

ÉRIC DION

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU SYSTÈME
D'AVORTEMENT DE L'INFECTION CHEZ *LACTOCOCCUS LACTIS***

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de biochimie et de microbiologie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL

Décembre 1999

© Éric Dion, 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-49011-4

Canada

RÉSUMÉ

Lactococcus lactis est une bactérie employée en industrie fromagère, particulièrement pour la fabrication du fromage Cheddar. Son rôle d'acidification du milieu peut être entravé partiellement ou totalement par des bactériophages, engendrant des pertes économiques considérables. Certaines souches bactériennes possèdent intrinsèquement un ou des mécanismes de résistance contre les phages. Parmi ceux-ci, l'avortement de l'infection (abi) est l'un des plus efficace. Ce travail a permis la découverte et la caractérisation d'un nouveau système plasmidique de type abi, nommé pED1. Provenant d'un lactocoque isolé du lait cru, il est efficace contre l'espèce phagique 936, la plus problématique en Amérique du Nord. Comparativement à la souche sauvage infectée par le phage p2 (espèce 936), un million de fois moins de plages de lyse sont observées si la souche contient pED1. Sept pourcent des cellules infectées relarguent des virions et le cas échéant, dix fois moins de phages sont libérés. Jusqu'à présent, pED1 est le premier système abi à être disponible au Canada sans restriction de brevet et pourrait potentiellement être exploité commercialement.



Eric Dion



Sylvain Moineau,
directeur

AVANT-PROPOS

Comme pour toutes les autres activités qui nous intéressent, la maîtrise quand on est dedans, on n'a jamais le temps de tout faire ce que l'on voudrait faire et quand on l'a terminée, on trouve que ça s'est trop vite passée. Heureusement que la vie est ainsi faite. Parce que malgré tout, il faut de la détermination, de la patience et un soupçon de chance!

De la chance j'en ai eue, j'ai rencontré le Dr Sylvain Moineau alors que j'étais encore étudiant au baccalauréat, quelques mois après son arrivée à l'Université Laval. Moi qui voulais œuvrer dans le secteur alimentaire, voilà que je fais partie de l'équipe du seul professeur du département qui y est impliqué. Il m'a accordé sa confiance et je lui en suis très reconnaissant.

Sylvain est un professeur qui ne ménage ni son temps ni ses énergies pour ses étudiants et son laboratoire. Les connaissances acquises, issues de son encadrement, me permettront de mener à bien les projets que j'entreprendrai.

Je me souviendrai toujours de ces belles années passées en compagnie de la gang du labo qui forme probablement la plus grande équipe de recherche au pays sur les lactocoques et les phages de l'industrie laitière. L'atmosphère de camaraderie qui y régnait contribuait à faciliter le travail. Je me rapellerai aussi de nos activités de loisirs : canot à glace, camping, cabane à sucre, mes premiers congrès, les p'tits restos, etc. Méchante belle gang (Denise, Frédéric, Hélène, Isabelle, Julie, Karidia, Line, Martin, Nathalie, Sandra, Steve, Sylvain), sans oublier les stagiaires et tous les autres qui sont venus travailler avec nous.

J'ai choisi de vous quitter pour poursuivre mes études de troisième cycle dans le monde des eucaryotes. Ce qui me permet de dire à mes collègues que plus tard vous retrouverez un confrère et non un compétiteur. Partir pour se compléter, plutôt que se concurrencer.

Je remercie toute l'équipe pour leur soutien et plus spécialement Line Berthiaume qui a grandement contribué au projet, particulièrement lors des clonages.

Je remercie les membres de mon comité aviseur qui ont eu la gentillesse d'accepter d'en faire partie et de soumettre leurs idées et commentaires judicieux : Dr André Darveau et Dr Jacques Goulet (aussi codirecteur). Votre intérêt a été grandement apprécié.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui de partenaires industriels que sont Agropur et Quest International ainsi que des organismes subventionnaires ; CRSNG (projet stratégique), GREB (Université Laval, bourse), ADSEG (Université Laval, bourse de congrès), AELIÉS (Université Laval, bourse de congrès).

Les passions drainent souvent beaucoup de temps et ce fut le cas de mon projet. Alors, je tiens à remercier mes amis et ma famille pour leur compréhension. À mes parents et à mon frère, merci de votre support et de vos encouragements. Line, ça a l'air que t'as tellement aimé le projet que t'as décidé de garder le gars qui va avec! Merci pour ton support.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
AVANT-PROPOS	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	XI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 L'HÔTE, LE PARASITE ET LEURS IMPACTS ÉCONOMIQUES	1
1.1.1 IMPACTS ÉCONOMIQUES DES PRODUITS LAITIERS (SURVOL).....	1
1.1.2 LES LACTOCOQUES, GÉNÉRALITÉS	7
1.1.3 BACTÉRIOPHAGES DE LACTOCOQUES	8
1.1.4 CLASSIFICATION DES BACTÉRIOPHAGES ET ÉTUDE DE LEUR GÉNOME.....	11
1.2 LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOPHAGES.....	16
1.2.1 GÉNÉRALITÉS.....	16
1.2.2 INHIBITION DE L'ADSORPTION.....	18
1.2.3 INHIBITION DE LA PÉNÉTRATION DE L'ADN PHAGIQUE.....	19
1.2.4 RESTRICTION/MODIFICATION	19
1.2.5 AVORTEMENT DE L'INFECTION (ABI; ABORTIVE INFECTION)	21
1.2.6 MÉCANISMES ANALOGUES AUX ABI, CHEZ D'AUTRES GENRES BACTÉRIENS.....	25
1.2.7 TENDANCES ET MÉCANISMES DE SYNTHÈSE.....	26
1.3 DÉFINITION DE LA PROBLÉMATIQUE À L'ÉTUDE	28
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
2.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR LA RECHERCHE DE MÉCANISMES ANTI-PHAGES	33

2.2 CROISSANCE BACTÉRIENNE ET MILIEUX DE CULTURE.....	35
2.3 SÉLECTION DES SOUCHES BACTÉRIENNES DANS LE LAIT CRU.....	35
2.4 PRÉPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.....	36
2.5 ÉLECTRO-TRANSFORMATION.....	37
2.6 CRIBLAGE DE TRANSFORMANTS POUR VÉRIFIER LE POTENTIEL ANTI-PHAGE.....	37
2.7 BACTÉRIOPHAGES.....	42
2.8 EFFICACITÉ À FORMER DES PLAGES DE LYSE (EOP).....	42
2.9 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE (ADSORPTION, SURVIE CELLULAIRE, COI, ECOI)	42
2.10 COURBES DE CROISSANCE, RELARGUAGE PHAGIQUE, TEMPS DE LATENCE.....	43
2.11 RÉPLICATION DE L'ADN TOTAL.....	43
2.12 CURE SÉLECTIVE DE LA SOUCHE SMQ-215.....	44
2.13 STABILITÉ PLASMIDIQUE DE PED1.....	44
2.14 CARTOGRAPHIE.....	45
2.15 CLONAGE ET SÉQUENÇAGE.....	45
2.16 PREUVE DE LA NOUVEAUTÉ.....	46
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	47
3.1 SOUCHES ISOLÉES DU LAIT CRU.....	47
3.2 SOUCHES DE PROVENANCE INDUSTRIELLE.....	47
3.3 SOUCHES DE LA COLLECTION DU LABORATOIRE.....	51
3.4 MESURE DE L'EFFICACITÉ À FORMER DES PLAGES DE LYSE.....	51
3.5 EFFICACITÉ À FORMER DES CENTRES D'INFECTION ET RELARGUAGE.....	52
3.6 ADSORPTION PHAGIQUE ET SURVIE CELLULAIRE.....	52
3.7 COURBE DE CROISSANCE DU PHAGE P2 SUR SMQ-215 (PED1).....	53
3.8 RÉPLICATION DE L'ADN TOTAL.....	53
3.9 STABILITÉ THERMIQUE DE L'EFFET DE PED1.....	64
3.10 STABILITÉ PLASMIDIQUE DE PED1.....	64
3.11 INFORMATIONS TIRÉES DE LA SÉQUENCE DU PLASMIDE PED1.....	64
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	90
A. LE PLASMIDE PED1.....	90
B. L'ANALYSE DE LA SÉQUENCE DE PED1.....	95

<i>L'origine de transfert</i>	95
<i>Le réplicon</i>	98
<i>L'orfX et la sous-unité S de spécificité (hsdS)</i>	99
<i>La pyrrolidone-carboxylate peptidase</i>	100
<i>Les séquences d'insertion</i>	100
<i>Le cadre de lecture ouvert (orf 5) de 998 acides aminés</i>	101
<i>L'invertase/résolvase (recombinase; lin)</i>	102
<i>Les cadres de lecture ouverts 7 et 8</i>	103
CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE	110
ANNEXE	129
SÉQUENCE DE 12232 PB CONSTITUANT LE PLASMIDE PED1	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Systèmes d'avortement de l'infection répertoriés chez <i>L. lactis</i>	30
Tableau 2	Origine du matériel biologique utilisé pour la prospection de mécanismes anti-phages.	34
Tableau 3	Souches bactériennes (autres que celles pour la prospection de résistance aux phages), bactériophages et plasmides utilisés.....	38
Tableau 4	Détermination de l'efficacité des phages p2 et p2k à former des plages de lyse (EOP) pour six transformants issus de préparations plasmidiques de souches de <i>L. lactis</i> isolées du lait cru.....	48
Tableau 5	Effet du plasmide pED1 lors de l'infection par le phage p2 et influence sur le taux de survie de l'hôte	58
Tableau 6	Efficacité de différents bactériophages de l'espèce 936 à former des plages de lyse (à 30°C), en présence du plasmide pED1 contenu dans la souche SMQ-215	59
Tableau 7	Sommaire des caractéristiques des cadres de lecture ouverts contenus dans le plasmide pED1	70
Tableau 8	Sommaire des régions d'ADN du plasmide pED1 ayant une fonction déterminée ou de l'homologie avec des gènes répertoriés dans les banques de données.....	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Principaux secteurs de l'agro-alimentaire au Canada et leur quote-part en fonction des revenus pour l'année 1998.....	4
Figure 2	Exportations canadiennes de fromage Cheddar, depuis 1994	6
Figure 3	Cycle lytique d'un bactériophage présenté en cinq étapes (A-E).....	10
Figure 4	Morphotypes des bactériophages de lactocoques	15
Figure 5	Schéma du criblage des transformants sur boîte de Petri.....	41
Figure 6	Profil plasmidique des souches industrielles de <i>Lactococcus lactis</i>	50
Figure 7	Profil plasmidique des souches de <i>L. lactis</i> de la collection du laboratoire	55
Figure 8	Profil plasmidique de la souche mère de pED1 (<i>L. lactis</i>) et des souches utilisées.....	57
Figure 9	Courbe de croissance du bactériophage p2 lors de l'infection des souches SMQ-16 et SMQ-215	61
Figure 10	Réplication de l'ADN intracellulaire (Southern) chez la souche sensible SMQ-16 (A) et chez la souche résistante SMQ-215 (B), lors de l'infection par le phage p2	63
Figure 11	Carte plasmidique du plasmide pED1 (12232 pb).....	69
Figure 12	Alignement des séquences nucléotidiques de plasmides de lactocoques contenant la séquence des origines de transfert (<i>oriT</i>).....	74
Figure 13	Alignement des séquences nucléotidiques contenant la séquence répétée inverse 3 (IR3) des <i>oriT</i> ; <i>oriT1</i> et <i>oriT2</i> (pNZ4000), <i>oriT</i> de pED1 et <i>oriT</i> du plasmide IncI1 R64	76
Figure 14	Prédiction de la topologie, d'après l'hydrophobicité de la protéine potentielle (998 acides aminés) codée par l' <i>orf 5</i> (d'après le logiciel TopPred 2, Topology prediction of membrane proteins, Stockholm University Theoretical Chemistry Protein Prediction Servers, von Heijne, 1992)	78
Figure 15	Probabilité de la localisation de la protéine potentielle (998 acides aminés) codée par l' <i>orf 5</i> (d'après le logiciel TMHMM, Sonnhammer <i>et al.</i> , 1998).....	80
Figure 16	Alignement de la portion de séquence nucléotidique de l' <i>orf 5</i> présentant de l'homologie de séquence avec <i>abiC</i>	82

Figure 17 Alignement de la portion de séquence protéique déduite de l' <i>orf 5</i> présentant de l'homologie avec <i>AbiC</i>	85
Figure 18 Alignement de la séquence complète du gène <i>lin</i> (<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , no. accession GenBank Z48081) avec la séquence homologue de pED1 (nucléotides 9883 à 10193)	87
Figure 19 Alignement de la séquence protéique déduite du gène <i>lin</i> avec la traduction correspondante de pED1 (séquence de la figure 18, traduite)	89

Liste des abréviations et symboles

% ;	Pourcent
°C ;	Degré Celsius
\$;	Dollars
λ ;	lambda (phage)
a.a. ;	Acide aminé
Abi ;	Abortive infection
ADN ;	Acide déoxyribonucléique
Apld ;	Aborting phage lytic development
ARN ;	Acide ribonucléique
COI ;	Centre d'infection
Da ;	Dalton
ECOI ;	Efficacité à former des centres d'infection
Em ;	Érythromycine
Em ^r ;	Résistant à l'érythromycine
EOP ;	Efficacité à former des plages de lyse
É-U ;	États-Unis
IS ;	Séquence d'insertion
kDa ;	Kilo Dalton
kpb ;	Kilo paires de bases (1000 pb)
M ;	Molaire
μ g ;	Microgramme

mg ;	Milligramme
μL ;	Microlitre
mL ;	Millilitre
mM ;	Millimolaire
n ;	Nombre de répétition
N ;	Normal (normalité, en chimie)
nm ;	Nanomètre
no. ;	Numéro
orf ;	Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
pb ;	Paire de bases
pBS ;	Plasmide pBlue Script II KS
pcp ;	Pyrrolidone carboxylate peptidase
Per ;	Phage-encoded resistance
pH ;	Potentiel d'hydrogène
p/v ;	Poids/Volume
R/M ;	Restriction/Modification
rpm ;	Rotation par minute
SDS ;	Sodium dodécylsulfate
Tn ;	Transposon
Ufp ;	Unité formant des plages

CHAPITRE 1 : Introduction

1.1 L'hôte, le parasite et leurs impacts économiques

1.1.1 Impacts économiques des produits laitiers (survol)

Le secteur agro-alimentaire génère annuellement à l'échelle nationale, des revenus de l'ordre de 57,5 milliards de dollars et les produits laitiers occupent le deuxième rang après les viandes, avec 14% des revenus, soit des retombées économiques de huit milliards de dollars (figure 1). Deux principaux joueurs se divisent le marché canadien de la production de lait, l'Ontario avec 33% et le Québec, bon premier avec 37% des parts. Ce qui signifie des recettes avoisinant un milliard et demi de dollars pour les producteurs laitiers québécois.

Les fromages sont le fer de lance des exportations canadiennes de produits laitiers, avec des ventes supérieures à 144 millions de dollars. Le Cheddar, dont la production nécessite l'emploi de lactocoques (sujet à l'inactivation par les bactériophages), rapporte près de la moitié des recettes, soit 71 millions de dollars. À cela s'ajoutent les ventes pour le marché intérieur, inutile de dire que les revenus en sont décuplés. Au cours des cinq dernières années, la demande à l'étranger pour le Cheddar canadien est en constante progression (figure 2). Rien n'indique que la tendance s'inversera à court terme. Fait à souligner, en 1998, le Québec était le principal producteur de fromage Cheddar, accaparant 50% de la production canadienne.

