) Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *Journal of Bacteriology* 181: 338-340.
- Vuyst, L., Degeest, B.** (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 153-177.
- Wang, X. and Gibson G.** (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 75: 373-380.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K.** (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews* 163: 19-34.
- Whitfield, C.** (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry* 75: 39-68.
- Whitfield, C., Larue, K.,** (2008) Stop and go: regulation of chain length in the biosynthesis of bacterial polysaccharides. *Nature Structural and Molecular Biology* 15: 121-123.

- Whitfield, C., Roberts, I. S.** (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 31: 1307-1319.
- Yasuda, E., Serata, M., Sako, T.** (2008) Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4746-4755.
- Yother, J.** (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annual Review of Microbiology* 65: 563-581.
- Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Gordon, S., Wong, S.Y.** (2002) Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry* 277: 41613-41623.
- Zomer, A. L., Buist, G., Larsen, R., Kok, J., Kuipers, O. P.** (2007) Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* 189: 1366-1381.

Annexe 1

Affiche présentée au « 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria » Egmond aan Zee, Netherlands, Aout 2011

Abstract

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M produces much more exopolysaccharide than strain ATCC 9595, even though the 17 ORFs of the EPS biosynthesis operons are 99 % identical. Previous studies showed that RW-9595M produced 543 mg l⁻¹ while ATCC 9595 produced 108 mg l⁻¹ after 24 h fermentation in de Man Rogosa Sharpe broth containing 20 g glucose l⁻¹. In this study, for each strain, genes *wzd* to *wzm* were amplified and cloned into pIL253, while genes *welE* to *wzb* were amplified and cloned into pNZ124. The non-EPS-producing host *Lactococcus lactis* MG1363 was transformed with the two plasmids. Transformants were grown in M17 containing 5 g glucose l⁻¹ at 30 °C for 24 h without pH control. EPS were then isolated and purified from 100 mL of culture and total reducing sugars were measured by the phenol/sulfuric acid method with glucose as a standard. *L. lactis* MG1353 with ORFs from RW-9595M or ATCC 9595 produced 148 and 153 mg l⁻¹ respectively versus 74 mg l⁻¹ from MG1363 containing the two plasmids without inserts. The EPS quantity did not differ between MG1363 strains carrying each of the two EPS operons and production is comparable to that observed previously for other *L. lactis* strains. These results suggest that while *L. lactis* MG1363 cannot produce as much EPS as *L. rhamnosus* RW-9595M, transfer of the operon from ATCC 9595 leads to slightly higher EPS production in *L. lactis*. Future work will determine if the EPS produced by *L. lactis* has the same structure as that produced by *L. rhamnosus*.

Exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* MG1363 using the EPS gene clusters from *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and ATCC 9595



Hye-Ji Kang*, Gisèle LaPointe
 Institute for Nutraceuticals and Functional Foods, STELA Dairy Research Centre, Université Laval, Québec, Qc, Canada, G1V 0A6.
 * Presenting author Email : hye-ji.kang.1@ulaval.ca



Introduction

The functional properties of exopolysaccharides (EPS) in food technology and health are determined by their composition, structure and molecular mass. Genetic manipulation is one approach that can contribute to advancing our understanding of the relationship between structure and function.

Lactobacillus rhamnosus RW-9595M produces large amounts of heteropolysaccharide composed of units containing seven sugars: 2 glucose, 1 galactose and 4 rhamnose. 18 ORFs have been identified as putative EPS biosynthesis genes (Fig. 1). RW-9595M produces much more EPS than strain ATCC 9595, even though the EPS biosynthesis operons are 98% identical [2]. RW-9595M produced 543 mg l⁻¹ while ATCC 9595 produced 108 mg l⁻¹ after 24 h fermentation in de Man Rogosa Sharpe broth containing 20 g glucose l⁻¹.

This study shows that the gene clusters of two strains of *L. rhamnosus*, RW-9595M and ATCC 9595, allow *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 to synthesize EPS that is released into the culture supernatant.