Donc, l'industrie laitière est un secteur économique très important pour le pays (22 000 emplois seulement pour le secteur de la transformation laitière) et le Québec est la principale province productrice de fromages (57% de la production canadienne en 1997-1998). Le produit vedette étant le fromage Cheddar, il est par conséquent impératif que le Canada et le Québec se dotent d'outils biotechnologiques pour faire face à la vive concurrence à l'heure de la mondialisation des marchés. Au États-Unis, l'utilisation de bactéries lactiques modifiées génétiquement est permise. Quelques mécanismes d'avortement de l'infection sont déjà en

cours d'utilisation (dans des souches de lactocoques) et exploités commercialement. Pour l'instant la législation canadienne en matière de modifications génétiques ne permet pas l'usage de certaines méthodes (électroporation) employées aux États-Unis. Mais d'ici quelques années, si la réglementation est modifiée, nos industries pourront à leur tour augmenter leur compétitivité.

Références (sites web); Centre Canadien d'Information Laitière, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, Commission Canadienne du Lait, Statistique Canada.

Figure 1 Principaux secteurs de l'agro-alimentaire au Canada et leur quote-part en fonction des revenus pour l'année 1998. Centre Canadien d'Information Laitière (<http://www.dairyinfo.agr.ca/>)

59,1 milliards \$ can.

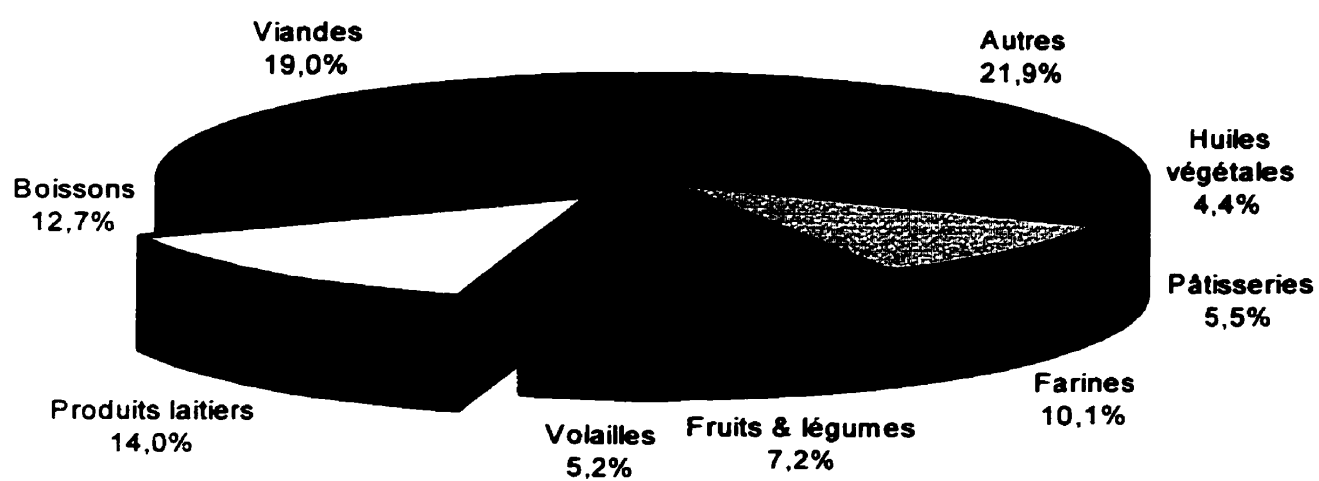
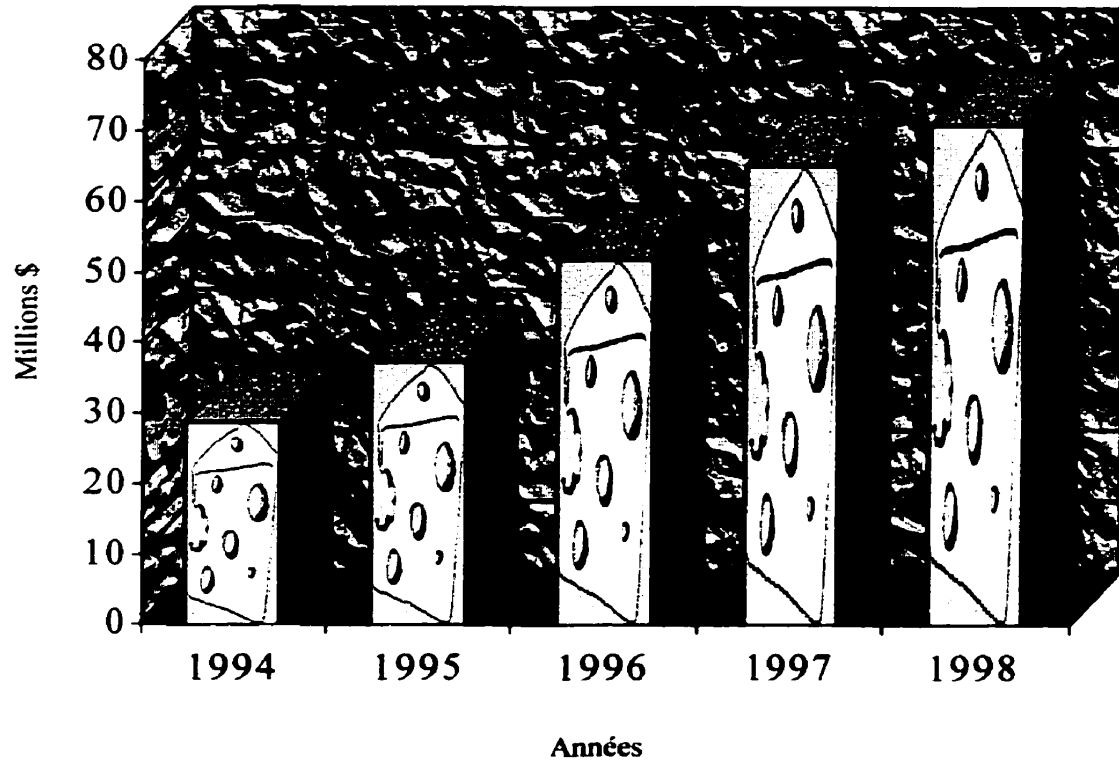


Figure 2 Exportations canadiennes de fromage Cheddar, depuis 1994. Centre Canadien d'Information Laitière (<http://www.dairyinfo.agr.ca/>)



1.1.2 Les lactocoques, généralités

Les lactocoques (coques allongés à Gram positif) font partie du groupe des bactéries lactiques, lequel comprend onze genres (Holt *et al.*, 1994) dont plusieurs ont un usage commercial. Les bactéries lactiques possèdent la caractéristique intéressante d'être généralement reconnues comme sécuritaires (van de Guchte *et al.*, 1992). C'est pourquoi elles sont fréquemment employées pour la fermentation de produits alimentaires. Le contenu nucléotidique de leur génome révèle un pourcentage en guanine et cytosine qui s'élève environ à 37% (van de Guchte *et al.*, 1992).

Cinq espèces composent le genre *Lactococcus* ; *garviae*, *lactis*, *piscium*, *plantarum* et *raffinolactis*. Celle qui nous intéresse particulièrement, de par son utilisation répandue dans la fabrication fromagère (Cheddar), est l'espèce *lactis*. Cette dernière comprend trois sous-espèces ; *cremoris*, *hordinae* et *lactis*, en plus des biovars. Un de leurs dérivés métaboliques, l'acide lactique, permet la coagulation des protéines laitières via une baisse du pH qui résulte du catabolisme du lactose par les voies de la fermentation. Ce « déchet bactérien » sert aussi d'agent de conservation en empêchant la prolifération de plusieurs pathogènes. Le système protéolytique de *L. lactis* est directement impliqué lors de la maturation fromagère puisqu'il dégrade la caséine du lait en petits peptides et en acides aminés, ce qui génère alors des composés reliés aux saveurs ou leurs précurseurs. Ces caractéristiques expliquent l'usage très répandu de ce micro-organisme pour la fabrication d'une gamme étendue de produits laitiers fermentés dont une grande variété de fromages.

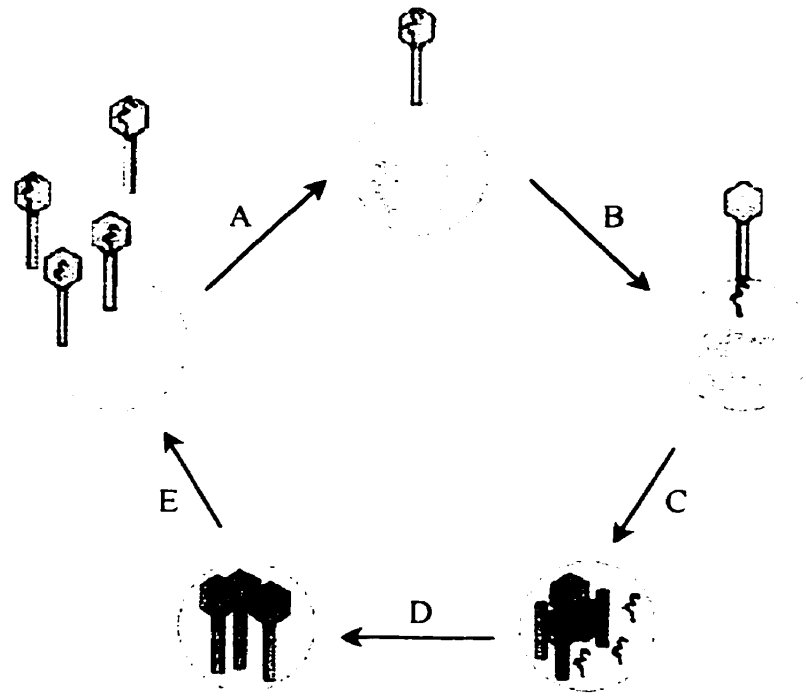
Ces organismes procaryotes sont susceptibles aux infections virales causées par des bactériophages. Lors de la production fromagère à grande échelle, un tel phénomène biologique peut avoir un impact sur le produit fini. Ce problème d'envergure internationale est connu depuis 1935 et de nombreuses études ont été déjà effectuées pour tenter de contrer les effets néfastes des phages.

1.1.3 Bactériophages de lactocoques

Les bactériophages se retrouvent naturellement dans le lait cru et certains peuvent aussi se retrouver dans le lait pasteurisé (Dinsmore et Klaenhammer, 1995). Au sein des usines laitières, le lactosérum est un véhicule de choix pour la propagation virale étant donné sa faible viscosité qui permet aux virus de se disperser aisément (figure 3). En toute logique, il est utopique de croire que les phages pourraient être totalement éradiqués d'une usine. Conséquemment, il faut trouver des moyens palliatifs afin de réduire au maximum l'impact économique négatif engendré par les bactériophages. La rotation des ferments est une stratégie qui permet normalement d'éviter les ratés importants de fermentations. Cela présente l'inconvénient d'augmenter la diversité phagique dans l'usine et d'accroître les risques qu'un ferment résistant ne devienne la proie d'un phage nouvellement présent (Sing et Klaenhammer, 1993). De plus, ce type de système alourdit considérablement la gestion des ferments.

Les fermentations à grande échelle peuvent mettre en présence plusieurs parasites et hôtes. Les conditions sont alors réunies pour qu'il y ait « coinfection hétérogène » (néologisme; infection par des phages différents, de la même espèce ou d'espèces diverses) ou « coinfection homogène » (néologisme; plusieurs virions du même phage).

Figure 3 Cycle lytique d'un bactériophage présenté en cinq étapes (A-E). L'infection entraînera une mobilisation de la machinerie cellulaire pour le bénéfice du virus. A) Adsorption du phage à la cellule, B) Éjection de l'ADN phagique, C) Synthèse d'acides nucléiques et de protéines virales, D) Assemblage des composantes phagiques, E) Libération de virions matures.



d'après; Nauta A., 1997

1.1.4 Classification des bactériophages et étude de leur génome

Grâce à certains critères tels que la morphologie, l'homologie d'ADN, la composition protéique, l'analyse des fragments de restriction, la sérologie, la taille du génome et la spécificité d'infection, il est possible de différencier et donc de classer les phages (Ackermann et DuBow, 1987; Jarvis *et al.*, 1991; Moineau *et al.*, 1993; Maniloff et Ackermann, 1998). La classification des phages de lactocoques s'effectue à la manière d'un arbre généalogique à quatre niveaux. D'abord il y a les familles, au nombre de deux, celle des *Siphoviridae* et celle des *Podoviridae*. Les *Siphoviridae* ont pour caractéristiques morphologiques une tête isométrique ou allongée ainsi qu'une longue queue non contractile. Pour ce qui est des *Podoviridae*, ils ont également une tête isométrique ou allongée mais possèdent une queue très courte. Chacune des familles comporte deux morphotypes (*Siphoviridae* : B1 et B2; *Podoviridae* : C2 et C3) (figure 4). Chacun des morphotypes peut comprendre une ou plusieurs espèces de phages. Les bactériophages de lactocoques se regroupent en 12 espèces différentes (Ackermann et DuBow, 1987). Parmi celles-ci, trois espèces se distinguent des autres par leur occurrence dans le secteur laitier nord américain; 936, c2 et P335 (Moineau *et al.*, 1992; Moineau *et al.*, 1996). Le dernier niveau de « l'arbre » correspond aux phages eux-mêmes. Les espèces 936 et c2 contiennent uniquement des phages lytiques, alors que l'espèce P335 englobe des phages lytiques et tempérés. Quant à l'appellation des phages de lactocoques, à l'instar des coliphages (Freifelder, 1965), des corynebactériophages (Groman et Rabin, 1982) ou corynephages (Groman et Rabin, 1980; Le Marrec *et al.*, 1998) et oenophages (Santos *et al.*, 1998), le néologisme « lactiphages » ou « lactophages » pourrait leur être assigné.

Depuis quelques années le séquençage de génomes phagiques s'effectue (Jarvis *et al.*, 1995) afin de recueillir des informations supplémentaires au niveau moléculaire. Au moins un membre des trois principales espèces de phages de lactocoques rencontrés dans l'industrie laitière nord-américaine a été passé au crible. C'est le génome du phage bIL67 de l'espèce c2 qui a ouvert le bal (Schouler *et al.*, 1994) suivi par le phage c2, de l'espèce du même nom (Lubbers *et al.*, 1995). Quant aux travaux sur le phage sk1 (espèce 936), ils ont porté sur l'analyse de sa séquence d'ADN, l'expression de ses gènes, son origine de répllication et sa

structure modulaire (Chandry *et al.*, 1997). Plusieurs gènes ont pu y être identifiés et un alignement de séquence avec le coliphage λ démontre une correspondance frappante entre la longueur des cadres de lecture ouverts (orf) et le point isoélectrique de leur produit. Les auteurs ont proposé que ce phénomène indique une forte conservation l'organisation génétique entre sk1 et λ , ce qui pourrait servir à prédire les fonctions des produits des gènes du phage sk1. L'espèce P335 est moins problématique (puisque'elle compte des phages tempérés) et le premier représentant de cette espèce à avoir été séquencé est le phage r1t (van Sinderen *et al.*, 1996). Une autre étude comparative de génome a été menée, cette fois en utilisant quatre phages de l'espèce c2 (Perrin *et al.*, 1997). Il en ressort que quelques caractéristiques particulières de la région intergénique *cos*, sont conservés au sein de tous les membres d'une espèce. Un des motifs conservés semble plus général puisqu'il est retrouvé dans les régions *cos* de tous les phages de lactocoques séquencés et pourrait être relié à la spécificité de la terminase. Certains motifs conservés semblent encore plus généraux, car ils sont homologues à des séquences impliquées dans la maturation et l'encapsidation du coliphage λ .

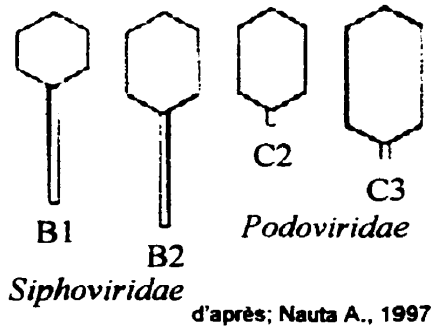
Une meilleure compréhension de la génétique des phages est essentielle et pourrait résulter en la création de nouveaux systèmes de défense à leur endroit. Un article de revue de Djordjevic et Klaenhammer (1997a) fait le point sur l'état des connaissances à propos des gènes phagiques et de leur expression dans des lactocoques. Fait particulièrement intéressant, plusieurs stratégies et mécanismes anti-phages y sont abordés. L'effet de la température étant un effecteur de choix (pour le secteur alimentaire), il fut retenu par une équipe hollandaise afin de mettre au point un répresseur thermolabile de bactériophage utilisable dans un système d'expression (Nauta *et al.*, 1997).

Encore avec l'objectif de construire un système d'expression de grade alimentaire, un promoteur phagique inductible cette fois après l'infection virale, a été caractérisé au niveau moléculaire de même que son activateur transcriptionnel (Walker *et al.*, 1998; Walker et Klaenhammer, 1998). Il a alors été démontré que le promoteur inductible de ce bactériophage lytique avait plus de 95% (jusqu'à 98%) d'homologie avec deux autres phages tempérés à certains endroits de leur génome. De plus, *L. lactis* NCK203 (souche utilisée en laboratoire) contient une séquence homologue à ce promoteur phagique et grâce à la mitomycine C, un

prophage a été induit de cette dernière. Ces résultats tendent à démontrer un mécanisme conservé de régulation et d'expression des gènes entre le phage lytique en question (ϕ 31 de l'espèce P335) et au moins deux autres phages tempérés, en plus de mettre en évidence un lien entre l'évolution de certains phages tempérés et lytiques.

À la fin de 1998, un nouvel outil pour suivre le développement des phages de l'espèce c2 lors de fermentations lactières (ou pour des études génétiques) a fait l'objet d'un article par notre laboratoire. Il s'agit d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines majeures (conformation native) de la capsid de phages de lactocoques de l'espèce c2 (Chibani-Azaïez *et al.*, 1998).

Figure 4 Morphotypes des bactériophages de lactocoques. *Siphoviridae*: morphotypes B1 et B2. *Podoviridae*: morphotypes C2 et C3.



1.2 Les mécanismes de résistance aux bactériophages

1.2.1 Généralités

Outre la rotation des ferments, une autre façon de combattre la prolifération des virus est d'utiliser des souches possédant un système anti-phagique. De tels systèmes peuvent être présents naturellement dans certaines souches, mais grâce la biologie moléculaire, on se dirige vers la construction de systèmes de résistance qui peuvent être transférés dans des souches à fort potentiel commercial (outre le fait qu'elles sont parfois sensibles aux bactériophages). Jusqu'à présent, quatre mécanismes naturels de résistance aux phages de lactocoques ont été répertoriés dans la littérature; inhibition de l'adsorption du phage, inhibition de l'éjection de l'ADN phagique, restriction/modification et avortement de l'infection (Sing et Klaenhammer, 1990; Hill, 1993; Garvey *et al.*, 1995b; Allison et Klaenhammer, 1998). Ils sont habituellement codés sur des plasmides, mais ceci ne constitue pas une règle absolue (Garvey *et al.*, 1995b). Parmi ces quatre groupes, celui de l'avortement de l'infection est le plus efficace (Sing et Klaenhammer, 1990).

La littérature regorge d'informations à propos des bactériophages de lactocoques, de la résistance virale et des ferments lactiques. Les mécanismes de résistance habituels font fi de la présence des virions dans le lait. Par leur action, ils permettront la fermentation malgré la présence de phages. Une autre perspective de la problématique phagique industrielle a été présentée par l'usage d'anticorps. En effet, l'ajout d'anticorps en concentration élevée (Geller *et al.*, 1998) servirait à neutraliser les phages présents dans les cuves de fermentation. Bien que tous les phages n'aient pas nécessairement de souche hôte dans le ferment, ils pourraient être neutralisés. Les anticorps seraient produits par des vaches préalablement immunisées et dont les immunoglobulines (anti-phages) se retrouveraient dans le lait. Le procédé peut être économiquement rentable si le colostrum (premier lait produit en postpartum) est recueilli, puisqu'il est jusqu'à 200 fois plus concentré en immunoglobulines que le lait conventionnel (Geller *et al.*, 1998). L'avantage de cette méthode est qu'elle permettrait de réduire la diversité phagique de l'usine.

Plus un mécanisme de résistance est efficace contre un éventail large d'espèces phagiques, plus il devient intéressant de l'utiliser. Dans cette optique, un moyen visant plus d'une espèce virale (virus d'eucaryotes et de procaryotes) est actuellement en cours d'exploration et concerne l'inhibition de l'assemblage de la capsid virale par une altération du sentier métabolique de la polymérisation (Prevelige, 1998). Généralement, lorsqu'on désire obtenir une souche résistante en vue d'une utilisation industrielle, le choix de la souche s'arrête sur celle qui génère le meilleur produit fini, dans laquelle on insère un système de résistance. Une stratégie inverse a été proposée et a résulté en une souche résistante aux phages, utilisée avec succès lors de la production de Cheddar (O'Sullivan *et al.*, 1998). La souche initiale (*L. lactis* MG1614) était très sensible aux phages et n'avait ni la capacité de fermenter le lactose (lac^-) ni celle de dégrader la caséine (prt^-). Les systèmes de résistance (Abi, adsorption, R/M) ont été successivement ajoutés, puis le plasmide pLP712 fut transféré (lac^+ , prt^+). Résultat, une souche résistante utilisable en fabrication fromagère. Dans le même ordre d'idée de souche contenant plusieurs plasmides, une équipe d'Irlande a identifié quatre plasmides impliqués dans la résistance aux phages (Forde *et al.*, 1999). Parmi ceux-ci, un agit sur l'adsorption (pCI658), deux sont de type R/M (pCI642 et pCI605) et sont requis en simultané pour ce phénotype, le quatrième demeure encore à caractériser (pCI646, code aussi pour l'utilisation du lactose).

Toujours dans l'objectif de contrer la prolifération des phages lors de fermentation de produits laitiers, outre les méthodes biotechnologiques, certaines méthodes physiques pourraient peut-être être envisagées. Ces méthodes ont déjà fait leur preuve pour la santé publique, il s'agit de l'ozonisation et des rayons ultraviolets. Un traitement à l'ozone peut complètement inactiver le bactériophage λ en cinq minutes (Komanapalli et Lau, 1998). Il est important de noter que le milieu dans lequel se trouvent les micro-organismes a un impact majeur quant à l'efficacité de l'ozonisation. Pour ce qui est du rayonnement UV, les bactériophages étudiés (ϕ X174 [*E. coli*], B40-8 [*Bacteroides fragilis*] et MS2 [*E. coli*]) y étaient tous sensibles (Sommer *et al.*, 1998). Est-ce que ces méthodes seraient applicables au traitement du lait avant la fermentation? Ça reste à voir.

Peu importe les mécanismes de résistance utilisés, il ne faut jamais sous-estimer la capacité de mutation et d'évolution des bactériophages. À l'instar des antibiotiques, chaque nouveau système de résistance sélectionnera son mutant résistant, c'est pourquoi il faut une surveillance constante des ferments et des bactériophages présents. Malgré tout, les phages ne sont pas que néfastes en production fromagère. Lorsqu'ils s'intègrent au chromosome de l'hôte (souche lysogène) ils peuvent devenir un atout pour la maturation du fromage (Lepeuple *et al.*, 1998). Bien que ce mémoire concerne essentiellement les lactocoques et leurs bactériophages du secteur laitier, il est bon de souligner que ce type de problématique et de solutions pourraient s'appliquer dans d'autres secteurs qui ont en commun la fermentation (ex. fermentation du soya [Higuchi *et al.*, 1999], production naturelle de vinaigre, vinification [Poblet-Icart *et al.*, 1998], etc).

1.2.2 Inhibition de l'adsorption

L'inhibition de l'adsorption du phage est un terme utilisé pour décrire la résistance caractérisée comme l'incapacité de la particule phagique à s'attacher à la cellule bactérienne empêchant alors l'infection d'avoir lieu (Hill, 1993; Dinsmore et Klaenhammer 1995; Garvey *et al.*, 1995b). Cette inhibition de l'adsorption peut être obtenue de deux façons différentes ; soit les récepteurs cellulaires utilisés par le phage sont absents, altérés, modifiés, ou que ces récepteurs sont masqués par une substance produite par la cellule. En ce qui a trait aux récepteurs, il est fréquent de retrouver des bactéries mutantes insensibles aux phages. On suppose que la résistance origine d'une mutation simple dans le gène codant pour le(s) «récepteur(s) phagique(s)» puisque le taux d'accumulation des variants insensibles aux phages est similaire à celui attendu pour les mutations ponctuelles ou celles de déplacement du cadre de lecture (King *et al.*, 1983; Garvey *et al.*, 1995b). À ce jour, au moins sept plasmides codant pour l'inhibition de l'adsorption ont été isolés de plusieurs souches insensibles aux phages (Garvey *et al.*, 1995b). Ils semblent agir en blindant les récepteurs avec un composé contenant du galactose et/ou rhamnose et/ou de l'acide lipotéichoïque. Peu importe la substance en cause, l'effet consensus est une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire de l'hôte résistant (Garvey *et al.*, 1995b). Une autre étude, passée sous silence par plusieurs

revues sur le sujet, traite d'inhibition de l'adsorption engendrée par une protéine de 30 kDa, dont le déterminant génétique serait d'origine plasmidique (Akçelik et Tunail, 1992). Certains auteurs ont démontré que des événements de co-intégration plasmidique pouvaient engendrer un phénotype de mutant insensible (Harrington et Hill, 1992).

1.2.3 Inhibition de la pénétration de l'ADN phagique

L'inhibition de la pénétration de l'ADN du phage est un mécanisme plutôt rare. En général, le phage s'adsorbe normalement à la surface de la cellule, mais l'ADN phagique n'atteint pas le cytoplasme et le cycle d'infection est évité. Une autre hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène, propose une altération de l'enveloppe qui rendrait les bactéries résistantes à la perforation par la lysine de la queue du phage (Marshall et Berridge, 1976).

Chez les bactéries lactiques, le premier système bloquant la pénétration de l'ADN virale a été rapporté chez *Lactobacillus casei* (Watanabe *et al.*, 1984). Plus récemment, le plasmide pNP40 (*Lactococcus lactis*) a été identifié comme porteur d'un tel mécanisme (Garvey *et al.*, 1996). Dernièrement, un mécanisme du même type aurait été localisé sur le chromosome d'une souche de *L. lactis* (Akçelik, 1998).

1.2.4 Restriction/Modification

Les systèmes de restriction/modification sont relativement fréquents au sein des bactéries lactiques (Dinsmore et Klaenhammer, 1995; Moineau *et al.*, 1995; Nyengaard *et al.*, 1995). Dans la plupart des cas rapportés, les déterminants génétiques sont portés par des plasmides (Dinsmore et Klaenhammer, 1995). La partie enzyme de restriction du système reconnaît et clive l'ADN qui n'a pas été modifié à un site spécifique. L'ADN de l'hôte est protégé de la coupure enzymatique par la partie modification du système qui méthyle l'ADN (au même site de coupure), via la méthylase. Lorsqu'un phage injecte son ADN dans la cellule, il y a une compétition entre l'endonucléase et la méthylase pour le(s) site(s) de

reconnaissance. Lorsque l'enzyme de restriction l'emporte, alors la multiplication du phage est arrêtée.

Toutefois, si l'ADN du phage est modifié avant le clivage, le cycle d'infection se complète. Les systèmes de R/M sont efficaces pour arrêter l'infection phagique à un stade précoce sans pour autant sacrifier la viabilité de la cellule. Le principal inconvénient est la facilité avec laquelle l'ADN d'un phage peut devenir méthylé et passer outre ce système. Dans un tel cas, toute la descendance de ce phage serait alors résistante à ce mécanisme R/M. Le système devient ainsi inefficace et cette conséquence empêche un usage intensif pour de longues périodes. De plus, pour qu'un système de R/M fonctionne, il doit y avoir au moins un site de coupure pour l'enzyme de restriction dans le génome viral.

Bref, c'est le système le plus répandu, mais aussi le plus simple à éviter si on se place dans la «peau» d'un bactériophage. Au cours de l'évolution, les phages ont acquis divers moyens pour contrer les systèmes R/M et permettre leur réplication. En plus de la modification de l'ADN de phages, notons l'inhibition des enzymes de restriction de l'hôte par des protéines virales se liant directement aux enzymes de restriction (Krüger et Bickle, 1983). D'autres phages contournent le problème en incorporant des bases inhabituelles au sein de leur génome. Il s'agit là de bases autres que les quatre bases classiques (adénine, cytosine, guanine et thymine) et dont la synthèse a lieu pendant le métabolisme des nucléotides, ce qui diffère des bases modifiées, lesquelles subissent un ajout après la synthèse de l'ADN. Le génome du phage PBS2 (chez *B. subtilis*) est un exemple d'ADN avec une base inhabituelle, il comporte en partie de l'uracile plutôt que de la thymine. Ce phage produit une protéine qui inhibe l'uracile N-glycosylase de l'hôte, or cette dernière sert à corriger la désamination de la cytosine qui génère alors l'uracile (Karran *et al.*, 1981). Cela a pour effet de diminuer le nombre de sites de restriction dans le génome du phage, le rendant moins sensible aux enzymes de restriction. Une variété de stratégies permettent donc aux phages de contrer les enzymes de restriction de l'hôte et de poursuivre leur cycle infectieux (Krüger et Bickle, 1983).

Certains systèmes R/M n'appartiennent pas au type II, ce qui les rend ainsi plus difficile à caractériser (Garvey *et al.*, 1995b). Les systèmes de type II nécessitent généralement un seul cofacteur, clivent au site de restriction ou près de celui-ci et ont une organisation génétique relativement simple. À l'opposé, les systèmes de type I, III et IV (récemment proposé) peuvent être soit multifonctionnels, avoir de multiples sous-unités, nécessitent davantage de cofacteurs et/ou clivent à des sites aléatoires (Garvey *et al.*, 1995b). Récemment, une étude a été publiée sur le contrôle de l'expression d'une enzyme de restriction, *LlaI*, (O'Sullivan et Klaenhammer, 1998) pouvant servir de mécanisme de résistance aux phages (système R/M complet). Ce système pourrait appartenir à une nouvelle classe de système R/M puisqu'il possède des caractéristiques similaires aux types I et II. Le premier système de R/M de type III chez les bactéries lactiques (et du même coup chez les Gram +) a été caractérisé récemment (Su *et al.*, 1999).