Material and Methods

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strain	Medium & condition
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595	MRS (de Man, Rogosa, Sharpe)
RW-9595M	37 °C
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	M17 supplemented with 0.5% glucose (GM17); 30 °C
Plasmid	Antibiotic selection, size and origin of replication
pIL253	Ery ^r , 4.9 kb, pAMβ1 replicon [3]
pNZ124	Cm ^r , 2.8 kb, pSH71 replicon [4]
pEPS1R and pEPS1A	pIL253 containing 10 kb BamHI-Sall PCR amplicon (genes <i>wzd</i> to <i>wzm</i>) from either RW9595M (R) or ATCC 9595 (A)
pEPS2R and pEPS2A	pNZ124 containing 3.7 kb PvuII-PstI PCR amplicon (gene <i>welE</i> to <i>wzb</i>) from either RW-9595M (R) or ATCC 9595 (A)

DNA Extraction

DNA was extracted from 18-h cultures of *Lb. rhamnosus* for use in PCR.

Plasmid construction

Amplicons were purified, digested and cloned into each vector (Table 1), and then competent cells of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 were transformed with appropriate pairs of recombinant plasmids.

EPS Purification

L. lactis MG1363 carrying each pair of plasmids was incubated at 30°C for 24 h in GM17 and then the EPS was extracted from the culture supernatant [5].

Quantification EPS

EPS quantity is expressed in equivalent glucose units as determined by the phenol/sulfuric acid method [6].

Results

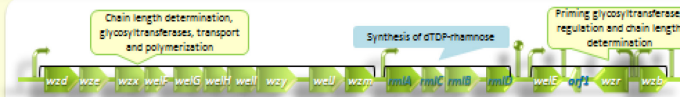


Figure 1. EPS biosynthesis gene clusters from *Lb. rhamnosus* strains RW-9595M and ATCC 9595.

Genes *wzd* to *wzm* (10 kb) were amplified and cloned into pIL253 (Fig 2a), while genes *welE* to *wzb* (3.7 kb) were amplified and cloned into pNZ124 (Fig 2b), for each strain. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 was transformed separately with each pair of plasmids. Genes *rmlA* to *rmlD* were excluded, as *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 can produce the dTDP-rhamnose precursor [7].

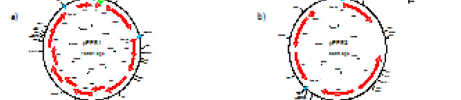


Figure 2. Plasmids with cloned gene clusters from two *Lb. rhamnosus* strains (R: RW-9595M; A: ATCC 9595) a) Genes *wzd*-*wzm*: pEPS1R and pEPS1A b) Genes *welE*-*wzb*: pEPS2R and pEPS2A.



Figure 3. Multichamber red plate assay: a) *L. lactis* MG1363 and b) *L. lactis* MG1363 (pEPS1R and pEPS2R).

When grown on GM17 containing 0.008% ruthenium red, *L. lactis* MG1363 forms small red colonies while *L. lactis* MG1363 with operons from *Lb. rhamnosus* RW-9595M forms large rosy white colonies (Fig. 3).

L. lactis subsp. *cremoris* MG1363 with EPS operons from *Lb. rhamnosus* showed slightly slower growth rate compared with MG1363 containing the two vectors without inserts (Fig. 4).

L. lactis MG1363 with ORFs from RW-9595M or ATCC 9595 produced 148 and 153 mg l⁻¹ respectively versus 74 mg l⁻¹ produced by MG1363 containing the two plasmids without inserts (Table 2).

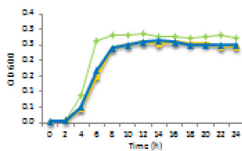


Figure 4. Growth of *L. lactis* in GM17 at 30 °C.