Un groupe de l'INRA (Schouler *et al.*, 1998) a découvert que trois gènes codant pour un système de restriction/modification de type I étaient codés sur le chromosome de la souche *Lactococcus lactis* IL1403. Cette même souche possède aussi un plasmide codant pour la sous-unité HsdS responsable de la spécificité du système restriction/modification. La sous-unité HsdS (codée sur le plasmide) pourrait alors interagir avec les deux sous-unités HsdR et HsdM (codées sur le chromosome) afin de modifier la spécificité du système. Ce qui implique que si un autre plasmide porteur d'une sous-unité HsdS différente était présent dans la souche, une variation de la spécificité serait alors possible. Cela renforce la résistance bactérienne contre l'ADN étranger non-méthylé puisqu'il suffit de varier la sous-unité HsdS pour avoir un système de R/M différent.

1.2.5 Avortement de l'infection (Abi; abortive infection)

Le mécanisme d'avortement de l'infection (Abi ; **ab**ortive **I**nfection) intègre tous les systèmes de résistance aux phages (outre R/M) agissant une fois que l'ADN de ces derniers a été éjecté dans la cellule. Sous le vocable Abi, on retrouve les mécanismes agissant sur la réplication du génome de phage, la transcription, la traduction, l'encapsidation de l'ADN,

l'assemblage, la lyse cellulaire et la libération de virus matures (Hill, 1993; Dinsmore et Klaenhammer, 1995; Garvey *et al.*, 1995b). Autres conséquences d'un système Abi, la cellule infectée meurt et la libération de phages est minimisée ou éliminée (Dinsmore et Klaenhammer, 1997). Phénotypiquement, les Abi sont caractérisés par une absence de plages de lyse ou une réduction de leur taille et une efficacité réduite à former des plages de lyse (EOP). On observe aussi une diminution du nombre de phages relargués (burst size), une diminution de l'efficacité à former des centres d'infection (ECOI) et parfois une augmentation du temps de latence (Hill, 1993). Une caractéristique intéressante à signaler est que lorsque des phages échappent à ces systèmes, ils ne sont pas nécessairement modifiés comme c'est le cas avec les systèmes de R/M. Donc, les générations subséquentes ne sont pas automatiquement résistantes au système Abi qui peut alors continuer à être utilisé. Par contre, des mutants résistants aux systèmes Abi peuvent survenir. Ainsi, pour assurer une certaine pérennité de la résistance aux virus et éviter la propagation de mutants résistants, particulièrement en vue d'une application industrielle, on peut placer plus d'un système de résistance dans une souche. Cette façon de procéder permet d'empêcher la prolifération de phages advenant le cas où un des systèmes anti-phages aurait été contourné, un autre peut alors prendre la relève. Malgré qu'une combinaison de plusieurs systèmes de résistance dans une même souche soit une tendance, une équipe irlandaise a démontré qu'il n'était pas toujours possible de jumeler deux mécanismes Abi ou plus dans une même souche industrielle, spécialement si un mécanisme Abi y est déjà naturellement présent (Coffey *et al.*, 1998). En effet, l'ajout d'un plasmide dans une souche hôte possédant au moins un plasmide est susceptible de provoquer de l'incompatibilité plasmidique.

Pour mesurer l'impact de l'usage d'un Abi dans une souche et les comparer les uns aux autres, il faut vérifier leur efficacité. La plupart du temps l'efficacité d'un mécanisme Abi est évaluée à 30°C, cette température permet autant la croissance de l'hôte que la réplication virale. Certains Abi ont vu leur efficacité aussi estimée à d'autres températures. Dans ce dernier cas, il faut garder à l'esprit que les souches de lactocoques croissent à des températures particulières qui ne correspondent pas nécessairement à la température idéale pour que le cycle lytique d'un bactériophage particulier puisse s'opérer. Donc, le facteur température idéale pour la souche versus celle pour le phage, joue un rôle quant à la résistance aux phages. Si les

mêmes souches hôtes et phages sont utilisés et ce, aux mêmes températures, on peut alors effectivement comparer entre eux, la gamme de températures couverte par divers systèmes Abi.

Près d'une vingtaine de plasmides naturels ont été classés dans le groupe des mécanismes Abi (tableau 1). La quasi-totalité d'entre eux ont une taille située entre 30 et 135 kpb. Les protéines de résistance sont plutôt hétérogènes et les modes d'action pas très connus encore. Toutefois, quelques informations ou indices supplémentaires sur la nature du mode d'action sont disponibles pour certains Abi. Notamment, AbiA qui semblerait bloquer la réplication de l'ADN phagique et AbiC qui inhibe la production de protéines de la capsidie (Moineau *et al.*, 1993). Quant à AbiB, une activité de RNase lui serait associée (Parreira *et al.*, 1996).

Bien qu'ils aient été découverts depuis quelques années, certains Abi demeurent toujours à l'étude dans le but ultime d'élucider leur mode d'action. C'est le cas entre autres d'AbiA, à propos duquel deux articles ont été récemment publiés. Le premier traite d'une région de génome de phage qui serait impliquée dans la sensibilité à AbiA (Dinsmore et Klaenhammer, 1997) et le second (Dinsmore *et al.*, 1998) rapporte qu'un motif «leucine zipper» serait responsable de la résistance conférée par AbiA envers trois espèces de phages (P335, 936, c2). Dans la même veine, AbiD, a été combiné avec AbiE ou F afin de vérifier si un effet de synergie pouvait en résulter (McLandsborough *et al.*, 1998). Contrairement à l'équipe d'Irlande, l'union de deux Abi a très bien fonctionné et un effet de synergie a été observé. Quant à AbiG (qui est composé de deux gènes *abiGi* et *abiGii*), son expression, sa régulation et son mode d'action ont été étudiés (O'Connor, *et al.*, 1999). Les deux gènes sont cotranscrits (2,8 kpb). Toutefois, un autre transcrit de taille inférieure a aussi été détecté. Ce dernier transcrit de 1,5 kpb correspondrait à *abiGii* et peut être causé par un faible terminateur au sein d'*abiGi* ou être le résultat d'une transcription indépendante d'*abiGii* à l'intérieur d'*abiGi*. Il semble qu'AbiG agisse en inhibant la synthèse d'ARN phagique.

Plusieurs nouveaux systèmes Abi ont aussi été publiés depuis le début de ce travail, à commencer par AbiI (Su *et al.*, 1997) qui code pour une protéine de 332 acides aminés. Il est

efficace contre les phages des espèces 936 et c2 mais davantage à 30°C qu'à 37°C. Le fragment de 2,6 kpb contenant le gène *abiI* a été cloné à partir d'un plasmide de 56 kpb. *AbiI* a été découvert par le même groupe de recherche (Deng *et al.*, 1997) et est issu d'un petit plasmide de 16 kpb contenant une région de 1,2 kpb codant pour l'avortement d'infection. L'orf lui-même fait 846 pb comparativement à 996 pb pour *abiI*. Un motif «helix-turn-helix» a été trouvé pour *AbiI*, ce qui pourrait laisser supposer une interaction avec l'ADN de phage. Toutefois, l'efficacité de cet *Abi* est très faible avec un EOP de 10^{-1} .

Notre laboratoire a publié en 1997 un article sur *AbiK* (Emond *et al.*, 1997). Celui-ci fut isolé à partir d'un très petit plasmide d'environ 8 kpb, d'où provient la séquence d'*AbiK* de 599 acides aminés et d'un poids de 71,4 kDa. Il a un EOP de 10^{-6} contre l'espèce 936 et P335 et de 10^{-1} contre l'espèce c2. L'année 1998 compte les publications de trois *Abi*, *AbiN* (Prévost *et al.*, 1998), *AbiO* (Prévost et Ritzenthaler, 1998) et *AbiQ* (Emond *et al.*, 1998). À ce jour, les publications se terminent avec *AbiN* qui offre à peine un EOP de 10^{-1} contre l'espèce c2 et même pas l'équivalent pour l'espèce 936. *AbiN* contient 178 acides aminés (i.e., 534 pb) ce qui correspond à 20,5 kDa. *AbiO* est efficace contre les espèces 936 et c2, il offre un EOP d'environ 10^{-1} contre l'espèce 936 et d'environ 10^{-8} contre l'espèce c2. L'information sur *AbiP* est disponible dans les banques de données mais aucun article n'a encore été publié. Finalement, *AbiQ* a aussi fait l'objet d'une publication par notre laboratoire (Dion *et al.*, 1998; Emond *et al.*, 1998). Le gène fait 549 pb et il confère une résistance contre les phages des espèces 936 et c2. L'ensemble des *Abi* répertoriés dans la littérature ou les banques de données, sont présentés dans le tableau 1 avec quelques unes de leurs caractéristiques particulières.

Sur le nombre d'*Abi* étudiés (tableau 1), seulement trois sont codés sur le génome bactérien (*AbiB*, *AbiH* et *AbiN*). Les gènes *abi* sont habituellement localisés sur des plasmides car l'expression est significativement augmentée lorsqu'il y a plusieurs copies du gène dans la souche (Garvey *et al.*, 1995b; Dinsmore et Klaenhammer 1997; Emond *et al.*, 1997). Mais, il y a des exceptions, puisqu'*AbiD1* est toxique lorsque surproduite dans la cellule (Anba *et al.*, 1995). Il a aussi été suggéré qu'*AbiO* pourrait être toxique

lorsqu'exprimée dans un vecteur plasmidique à haut nombre de copies (Prévost et Ritzenthaler, 1998).

De plus en plus, les travaux portant sur de nouveaux Abi devront s'effectuer avec prudence, étant donnée le nombre grandissant rapporté dans la littérature. En effet, les chances d'en trouver un déjà connu augmentent. C'est d'ailleurs sur quoi s'est butée une équipe irlandaise qui signalait un homologue du gène *abiB* porté sur le plasmide pCI642 (Forde *et al.*, 1999).

1.2.6 Mécanismes analogues aux Abi, chez d'autres genres bactériens

Même si l'avortement de l'infection a été particulièrement fertile en publications chez les lactocoques, il ne s'agit pas là d'un apanage exclusif. Trois systèmes retrouvés chez *E. coli* ont des conséquences analogues aux systèmes Abi. Le premier est composé des protéines RexA et RexB (Snyder, 1995) qui forment un canal ionique dans la membrane cellulaire provoquant un dérèglement de la force proton motrice dont la conséquence inéluctable est la mort de l'hôte bactérien. L'autre utilise le principe de la toxine Hok et de son antitoxine *sok* qui a démontré son efficacité à inhiber le phage T4 (Pecota et Wood, 1996). Hok est une toxine provoquant une perte du potentiel membranaire avec pour conséquence un arrêt de la respiration et finalement la mort cellulaire (Gerdes *et al.*, 1986). L'expression de Hok est prévenu lorsque l'ARN antisens de *sok* vient s'hybrider sur une portion de l'ARNm de *hok*. Une cellule fille dépourvue de *sok* (gène plasmidique) ne pourrait former un ARN antisens prévenant la traduction de *hok*, d'où la mort cellulaire. Après infection par le phage T4, cinq minutes suffisent pour arrêter la transcription et dégrader l'ARNm de *sok* (demie-vie de 30 secondes), alors que 20 minutes sont nécessaires avant que les phages T4 matures puissent être libérés. Laissant ainsi 15 minutes à Hok pour agir et tuer la cellule, ce qui est nettement suffisant. Le troisième système est localisé dans la région *pif* du plasmide F et affecte le coliphage T7 (Cram, *et al.*, 1984). Il semble que dans ce cas, la RNA polymérase de T7 soit requise pour provoquer l'avortement de l'infection. En fait, le système Pif encodé par le

plasmide F induirait une erreur de lecture de l'ARNm par le ribosome, résultant en une suppression du codon d'arrêt ochre. Avec pour effet, une traduction erronée des gènes tardifs du phage provoquant ainsi l'avortement de l'infection (Krüger et Bickle, 1987).

Souvent chez les genres autres que lactocoque, les mécanismes d'avortement de l'infection sont appelés systèmes d'exclusion de phages (Molineux, 1991) ou exclusion de superinfection (Kliem et Dreiseikelmann, 1989). Outre *E. coli*, de tels systèmes ont aussi été rapportés chez *Bacillus subtilis* (Moreno, 1979), *Corynebacterium diphtheriae* (Groman et Rabin, 1980), *Salmonella typhimurium* (Ebel-Tsipis et Botstein, 1971; Susskind *et al.*, 1971, 1974; Susskind et Botstein, 1980) et *Arthrobacter aureus* (Le Marrec *et al.*, 1994; Le Marrec *et al.*, 1998). Caractéristique particulière chez *Arthrobacter aureus*, le phénotype de résistance aux phages, appelé Apld (aborting phage lytic development) est confiné à un minuscule cadre de lecture ouvert de 63 acides aminés (Le Marrec *et al.*, 1998).

1.2.7 Tendances et mécanismes de synthèse

Comme on peut le constater aucun des quatre types de systèmes de résistance naturellement retrouvés chez les lactocoques n'est infaillible. Il est donc sage d'imaginer une combinaison de quelques-uns d'entre eux pour contenir les infections phagiques. Des recherches ont déjà été entreprises dans ce sens. Une équipe américaine (Durmaz et Klaenhammer, 1995) a préconisé la combinaison d'un système R/M et d'un système Abi, le tout inscrit dans une stratégie de rotation des cultures. L'avantage (sans tenir compte de la rotation des ferments) est qu'un phage qui échapperait au système de R/M (et qui serait conséquemment modifié) demeurerait alors à la portée du système Abi. Par contre, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'une charge métabolique supplémentaire pour la cellule hôte et qu'en industrie cela peut se refléter par un ralentissement plus ou moins important de la croissance.

Au cours des dernières années des nouveautés se sont ajoutées aux mécanismes naturels. Les mécanismes dits de synthèse, comprennent la résistance encodée par le phage

(Per ; phage-encode resistance) et la technique de l'ARN antisens. Ces deux méthodes font appel à la technologie de l'ADN recombinant, ce qui les exclut donc (pour le moment) de tout usage industriel potentiel en vertu des dispositions législatives en vigueur dans l'industrie alimentaire. Le principe d'action du mécanisme Per est d'avoir une souche comportant de multiples copies d'un plasmide contenant une origine de répllication de phage. Lorsque la répllication du phage débute, les facteurs de répllication du phage sont titrés par les origines de répllication situées sur les plasmides. Donc, un nombre restreint de facteurs de répllication pourront effectivement initier la répllication du phage. Quant à l'ARN antisens, il s'agit d'un terme utilisé pour décrire l'ARN produit lorsqu'un promoteur est utilisé pour transcrire le brin non-codant d'un gène. Il se produira alors une interférence entre le brin antisens d'ARN et le brin complémentaire d'ARNm (Kim et Batt, 1991a; Kim et Batt, 1991b; Chung *et al.*, 1992). On assume qu'un duplex très instable entre le brin sens et antisens est formé et rapidement dégradé (Hill, 1993). Le résultat est que l'ARNm est «détruit» avant qu'il ne puisse être traduit en protéine, ce qui élimine alors la protéine ciblée.