— *L. lactis* MG1363 — *L. lactis* MG1363 (pEPS1R and pEPS2R) — *L. lactis* MG1363 (pEPS1A and pEPS2A)

Table 2. EPS production by three strains of *L. lactis*.

Strain	EPS production (mg l ⁻¹)
MG1363	74.2
MG1363 (pEPS1R, pEPS2R)	148.1
MG1363 (pEPS1A, pEPS2A)	153.3

Discussion and Conclusion

- The mucoid colony phenotype resembles that of the original strain, *Lb. rhamnosus* RW-9595M.
- Gene transfer and EPS production appear to affect the growth rate of *L. lactis* subsp. *cremoris*.
- The 14 genes responsible for EPS production by two *Lb. rhamnosus* strains allow *L. lactis* subsp. *cremoris* to produce EPS at a level that has been observed previously for strains of *L. lactis* [2].
- EPS production by the transformant carrying the RW-9595M operons was much lower than by the original *Lb. rhamnosus* strain RW-9595M. These results suggest that while *L. lactis* MG1363 may not produce as much EPS as *Lb. rhamnosus* RW-9595M, transfer of the operons from ATCC 9595 leads to slightly higher EPS production in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 than by ATCC 9595.

Perspective : The composition and structure of the EPS produced by the *L. lactis* transformants must be determined in order to confirm whether they are identical to the EPS produced by *Lb. rhamnosus*. These gene cassettes can now be used to alter EPS structure and/or size in order to further study the effects on EPS and gene functionality.

References :
 [1] Delbour, N., G. LaPointe. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7414-7420.
 [2] Paenit, B., et al. *Microbiology* 2005, 101:1095-1091.
 [3] Simon, G. *Biochimie* 1996, 70:1059-1066.
 [4] Platousov, C. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70:357-362.
 [5] Corning, J. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70:3914-3919.
 [6] Dubois, M. *Nature* 1956, 206:387.
 [7] Soeda, Y. *J. Bacteriol.* 2004, 186:1229-1242.

Acknowledgement : This work was financially supported by NSERC (Natural Sciences and Engineering Council of Canada).



Annexe 2

Résumé de présentation orale au « 81e congrès de l'Acfas (Association francophone pour le savoir) » Québec, Canada, Mai 2013

Résumé

Étude de l'impact de la phosphorylation de la co-polymérase sur l'interaction entre les protéines du complexe de polymérisation des exopolysaccharides chez *Lactobacillus rhamnosus*

Les propriétés fonctionnelles des exopolysaccharides (EPS) sont déterminées par leur composition, leur structure et leur masse moléculaire définis lors de leur biosynthèse. En plus, la quantité produite peut varier entre les souches. *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et ATCC 9595 possèdent des opérons de biosynthèse des EPS qui sont identiques à 99 %, mais produisent des quantités différentes (543 vs 108 mg l⁻¹). Les souches de *L. lactis* MG1363 transformées avec les opérons provenant de RW-9595M ou ATCC 9595 produisent des EPS (148 et 153 mg l⁻¹), mais avec des rendements inférieurs à la production chez la souche RW-9595M. Les protéines codées par les gènes *wzd* et *wze* sont respectivement une co-polymérase et une kinase qui participent théoriquement à la détermination de la longueur des chaînes d'EPS. Afin de tester l'effet de la phosphorylation sur leurs interactions, les protéines Wzd et Wze ont été exprimés chez *E. coli*. Les deux protéines ne s'autophosphorylent pas lorsque elles sont seules, mais ensemble forment un complexe. Wzd est phosphorylé par Wze et Wzd phosphorylée est requise pour permettre la phosphorylation subséquente de Wze. Wze phosphorylée se dissocie de Wzd. La prochaine étape sera d'évaluer l'effet de mutations sur la fonction de Wzd par l'utilisation des cassettes de gènes transformés chez *L. lactis*. Cette approche peut contribuer à faire progresser notre compréhension de la relation entre les caractères et les fonctions biologiques de ces polymères.

© Hye-Ji KANG