Certains phages, tel que u136 peuvent acquérir une portion du génome de l'hôte via des événements de recombinaison. En scindant le locus au sein duquel surviennent les recombinaisons, l'évolution et l'émergence de phages mutants peuvent être inhibées (Moineau *et al.*, 1994). Un groupe de l'université d'État de la Caroline du Nord a fait preuve d'une astuce intéressante en utilisant un mécanisme de résistance qui transforme l'hôte bactérien en piège à phage (Djordjevic *et al.*, 1997; Djordjevic et Klaenhammer, 1997b). Il s'agit d'un système d'auto-suicide fortement régulé, dont un promoteur inductible par les phages est placé en amont d'une enzyme de restriction. Ainsi, suite à une infection phagique, l'expression de l'endonucléase induit la mort de la bactérie. Les bactéries qui ne sont pas encore attaquées par les virions peuvent alors poursuivre leur multiplication. La population bactérienne ne peut que croître et celles de bactériophages ne peut que diminuer. Il est à noter que ceci se limite actuellement aux phages de l'espèce P335. Finalement, une stratégie consistant à interrompre un gène chromosomique codant pour une protéine (Pip; phage infection protein) essentielle à l'infection par les phages de l'espèce c2 a aussi démontré son efficacité (Geller *et al.*, 1993; Garbutt *et al.*, 1997).

1.3 Définition de la problématique à l'étude

La fabrication de produits laitiers fermentés exige de la part de l'industrie laitière, l'usage de bactéries. Parmi celles-ci, *Lactococcus lactis* est le procaryote mésophile producteur d'acide lactique le plus couramment utilisé au niveau industriel (Emond *et al.*, 1997). L'infection des cultures de lactocoques par des bactériophages est la cause la plus importante de ralentissements ou de fermentations incomplètes (Klaenhammer, 1989; Dinsmore et Klaenhammer, 1995). Il a été estimé qu'environ 7% de l'ensemble des fermentations laitières sont affectées par des bactériophages. Inutile de dire que les conséquences économiques sont importantes et que la recherche pour obtenir des souches résistantes aux phages est primordiale. De plus, une fermentation incomplète peut engendrer des problèmes d'innocuité alimentaire en permettant la croissance de bactéries pathogènes qui autrement auraient été inhibées du fait de la rapide diminution de pH et/ou de la production d'agents antibactériens (Batt *et al.*, 1995). Un moyen pour obtenir des souches résistantes aux phages pourrait être d'incorporer un mécanisme de résistance dans les souches attaquées par les virus. Pour ce faire, les plasmides sont des vecteurs de choix pour ajouter un mécanisme de résistance dans une souche bactérienne puisqu'ils se transfèrent assez facilement. Parmi les mécanismes de résistance, l'Abi est particulièrement intéressant puisqu'il est fréquemment plasmidique, de taille restreinte et qu'il peut être efficace contre plusieurs phages.

Ce travail sur les bactériophages s'inscrit au sein d'un programme de recherche visant à doter l'industrie laitière canadienne d'outils et de compétences nécessaires à sa compétitivité à l'échelle internationale où l'on constate que de nombreux pays ont déjà accès à un tel programme. Jusqu'à présent, aucun système de résistance aux bactériophages n'est employé au Canada, entre autres à cause des propriétés intellectuelles et commerciales des travaux de recherches antérieurs. Il s'agit donc d'une opportunité unique de se joindre aux leaders mondiaux et de développer davantage les échanges commerciaux.

Les objectifs plus spécifiques à ce projet consistent en la recherche d'un mécanisme anti-phagique naturel isolé de ferments industriels ou d'isolats de lait cru et sa caractérisation. L'étape préliminaire du travail est de cribler le matériel biologique à la recherche de tels

systèmes. L'attention sera portée sur le mécanisme de type Abi, puisque son efficacité est supérieure. Parmi les mécanismes Abi trouvés, le plus efficace sera sélectionné afin de poursuivre les travaux de caractérisation tant moléculaire que microbiologique. Le but ultime serait de pouvoir éventuellement transférer le tout en industrie, mais de nombreux tests devront être réalisés avant d'y arriver.

Avant de partir à la recherche d'un mécanisme de résistance aux phages, deux hypothèses ont été émises. Si le lait cru constitue une niche écologique naturelle des lactocoques et de leurs bactériophages, alors il doit contenir des lactocoques qui sont intrinsèquement résistants à ces virus. De façon analogue, des ferments utilisés pour la fabrication fromagère et qui sont rarement attaqués par des bactériophages, doivent posséder une forme de résistance.

Des critères de sélection ont été avancés afin d'étudier les souches les plus prometteuses. La résistance doit être d'environ un facteur un million (EOP 10^{-6}). Un mécanisme dont le facteur de protection serait de beaucoup inférieur à un million ne saurait protéger assez efficacement un ferment (si employé seul). En effet, un système moins performant résulterait en la libération importante de virions. Avec pour conséquence, l'augmentation marquée de la population virale qui annihilerait ainsi l'effet anti-phage puisque ce dernier serait dépassé par le trop grand nombre de génomes viraux éjectés dans les cellules. La nature plasmidique plutôt que chromosomique facilite beaucoup les manipulations pour une éventuelle transformation du système anti-phagique à des souches industrielles sensibles aux phages. Un plasmide de moins de 16 kpb (environ) serait souhaitable pour faciliter cette transformation. La résistance au moins à l'espèce 936 est exigée, car il s'agit de l'espèce la plus impliquée dans les fermentations défailantes. La résistance à plus d'une des trois espèces les plus problématiques pour l'industrie (936, c2, P335) est évidemment souhaitée. Étant le mécanisme non combiné le plus efficace, celui d'avortement de l'infection est donc particulièrement recherché. Le caractère de nouveauté du système est spécialement intéressant du fait que les notions de propriétés et de brevets ne viennent pas perturber les travaux et publications.

Tableau 1 Systèmes d'avortement de l'infection répertoriés chez *L. lactis**

Abi	Référence	EOP des phages sensibles regroupés selon leur espèce**	Caractéristiques génétiques	Contenu G + C (%)
AbiA	Hill, C., <i>et al.</i> 1989, 1990; Dinsmore P. K., <i>et al.</i> , 1998	936 (sk1) = $< 1,6 \times 10^{-8}$ c2 (c2) = $5,3 \times 10^{-6}$	1 orf, 1887 pb, 628 a.a., orfX en amont	27,5
AbiB	Cluzel, P. J., <i>et al.</i> 1991; Pareira, R., <i>et al.</i> 1996	P335 (ϕ 31) = $5,1 \times 10^{-4}$ 936 (bil170) = 10^{-6}	1 orf, 753 pb, 250 a.a.	27,4
AbiC	Durmaz, E., <i>et al.</i> 1992	936 (p2, j50, sk1) = 10^{-2} à 10^{-3} P335 (UL36) = 10^{-4}	1 orf, 1031 pb, 344 a.a.	27
AbiD	McLandsborough, L. A., <i>et al.</i> 1995	37°C; 936 (sk1), c2 (c2) $\Rightarrow 10^0$ à 10^{-1}	1 orf, 1098 pb, 366 a.a.	29,06
AbiD1	Anba, J., <i>et al.</i> 1995	936 (bil66) $\approx 1 \times 10^{-4}$, (bil170) < 1 c2 (bil67, bil188) = 1×10^{-6}	1 orf, 1056 pb, 351 a.a.	26,5
AbiE	Garvey, P., <i>et al.</i> 1995a	936 (ϕ 712) = $4,0 \times 10^{-4}$	2 orfs , <i>abiEi</i> = 861 pb, 287 a.a., <i>abiEii</i> = 894 pb, 298 a.a.	<i>abiEi</i> = 28,94 <i>abiEii</i> = 28,87 <i>abiEi+Eii</i> = 28,91
AbiF	Garvey, P., <i>et al.</i> 1995a	936 (ϕ 712) = $3,0 \times 10^{-6}$ c2 (c2) = $8,0 \times 10^{-4}$	1 orf, 1026 pb, 342 a.a.	26

Tableau 1 (suite)

Abi	Référence	EOP des phages sensibles regroupés selon leur espèce**	Caractéristiques génétiques	Contenu G + C (%)
AbiG	O'Connor, L., <i>et al.</i> 1996	936 ($\phi 712$) < 10^{-9} c2 (c2) = $2,5 \times 10^{-3}$	2 orfs, <i>abiGi</i> = 750 pb, 249 a.a., <i>abiGii</i> = 1194 pb, 397 a.a., orfX en amont de <i>abiGi</i>	<i>abiGi</i> = 29 <i>abiGii</i> = 27
AbiH	Prévost, F., <i>et al.</i> 1996	936 ($\phi 59$) = 10^{-3} c2 ($\phi 53$) < 10^{-9}	1 orf, 1041 pb, 346 a.a.	26
AbiI	Su, P., <i>et al.</i> 1997	936 ($\phi 712$); $30^{\circ}\text{C} < 10^{-9}$ c2 (c2); $30^{\circ}\text{C} < 10^{-3}$, $37^{\circ}\text{C} = 10^{-2}$	1 orf, 996 pb, 332 a.a.	29,33
AbiJ	Deng, Y. M., <i>et al.</i> 1997	936 ($\phi 712$) = 10^{-1}	1 orf, 846 pb, 282 a.a.	30,39
AbiK	Emond, E., <i>et al.</i> 1997	936 (p2, sk1, j50) = 10^{-6} à 10^{-7} c2 (c2, ml3, eb1) = 10^{-1} P335 (ul36, Q30, Q33) = 10^{-5} à 10^{-8}	1 orf, 1797 pb, 599 a.a.	23,9
AbiL	Deng, Y. M., <i>et al.</i> 1999	936 ($\phi 712$) < 10^{-9} c2 (c2) = 10^{-1}	2 orfs, <i>abiLi</i> = 1374 pb, 458 a.a., <i>abiLii</i> = 891 pb, 257 a.a.	<i>abiLi</i> = 28,8, <i>abiLii</i> = 29,9
AbiN	Prévost, F., <i>et al.</i> 1998	936 ($\phi 59$) < 1 c2 ($\phi 53$) = 5×10^{-2}	1 orf, 537 pb, 178 a.a.	31,28
AbiO	Prévost, F., <i>et al.</i> 1998	936 ($\phi 59$) = $1,0 \times 10^{-2}$ c2 ($\phi 53$) = 10^{-8}	1 orf, 1620 pb, 540 a.a.	26,05
AbiP	Non publié	À déterminer	1 orf, 735 pb, 244 a.a.	27,48

Tableau 1 (suite)

Abi	Référence	EOP des phages sensibles regroupés selon leur espèce**	Caractéristiques génétiques	Contenu G + C (%)
AbiQ	Emond, E., <i>et al.</i> 1998	936 (p2, sk1, jj50) < 10 ⁻⁸ c2 (c21, ml3, eb1) < 10 ⁻⁸ P335 (ul36, Q30, Q33) = 1	1 orf, 549 pb, 183 a.a.	28,3
Abi	Ryan, M. P., <i>et al.</i> 1996; Coakley, M. <i>et al.</i> 1997	936 (φ712) < 10 ⁻⁹ c2 (c2) < 1	À déterminer	À déterminer

* D'après les informations aussi contenues dans Allison et Kiaenhammer, 1998.

** Parmi les espèces 936, c2 et P335.

Abi en caractère gras; systèmes d'avortement de l'infection requérant 2 cadres de lecture ouverts (orf).

CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique pour la recherche de mécanismes anti-phages

Le matériel biologique (tableau 2) pour la recherche de mécanismes anti-phages a été obtenu de deux partenaires industriels, de la collection de souches du laboratoire et d'échantillons de lait cru. Chacune des entreprises a transmis de l'information quant à la fréquence des problèmes de fermentation et des ferments utilisés et/ou de la résistance des ferments envers les phages présents dans leurs usines. Ces informations ont été étudiées en parallèle et les ferments ou souches qui ont eu le moins d'infections répertoriées au fil des ans ont été sélectionnés afin de poursuivre les analyses. Quelques souches de notre collection (SMQ) ont aussi été vérifiées.

Les plasmides des souches d'intérêt ont été extraits et transformés dans une souche hôte (*Lactococcus lactis*) exempte de plasmide et sensible aux phages afin de vérifier si une résistance aux phages était conférée.

Tableau 2 Origine du matériel biologique utilisé pour la prospection de mécanismes anti-phages

Fournisseur	Souches
Entreprise A	NP49-19, PO72-1, PO72-3, PO72-4, PO72-8
Entreprise B	JN, MD
Échantillons de lait cru	1-1 à 1-10, 2-1 à 2-4, 3-1 à 3-4, 4-1 à 4-4, 5-1 à 5-4, 6-1 à 6-4, 7-1 à 7-4, 8-1 à 8-4, 9-1 à 9-4, 10-1 à 10-4, 11-1 à 11-4, 12-1 à 12-4, 13-1 à 13-4, 14-1 à 14-4, 15-1 à 15-4, 16-1 à 16-4, 17-1 à 17-4, 18-1 à 18-4, 19-1 à 19-4, 20-1 à 20-4, 21-1 à 21-4
Laboratoire Dr Sylvain Moineau	SMQ-199, SMQ-201, SMQ-208, SMQ-209, SMQ-210, SMQ-215

2.2 Croissance bactérienne et milieux de culture

Les souches de lactocoques (collection du laboratoire, souches industrielles) ont été cultivées dans le milieu M17 (Difco, Détroit, É-U), supplémenté de 0,5% (p/v) de lactose (BDH, Toronto, Canada) et de 0,3% (p/v) de lait en poudre (Crino, Agropur, Granby, Canada). Par la suite, elles ont été propagées dans un bouillon M17 additionné de 0,5% de glucose (Anachemia, Montréal, Canada) ou sur gélose M17 (1,5% p/v) (Bacto agar, Difco) additionné de 0,5% (p/v) de glucose (GM17). Les incubations ont eu lieu à 30°C, généralement toute la nuit (~14h). Les cultures d'*Escherichia coli* ont été propagées en bouillon ou gélose de milieu Luria Bertani (10 g/L tryptone [trypticase peptone, BBL Becton Dickinson, Cockeysville, É-U], 5 g/L d'extrait de levure [BDH], 5 g/L NaCl [BDH], agar 1,5% p/v). Tous les milieux ont été autoclavés, 15 minutes à 121°C. Lorsque nécessaire, les antibiotiques ont été ajoutés aux milieux stériles : *Lactococcus lactis*; 5 µg/mL chloramphénicol (Sigma, St-Louis, É-U), 5 µg/mL érythromycine (Sigma). *Escherichia coli*; 50 µg/mL ampicilline (Sigma), 10 µg/mL tétracycline (Sigma), 20 µg/mL chloramphénicol.

2.3 Sélection des souches bactériennes dans le lait cru

Des échantillons de lait cru ont été incubés à 30°C (22 h), afin de favoriser la croissance des bactéries mésophiles dans le lait, telle *Lactococcus lactis*. Après dilution (0,1% peptone, VWR, Ville Mont-Royal, Canada), de façon à obtenir des colonies isolées (10^{-6}), une aliquote de 100 µL a été étalée sur milieu gélosé. Les boîtes de Petri ont été à nouveau incubées à 30°C (pour la nuit). Une observation visuelle quant à l'aspect général des colonies a été réalisée et les colonies ont été sélectionnées sur la base de critères morphologiques (forme, pourtour, élévation, couleur, odeur) et l'observation au microscope (coques légèrement allongés formant de petites chaînes). Quelques souches ont aussi été identifiées avec les galeries API 50 CH (bioMérieux, France) pour s'assurer qu'elles possèdent le profil fermentaire typique des lactocoques.

2.4 Préparation de l'ADN plasmidique

Pour favoriser le criblage du contenu plasmidique le plus varié possible, le profil plasmidique des souches a été établi d'après la méthode de O'Sullivan et Klaenhammer (1993b). À partir d'une culture de 16 heures, cinq à dix millilitres ont été centrifugés afin de former un culot (dans un tube Eppendorf). Le culot a été resuspendu dans une solution de sucrose 25% p/v (BDH) contenant 30 mg/mL de lysozyme (Biozyme, St-Romuald, Canada), suivi d'une incubation de 15 minutes à 37°C. Ensuite, pour provoquer la lyse bactérienne, 400 µL de solution alcaline de SDS (3% SDS, 0,2 N NaOH) ont été ajoutés. Après avoir immédiatement mélangé et incubé à la température de la pièce durant sept minutes, 300 µL d'acétate de potassium froid 3M (pH 4,8) ont été ajoutés. À nouveau, il a fallu mélanger (1 seconde au vortex) et centrifuger dix minutes à 4°C à 14000 rpm. Le surnageant (environ 800 µL) a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf auquel 650 µL d'isopropanol (température de la pièce) ont été ajoutés avant de mélanger et de centrifuger dix minutes à 4°C à 14000 rpm. Après quoi tout le liquide a été jeté et le culot resuspendu dans 320 µL d'eau distillée stérile auxquels 200 µL d'acétate d'ammonium 7,5M et 350 µL de phénol/chloroforme (Gibco/BRL, Burlington, Canada) ont été ajoutés. Cette étape a permis de séparer le surnageant contenant l'ADN et les protéines formant une interface blanche. Après avoir mélangé et centrifugé cinq minutes à 14000 rpm (température de la pièce), la phase supérieure a été prélevée et transférée dans un nouveau tube Eppendorf. En combinaison avec une centrifugation de 15 minutes à 4°C à 14000 rpm, l'ajout d'un millilitre d'éthanol 95% (-20°C) a permis de précipiter l'ADN. Le culot a été finalement lavé à l'alcool 70% (température de la pièce) pour enlever les sels présents tout en empêchant l'ADN de se dissoudre. Tout le liquide a été enlevé afin de resuspendre le culot d'ADN dans 40 µL de Tris 10mM, RNase 0,1mg/mL (Boehringer Mannheim, Laval, Canada). La trousse Qiagen Plasmid kit (Qiagen, Chatsworth, É-U) a été utilisée pour une quantité ou une qualité supérieure d'ADN. Le contenu plasmidique a été visualisé par une électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8% (p/v) (Ultrapure, Gibco/BRL, Grand Island, É-U), coloré par trempage de 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium 5 µg/mL (Sigma) et photographié lors d'une brève exposition aux rayons ultra-violet.

2.5 Électro-transformation

L'électroporation a été faite avec le gene pulser II, selon les directives du manufacturier (Bio-Rad, La Jolla, É-U), ainsi que des protocoles éprouvés (Holo et Nes, 1989; Moineau *et al.*, 1994). Dans le but de vérifier la résistance aux phages, les souches hôtes pour les transformations ont été (selon le cas) *Lactococcus lactis* MG1363 ou *L. lactis* LM0230 (tableau 3). Alors que pour les clonages, les souches *Escherichia coli* DH5 α , GM48 et XL-1 Blue, ont été utilisées. Afin de vérifier si l'ADN plasmidique transformé conférait une résistance aux phages chez une souche hôte sensible, une co-électroporation (dans *L. lactis* MG1363) a été effectuée avec le vecteur-navette pSA3 (Em^r) (1 μ g d'ADN/mélange de transformation) et avec l'ADN plasmidique des souches ou isolats sélectionnés. Toutes les souches industrielles ou isolées du lait cru, de même que celles déjà dans notre collection ont vu leur contenu plasmidique extrait et transformé.

2.6 Criblage de transformants pour vérifier le potentiel anti-phage

La méthode des stries croisées a été utilisée pour vérifier la résistance aux phages des transformants. Elle consiste à faire sur un milieu gélosé GM17, une strie du phage p2 (espèce 936) contre lequel on veut tester les colonies et une strie de chacune des colonies croisant celle du phage (figure 5). Essentiellement, environ 5 μ L de lysat cellulaire du phage p2 (1×10^8 ufp/mL) a été prélevée avec un fil à boucle et striée de haut en bas sur la gélose. L'opération a été répétée en striant la seconde strie par-dessus la première, de bas en haut. Par la suite, les colonies bactériennes à tester contre le phage p2 sont prélevées à l'aide de cure-dents stériles et striées de manière à ce que la strie de phages et celle de bactéries forment un angle de 90°. Une croissance bactérienne aussi dense après la rencontre de la strie de phages qu'avant cette dernière, indique une résistance aux phages. Dans quelques cas, la même procédure a été employée en parallèle pour vérifier la résistance au phage c2 (espèce c2). Une centaine de transformants par souche testée ont été ainsi criblés contre les phages.

Tableau 3 Souches bactériennes (autres que celles pour la prospection de résistance aux phages), bactériophages et plasmides utilisés

Bactérie, phage ou plasmide	Caractéristiques particulières*	Source
<i>L. lactis</i>		
LMO230	Hôte pour les phages p2, p2k, sk1, jj50, c21, eb1, ml3, sans plasmide, Lac ⁻	McKay <i>et al.</i> , 1972
MG1363	Hôte pour les phages p2, p2k, sk1, jj50, c21, eb1, ml3, sans plasmide, Lac ⁻ , dérivé de NCDO 712	Gasson, M.J., 1983
SMQ-16	LM0230 (pSA3); Em ^f	Moineau <i>et al.</i> , 1995
SMQ-21	LM0230 (pSA3, pSRQ900); Em ^f , Abi ⁺	Emond <i>et al.</i> , 1998
SMQ-215	LM0230 (pSA3, pED1); Em ^f , Abi ⁺	Cette étude
SMQ-291	MG1363 (pSA3); Em ^f	Emond <i>et al.</i> , 1998
SMQ-502	LM0230 (pED1); Abi ⁺	Cette étude
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 Δlac U169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco/BRL
GM48	<i>thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i>	Stratagene
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac⁻ [F' proAB lacI⁺ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
Phages		
c21	Tête allongée, espèce c2	Emond <i>et al.</i> , 1998
eb1	Tête allongée, espèce c2	Moineau <i>et al.</i> , 1995
ml3	Tête allongée, espèce c2	Moineau <i>et al.</i> , 1995
jj50	Petite tête isométrique, espèce 936	Moineau <i>et al.</i> , 1995
p2	Petite tête isométrique, espèce 936	Moineau <i>et al.</i> , 1995

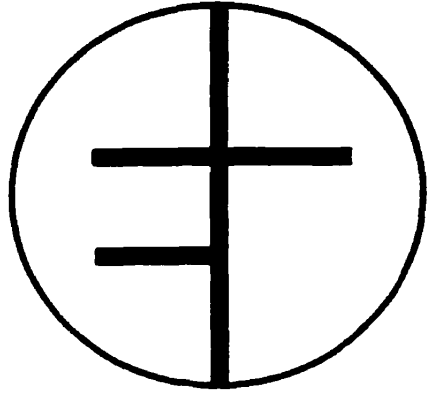
Tableau 3 (suite)

Bactérie, phage ou plasmide	Caractéristiques particulières*	Source
p2k	Petite tête isométrique, espèce 936	Boucher <i>et al.</i> , 1997
sk1	Petite tête isométrique, espèce 936	Chandry <i>et al.</i> , 1997
Plasmides		
pBlueScript II KS	Vecteur de clonage pour séquençage, Ap ^r , 2.9 kpb	Stratagene
pMIG3	Vecteur navette, Cm ^r , 5.5 kpb	Wells <i>et al.</i> , 1993
pNZ123	Vecteur de clonage haute copie pour <i>L. lactis</i> , Cm ^r , 2.8 kpb	de Vos, W. M. 1987
pSA3	Vecteur navette, Cm ^r , Em ^r , Tc ^r , 10.2 kpb	Dao <i>et al.</i> 1985
pTRK333	Vecteur suicide chez les bactéries à Gram + ; Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r , 5.8 kpb	Moineau <i>et al.</i> , 1994
pTRKH2	Vecteur navette, <i>lacZ</i> ; Em ^r , 6.4 kpb	O'Sullivan & Klaenhammer, 1993a
pTRKL2	Vecteur navette, <i>lacZ</i> ; Em ^r , 6.9 kpb	O'Sullivan & Klaenhammer, 1993a

* ; Abi⁺, mécanisme de résistance aux phages ; Ap^r, résistance à l'ampicilline ; Cm^r, résistance au chloramphénicol ; Em^r, résistance à l'érythromycine ; Tc^r, résistance à la tétracycline ; Lac, capacité à fermenter le lactose.

Figure 5 Schéma du criblage des transformants sur boîte de Petri.

phage p2



Souche
résistante
au phage

Souche
sensible au
phage

2.7 Bactériophages

Les phages ont été isolés à partir d'une plaque de lyse, à l'aide d'une pipette stérile (Emond *et al.*, 1997) transférés dans 10 mL de bouillon GM17 additionné de CaCl₂ 10 mM (Fisher, Fair Lawn, É-U), préalablement inoculé (1%) avec une culture de cellules sensibles (croissance de 15 h). Le mélange a été incubé à 30°C jusqu'à la lyse totale. Le lysat cellulaire a été filtré avec un filtre 0,45 µm (Fisher) (Moineau *et al.* 1992). Le chlorure de calcium (CaCl₂) a été ajouté au milieu afin de permettre l'adsorption des phages. Le titre (concentration de bactériophages) a été déterminé en mettant en présence une aliquote de lysat phagique dilué et une culture de cellules sensibles, le tout étalé sur gélose GM17 + CaCl₂ et incubé à 30°C (Jarvis, 1978). Les différents phages utilisés sont présentés dans le tableau 3.

2.8 Efficacité à former des plages de lyse (EOP)

L'EOP a été évaluée en effectuant un ratio du nombre de plages de lyse obtenues en infectant une souche résistante, versus le nombre de plages de lyse obtenues sur une souche sensible (Sanders et Klaenhammer, 1980).

2.9 Caractérisation phénotypique (adsorption, survie cellulaire, COI, ECOI)

Le pourcentage d'adsorption des phages aux cellules a été mesuré en comparant le nombre de plages de lyse formées par les particules virales non-adsorbées aux cellules sensibles versus la quantité de plages de lyse formées par l'ensemble des particules virales ajoutées aux cellules (Sanders et Klaenhammer, 1980). Les essais de survie cellulaire ont été faits en comparant le nombre de colonies formées en absence et en présence de phages, en utilisant un ratio phages/cellules (multiplicity of infection, MOI) de cinq (Behne et Malke, 1978). La détermination du nombre de centres d'infection (COI) a été effectuée tel que précédemment décrit pour le titre de phages, en utilisant un MOI de cinq (Moineau *et al.*, 1993) mais en étalant le mélange phage-hôte sur une souche sensible (SMQ-16) et en

dénombrant les plages de lyse formées. L'efficacité à former des centres d'infection (ECOI) a été évaluée par le rapport du nombre de COI obtenu avec une souche résistante et celui obtenu avec une souche sensible (Moineau *et al.*, 1993).

2.10 Courbes de croissance, relarguage phagique, temps de latence

Pour la courbe de croissance, les souches bactériennes requises (SMQ-16 [souche sensible], SMQ-215 [souche résistante]) ont été inoculées la veille dans un milieu avec antibiotique (érythromycine). Le jour même, les souches ont servi à inoculer (à 4%) un milieu GM17 sans antibiotique et se sont développées jusqu'à une densité optique ($\lambda = 600$ nm) de 0,8 ($= 8 \times 10^8$ ufc/mL). Deux millilitres de culture ont été prélevés, auxquels le phage p2 (MOI = 0,1) et le CaCl_2 (10 mM) ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été incubé à 30°C durant cinq minutes, pour permettre l'adsorption des phages. Une centrifugation d'une minute (14000 rpm) a suivi et le culot a été lavé à deux reprises avec du milieu frais GM17 + CaCl_2 . Le culot a été resuspendu et dilué, afin d'obtenir entre 30 et 300 plages de lyse par gélose. Une aliquote de 100 μL a été prélevée et ajoutée à 3 mL de gélose molle (GM17 + CaCl_2) contenant déjà 100 μL de cellules sensibles. Le mélange a été versé sur une gélose GM17 + CaCl_2 . La méthode a été réalisée en triplicata. La quantité de bactériophages libérés a été estimée en divisant le titre phagique moyen du plateau supérieur de la courbe de croissance par celui du plateau inférieur de la même courbe (Moineau *et al.*, 1993). Le temps de latence a été évalué à partir de la courbe de croissance du phage et correspond au temps écoulé entre le moment où les virions sont mis en présence d'hôtes (temps zéro) et le premier point d'inflexion de la courbe qui mène au plateau supérieur.

2.11 Réplication de l'ADN total

L'expérience a été réalisée à la suite d'une infection (MOI = 1) par le phage p2 des souches SMQ-16 et SMQ-215. L'infection, l'échantillonnage ainsi que l'extraction et la purification d'ADN total, ont été fait selon la méthode de Hill *et al.*, 1991. L'ADN a été digéré

avec l'enzyme *EcoRV* selon les directives du fabricant (Boehringer Mannheim, Laval, Canada) et chauffé à 65°C avant séparation par électrophorèse (gel d'agarose 0,8%). Le contenu du gel a été transféré sur une membrane de Nylon (Boehringer Mannheim) par capillarité (Sambrook *et al.*, 1989). Les sondes d'ADN ont été préparées par la digestion *EcoRV* du génome du phage p2 et le marquage de ces fragments avec la trousse DIG-High Prime (Boehringer Mannheim). Toutes les étapes jusqu'à la détection ont été faites selon les recommandations du fabricant (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim). Le tampon DIG Easy Hyb fut employé pour les différentes hybridations et le CSPD comme substrat chémiluminescent pour la détection (Boehringer Mannheim).

2.12 Cure sélective de la souche SMQ-215

La souche SMQ-215 (pSA3, pED1) a été curée du plasmide pSA3, par repiquage successif en bouillon GM17, sans antibiotique. La souche a étéensemencée avec un fil à boucle et incubée à 30°C pour la nuit. Ce processus a été repris sept fois consécutives. La sensibilité de la souche curée vis-à-vis l'érythromycine a été démontrée en inoculant une gélose GM17+Em. Afin de confirmer la perte du plasmide pSA3 et la présence du plasmide pED1, une extraction d'ADN plasmidique a été effectuée. Pour s'assurer de l'authenticité de la souche, la spécificité des récepteurs phagiques a aussi été exploitée (la résistance au phage p2 et la sensibilité au phage c21).

2.13 Stabilité plasmidique de pED1

De façon analogue à la cure sélective de la souche SMQ-215 (section 2.12), la souche SMQ-502 (pED1⁺) a été repiquée (approximativement aux 18 heures) dans le milieu GM17 sans antibiotique huit fois en six jours (incubation à 30°C). Une aliquote du huitième repiquage a servi à strier une gélose GM17 afin d'obtenir des colonies isolées. Les 112 colonies obtenues ont ensuite été repiquées (16/gélose x 7 Petri) sur gélose GM17 additionné

de CaCl_2 10 mM. Sur chacune de ces 112 colonies, 5 μL d'une dilution 10^{-3} du phage p2 (titre = $1,2 \times 10^9$ ufp/ml) ont été déposés, ce qui correspond à 5×10^3 ufp. Les cellules qui n'étaient pas lysées sont présumées contenir le plasmide pED1.

2.14 Cartographie

La cartographie de pED1 a été faite à l'aide de l'analyse de séquence, confirmée par digestions enzymatiques (*Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nco*I, *Sca*I, *Sly*I, *Xba*I) afin de procéder au clonage de ce plasmide. La carte complète de pED1 est présentée à la figure 11. Parmi les enzymes les plus fréquemment utilisées en biologie moléculaire pour les clonages et qui ne possèdent pas de site de restriction dans pED1, notons; *Apa*I, *Ava*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*II, *Cla*I, *Kpn*I, *Nde*I, *Not*I, *Nru*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Sa*II, *Sma*I, *Sph*I et *Xho*I.

2.15 Clonage et séquençage

Des fragments du plasmide pED1 ont été clonés dans le plasmide pBlueScript KS (Stratagene, La Jolla, É-U) en vue d'en obtenir la séquence. Toutes les enzymes utilisées l'ont été selon les directives du fabricant (Boehringer Mannheim). Les clones ont été envoyés au service d'Analyse et de Synthèse d'oligos du pavillon Charles-Eugène-Marchand (Université Laval) qui a procédé par séquençage automatique (model 373S automated DNA sequencing system with upgrade XL, Applied Biosystems) en utilisant le ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA Polymerase FS, selon les directives du fabricant (Applied Biosystems, Foster City, É-U). Les amorces universelles Reverse (M13, position -48) et Forward (M13, position -47) ont servi à séquencer les deux brins d'ADN. La synthèse d'oligonucléotides a été confiée à la compagnie Life Technologies (produits Gibco/BRL, Grand Island, É-U). La séquence complète de pED1 a été obtenue en procédant par marche sur le plasmide pED1 et les clones dans pBS.

2.16 Preuve de la nouveauté

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'homologie entre les systèmes d'avortement de l'infection répertoriés dans la littérature et pED1, la séquence complète de ce dernier a été soumise aux banques de données Genbank et EMBL. Les logiciels du Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) ont été utilisés pour analyser les séquences d'ADN ainsi que les protéines, déduites des séquences nucléotidiques. Le logiciel BLASTN 2.0.8 (Altschul *et al.*, 1997) a été utilisé pour la vérification de l'homologie d'ADN.

CHAPITRE 3 : Résultats

3.1 Souches isolées du lait cru

Sur l'ensemble des 90 colonies sélectionnées initialement à partir d'échantillons de lait cru, 27 satisfaisaient aux critères minimaux des lactocoques et ont été analysées pour vérifier si elles étaient porteuses d'un mécanisme de résistance aux bactériophages. Tous ces isolats pouvaient évidemment croître dans le lait. Après extraction de leurs plasmides et électroporation dans *L. lactis* MG1363, le criblage selon la méthode des stries croisées a été effectué. Six colonies de *L. lactis* MG1363 semblaient alors être devenues résistantes au phage p2 et/ou p2k. Ces six transformants résistants ont ensuite été testés de façon à en déterminer l'EOP (tableau 4).

Un patron de fermentation (galerie API50CHL) a été établi pour les isolats 1-1 c, d, e, f, g et 7-4a. Tous possèdent les caractéristiques de fermentation reconnues pour les lactocoques, sauf l'isolat 1-1 f qui ne fermente que cinq sucres (trois monosaccharides [D-fructose, D-glucose, D-mannose] et deux disaccharides [maltose, tréhalose]), soit moins que la moitié des substrats fermentés par les autres. De plus, les souches 1-1 c, d, e et g s'agglutinent lorsqu'elles poussent dans le milieu GM17, ce qui résulte en la formation d'un culot de cellules.

3.2 Souches de provenance industrielle

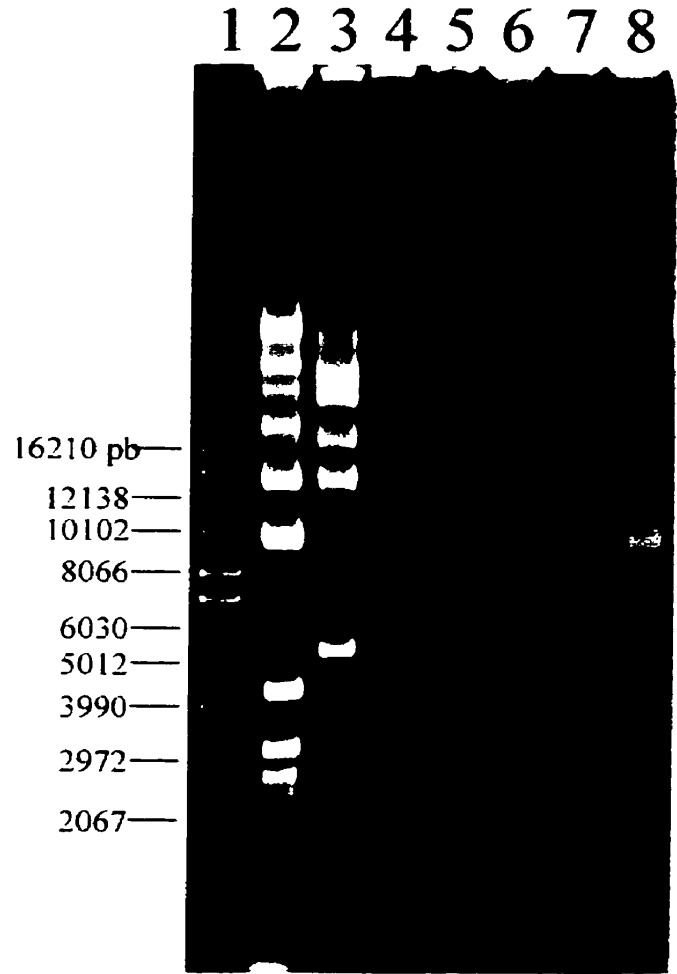
Toutes les souches (sept) ont poussé dans le milieu LM17 additionné de lait 0,3%. Les souches JN, MD et NP49-19, ont coagulé le lait (11%). Alors que les souches PO72-1, 3, 4 et 8 ne le peuvent pas et poussent faiblement dans le milieu Elliker. Aucune souche industrielle n'a conféré de résistance suffisante contre le phage p2, en utilisant la méthode des stries croisées. Toutefois, elles possèdent toutes au moins un plasmide (figure 6).

Tableau 4 Détermination de l'efficacité des phages p2 et p2k à former des plages de lyse (EOP) pour six transformants issus de préparations plasmidiques de souches de *L. lactis* isolées du lait cru

Souches	EOP (n = 3)	
	Phage p2	Phage p2k
MG1363*	1,0	1,0
1-1 c	$<1,7 \times 10^{-9}$	$3,8 \times 10^{-9}$
1-1 d	$<1,7 \times 10^{-9}$	$5,8 \times 10^{-10}$
1-1 e	$1,7 \times 10^{-9}$	$<5,8 \times 10^{-10}$
1-1 f	$<1,7 \times 10^{-9}$	$<5,8 \times 10^{-10}$
1-1 g	$<1,7 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-9}$
7-4 a	$<1,7 \times 10^{-9}$	$<5,8 \times 10^{-10}$

* ; souche hôte

Figure 6 Profil plasmidique des souches industrielles de *Lactococcus lactis*. Puits 1 : Super coiled DNA ladder (Gibco/BRL), Puits 2 : MD, Puits 3 : JN, Puits 4 : PO72-1, Puits 5 : PO72-3, Puits 6 : PO72-4, Puits 7 : PO72-8, Puits 8 : NP49-19. Électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.



3.3 Souches de la collection du laboratoire

Les souches de *L. lactis* SMQ-201, 208, 209, 210 et 215 se sont développées très rapidement dans le lait reconstitué (11%). Seulement la souche SMQ-199 a eu de la difficulté à croître dans le lait et le milieu Elliker. Le contenu plasmidique des souches a été vérifié et est présenté aux figures 7 et 8. SMQ-208 et SMQ-210 initialement considérées comme deux souches distinctes se sont avérées identiques sur la base de leur profil plasmidique. Pour cette raison, seule SMQ-210 a été conservée pour la suite des tests.

La souche SMQ-215 a été construite (par le Dr Sylvain Moineau) en co-électroporant simultanément le vecteur pSA3 avec le contenu plasmidique d'une souche de *L. lactis* antérieurement isolée du lait cru (ayant démontré des indices d'une résistance aux phages). Le tout ayant été transformé dans la souche hôte *L. lactis* LM0230, sensible aux bactériophages des espèces 936 et c2, en plus d'être dépourvue de plasmide. Outre la bande de 10,2 kpb du plasmide pSA3, une bande supplémentaire de 12,2 kpb représentant le plasmide nommé pED1 est visible (figure 8). Cette souche est résistante aux phages de l'espèce 936.

Sur 400 transformants criblés (100/souche SMQ-199, 201, 209, 210) aucun n'a démontré de résistance contre le phage p2. Le patron de fermentation a aussi été établi pour la souche SMQ-215 et indique que 14 substrats sont utilisés (essentiellement semblables aux isolats 1-1 c, d, e, g et 7-4a, soit; ribose, galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, N acétyl glucosamine, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, amidon, β gentiobiose, gluconate).

3.4 Mesure de l'efficacité à former des plages de lyse

Bien qu'initialement, quelques transformants issus des souches isolées du lait cru paraissaient fort intéressants considérant leur EOP, la souche SMQ-215 a été sélectionnée pour la suite des travaux entre autres parce qu'on y voyait clairement la présence d'un

plasmide. Les EOP de quatre phages de l'espèce 936 ont été réduits au moins à 10^{-5} en présence de pED1.

Pour l'espèce c2, trois phages ont été testés (c2, eb1 et ml3) afin de vérifier si le plasmide pED1 pouvait conférer à son hôte, une résistance contre cette espèce. Il en résulte des EOP de 1,0 qui indiquent que le système anti-phagique encodé sur pED1 ne confère aucune résistance contre les phages de l'espèce c2. La résistance envers l'espèce P335 n'a pas été vérifiée puisque la souche LM0230 n'est pas sensible à cette espèce.

3.5 Efficacité à former des centres d'infection et relargage

La facilité avec laquelle un phage réussit à détourner la machinerie cellulaire de l'hôte à son profit jusqu'à l'ultime étape de lyse cellulaire a un impact direct sur la production fromagère. Une lyse cellulaire rapide va de pair avec une destruction accentuée du ferment. Seulement 6,8% des cellules de SMQ-215 infectées ont libéré effectivement une progéniture phagique dans le milieu (tableau 5).

Les résultats des calculs présentés dans le tableau 5, sont issus des données de la figure 9. L'usage de pED1 permet une réduction de l'efficacité à former des centres d'infection d'un facteur de 15 fois et une diminution de 11 fois du nombre de phages p2 libérés par cellule infectée.

3.6 Adsorption phagique et survie cellulaire

Les résultats d'adsorption et de survie cellulaire sont essentiels afin de discriminer le mécanisme de résistance aux phages parmi ceux répertoriés.

Les cellules sensibles et résistantes présentent un pourcentage d'adsorption similaire (tableau 5). De la même façon, on peut constater que le plasmide de résistance pED1, n'a pas d'influence significative sur la survie cellulaire (tableau 5).

3.7 Courbe de croissance du phage p2 sur SMQ-215 (pED1)

Deux types d'informations sont tirées d'une courbe de croissance. D'abord, une évaluation du temps de latence du virus, i.e., le temps requis pour qu'un cycle lytique soit complété. À la figure 9, le temps de latence du phage p2 est approximativement d'une quinzaine de minutes. L'autre type d'information, concerne la quantité de virions matures libérés en moyenne par une cellule. Il s'agit du ratio entre le nombre de phages dénombrés à la fin du cycle lytique (second plateau, 35-50 minutes) et le niveau basal de virions initialement présents (premier plateau 0-15 minutes). La courbe de croissance présentée avec SMQ-16 est ajoutée à titre comparatif afin de mieux visualiser la différence de relarguage phagique comparativement à une souche résistante.

3.8 Réplication de l'ADN total

Suite à l'infection de la souche sensible SMQ-16 par le phage p2, l'ADN phagique apparaît après 10 minutes, avec un maximum d'ADN à 30 minutes, suivi par une rapide diminution engendrée par la lyse des cellules. Le déroulement chez la souche résistante SMQ-215 est similaire, avec l'apparition de l'ADN à 10 minutes et avec un maximum atteint à 50 minutes, suivi par une diminution d'intensité des fragments d'ADN. Ainsi, l'ADN du phage p2 peut se répliquer même en présence du plasmide pED1. Ce dernier point est déduit d'après la figure 10, où l'on constate que la forme répliquative (circulaire) et mature (linéaire) sont présentes chez la souche sensible tel que démontré par le fragment de 5,3 kpb qui est le produit des fragments *EcoRV* de 4,0 et 1,3 kpb ligués ensemble par leurs extrémités cohésives respectives. Bien que les formes répliquative et encapsidée soient aussi présentes chez la souche résistante, ce qui est démontré de façon analogue à la souche sensible, il faut noter qu'il n'y a pas de lyse cellulaire.

Figure 7 Profil plasmidique des souches de *L. lactis* de la collection du laboratoire. Puits 1 : Super coiled DNA ladder (Gibco/BRL), Puits 2 : SMQ-199, Puits 3 : SMQ-201, Puits 4 : SMQ-208, Puits 5 : SMQ-209, Puits 6 : SMQ-210. Électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

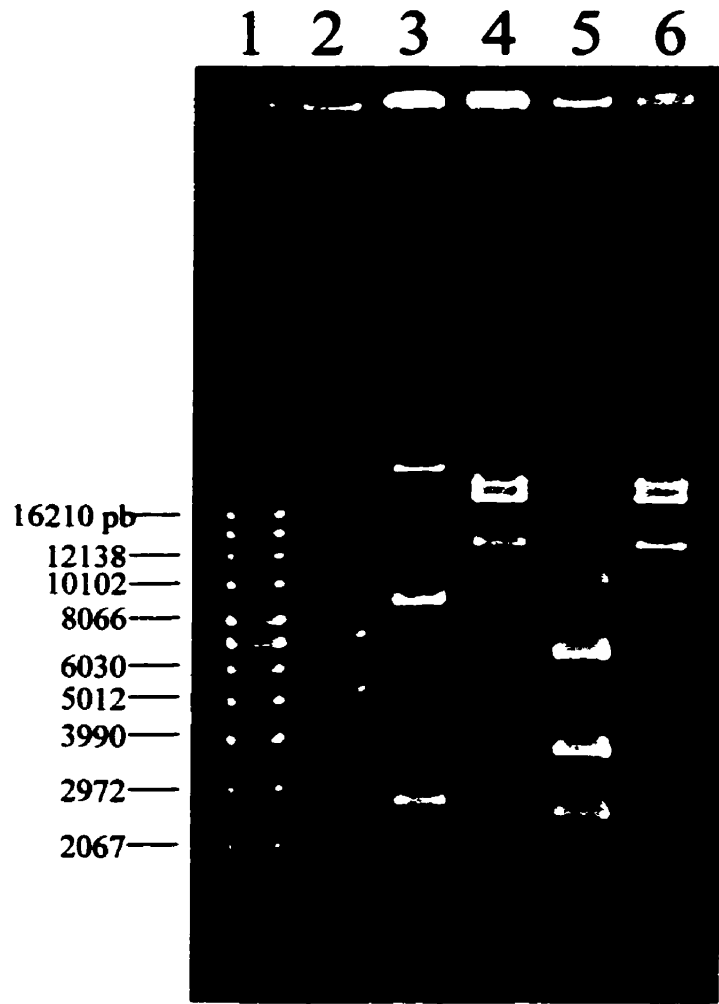


Figure 8 Profil plasmidique de la souche mère de pED1 (*L. lactis*) et des souches utilisées. Tous les échantillons d'ADN ont été digérés avec *EcoRI* durant 16 heures. Puits 1 : 1 Kb DNA ladder (Gibco/BRL), Puits 2 : SMQ-210 (souche sauvage contenant pED1), Puits 3 : SMQ-215 (pSA3 + pED1), Puits 4 : SMQ-502 (pED1), Puits 5 : SMQ16 (pSA3). Électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

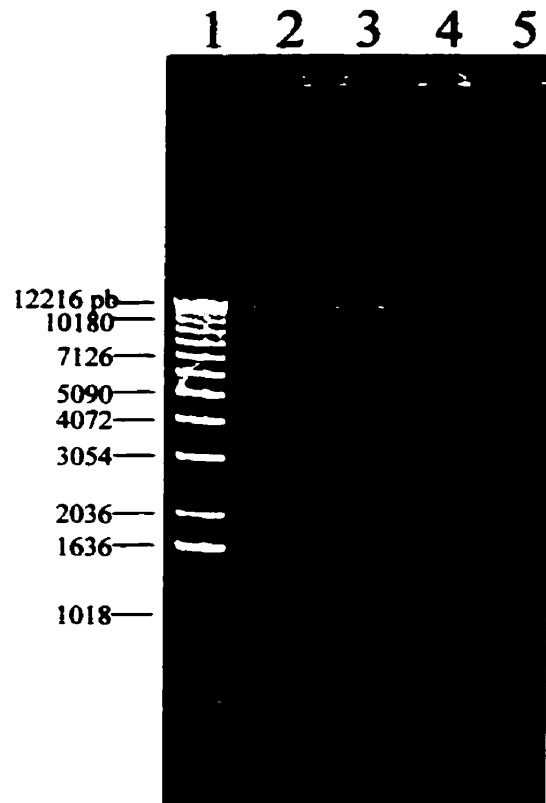


Tableau 5 Effet du plasmide pED1 lors de l'infection par le phage p2 et influence sur le taux de survie de l'hôte

Expériences	Souche SMQ-16 (pED1⁻)	Souche SMQ-215 (pED1⁺)
EOP ^a	1	$9,5 \pm 3,9 \times 10^{-6}$
ECOI ^b (%)	100	$6,8 \pm 3,5$
Relarguage phagique ^b (virions/cellule)	58 ± 14	$5,5 \pm 1,4$
Survie ^c (%)	11 ± 4	16 ± 6
Adsorption ^d (%)	93 ± 3	96 ± 2

a; n ≥ 3 b; n = 4 c; n = 3 d; n = 5

Tableau 6 Efficacité de différents bactériophages de l'espèce 936 à former des plages de lyse (à 30°C*), en présence du plasmide pED1 contenu dans la souche SMQ-215

Bactériophage	EOP**
jj50	$1,9 \pm 0,8 \times 10^{-5}$
p2	$\approx 20^{\circ}\text{C}; 9,8 \times 10^{-6}$ $30^{\circ}\text{C}; 9,5 \pm 3,9 \times 10^{-6}$ $39^{\circ}\text{C}; 2,3 \pm 1,1 \times 10^{-6}$
p2k	$1,4 \pm 0,6 \times 10^{-6}$
sk1	$2,1 \pm 1,4 \times 10^{-5}$

* Sauf pour p2 : $\approx 20^{\circ}\text{C}$ (T° pièce, la nuit), 30°C , 39°C

** $n \geq 3$, sauf p2 à $\approx 20^{\circ}\text{C}$ où $n = 1$, Souche sensible ; MG1363 ou SMQ-16

Figure 9 Courbe de croissance du bactériophage p2 lors de l'infection des souches SMQ-16 et SMQ-215. MOI = 0,1. n = 4 (courbe SMQ-215).

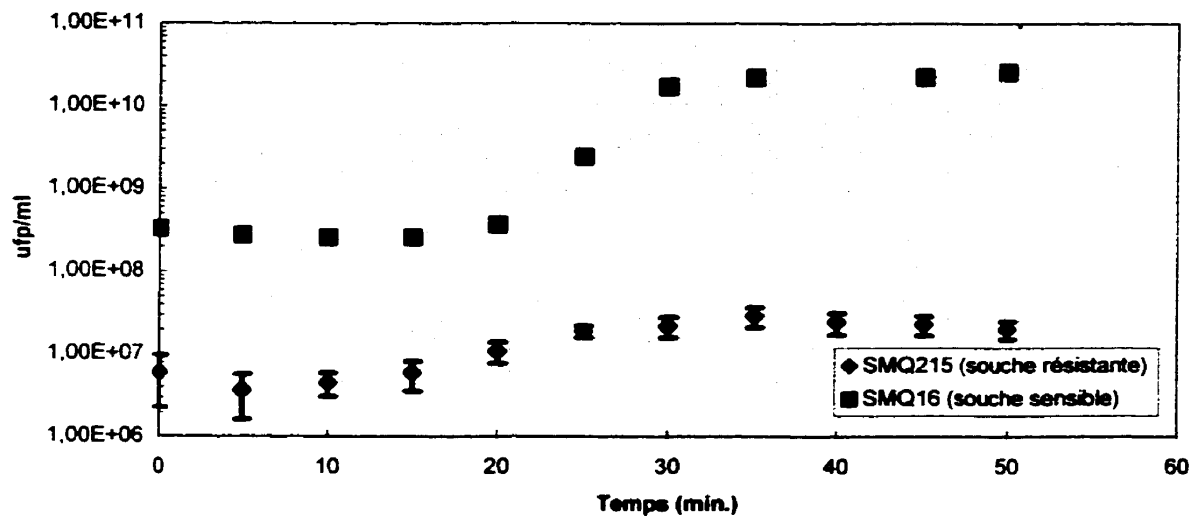
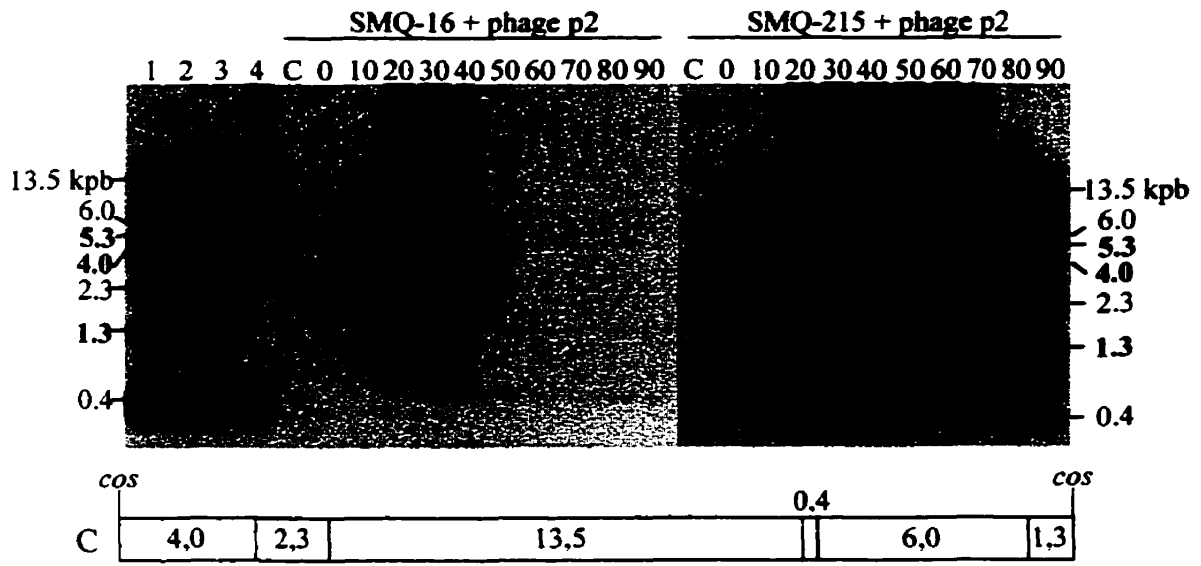


Figure 10 Réplication de l'ADN intracellulaire (Southern) chez la souche sensible SMQ-16 (A) et chez la souche résistante SMQ-215 (B), lors de l'infection par le phage p2. A) Puits; 1 : phage p2 digéré *EcoRV* et chauffé, Puits 2 : phage p2 digéré *EcoRV* non-chauffé, Puits 3 : phage p2 chauffé, Puits 4 : phage p2 non-chauffé, Puits C : SMQ-16 digéré *EcoRV*, autres puits : cellules sensibles (SMQ-16) infectées par le phage p2, récoltées à intervalle de 10 minutes pendant 90 minutes, ADN digéré par *EcoRV* (puits 0-90). B) Puits; C : SMQ-215 digéré *EcoRV*, autres puits : cellules résistantes (SMQ-215) infectées par le phage p2, récoltées pendant 90 minutes, ADN digéré par *EcoRV* (puits 0-90). C) Génome du phage p2 digéré *EcoRV* (valeurs présentées en kilopaires de bases), d'après Boucher, 1999 et confirmé dans le puits 1 de la figure 10 A.



3.9 Stabilité thermique de l'effet de pED1

Toutes les expérimentations autant qualitatives que quantitatives convergent vers une légère tendance voulant que plus la température d'incubation est élevée, plus la résistance au phage p2, conférée par le plasmide pED1, est importante. Les températures d'incubation ont varié de 20°C (température de la pièce) à 42°C, mais trois ont été retenues pour mesurer l'EOP (tableau 6). Le plasmide pED1 confère une résistance contre les phages de l'espèce 936 et ce, aux températures en vigueur lors des différentes étapes utilisées durant la fabrication du Cheddar.

3.10 Stabilité plasmidique de pED1

Après huit repiquages en six jours, 98,2% des colonies testées ont conservé le phénotype de résistance au phage p2 et conséquemment sont présumées avoir gardé le plasmide pED1.

3.11 Informations tirées de la séquence du plasmide pED1

Le plasmide pED1 est composé de 12232 paires de bases (séquence présentée en annexe). Ses principaux cadres de lecture ouverts et régions d'ADN présentant de l'homologie avec d'autres gènes connus ou dont le rôle a été identifié sont résumés (ainsi que d'autres caractéristiques) dans les tableaux 7 et 8. Une carte plasmidique de pED1 est présentée à la figure 11.

L'analyse de la séquence de pED1 a révélé que ce plasmide possède des gènes ou des séquences non-codantes qui ont déjà été rapportés dans d'autres plasmides codants pour des systèmes *Abi*. On y retrouve entre autres *oriT*, *repA*, *repB*, *orfX* et *hsdS*. Une séquence similaire à celle de l'orf 4 (*pcp*) a déjà été rapporté dans le chromosome de souches de *L. lactis*. Une région de 404 nucléotides, *oriT*, pouvant être impliquée (agissant en *cis*) dans un transfert conjugatif (non vérifié expérimentalement) a été identifiée chez pED1. Il a d'ailleurs

été démontré que les *oriT* seules (i.e., sans protéine MobA), chez pNZ4000 (van Kranenburg et de Vos, 1998), étaient suffisantes pour permettre un transfert conjugatif. Une forte homologie d'ADN est retrouvée avec les deux origines de transfert du plasmide pNZ4000 (van Kranenburg et de Vos, 1998), soit une identité de 95% pour *oriT1* et de 97% pour *oriT2* (pour les 405 nucléotides de l'*oriT* de pED1). Le plasmide pSRQ900 codant pour AbiQ (Emond *et al.*, 1998) présente aussi une forte identité d'ADN (97%) sur une portion de 352 nucléotides de son *oriT*. Tout comme le plasmide de résistance aux phages pCI528 qui présente 95% d'identité sur 335 nucléotides. Pour faciliter les comparaisons, un alignement des régions d'origines de transfert a été présenté à la figure 12. L'*oriT* de pED1 a un contenu élevé en adénine et thymine (63,7%), une caractéristique rapportée pour d'autres régions d'*oriT* bactériennes (Lanka et Wilkins, 1995; Mills *et al.*, 1998). Cette *oriT* comporte trois répétitions inversées qui permettraient la formation de structures secondaires tige-boucle qui sont caractéristiques des *oriT*, en plus d'une répétition directe. L'une de ces répétitions inversées (IR3) est homologue, en plus des *oriT* de pNZ4000, à celle de l'*oriT* du plasmide IncII R64 (Furuya et Komano, 1997) qui comprend le site de liaison de la protéine de mobilisation Nika et le site de coupure (figure 13).

À peine 500 nucléotides après l'origine de transfert (*oriT*), se situe une seconde région non-codante. *repA* (nucléotides 1713 à 2053) avec son contenu élevé en A-T (71,26%) est probablement la région de l'origine de réplication du plasmide pED1 (Hayes *et al.*, 1991). Des répétitions directes et inverses sont aussi incluses dans cette région de 341 nucléotides qui présente de l'homologie avec *repA* du plasmide pCI305. Ces répétitions sont caractéristiques d'une origine de réplication (Kues et Stahl, 1989; Scott, 1984; Seegers *et al.*, 1994). Les répétitions directes sont composées de 22 nucléotides (5'- TAT GTT CCT AGA AAA AAC TGT G - 3') et ont lieu à quatre reprises (nucléotides 1904 à 1989), avec une variation de deux nucléotides dans la quatrième répétition (changement G pour T dans les deux cas, les deux derniers G de la répétition). De plus, la première répétition est imparfaite puisque deux nucléotides sont absents (G et T, après le troisième nucléotide de la répétition). À la fin de la séquence *repA*, se trouve la boîte -35 de *repB* (nucléotides 1987 à 1992) 5'-TTTTTA-3', séparée par 16 nucléotides de la boîte -10 (nucléotides 2009 à 2014) 5'-TATAAT-3'. La région -10 est séparée par un nucléotide de la courte séquence TG, qui est généralement

conservée chez les promoteurs de lactocoques (de Vos, 1987; van der Vossen et al., 1987). Tout juste en amont de *repB* et de son site de liaison aux ribosomes (tableau 7), se trouvent deux structures potentielles tige-boucle (nucléotides 1969 à 2003 et 2021 à 2051), séparées par un segment comprenant la boîte -10. Cette dernière est identique à celle identifiée chez pCI305 (Hayes *et al.*, 1991). La boîte -35 est située dans la boucle d'une de ces deux structures secondaires, où elle serait plus facilement accessible.

Un fragment de 1200 nucléotides (2090 à 3289) pouvant coder pour 400 acides aminés, constitue *repB* (dont la traduction résulte en une protéine de réplication) identique à 88% à la séquence de *repB* de pCI305. Les régions *repA* et *B* possèdent de très fortes homologies de séquences tant au niveau nucléotidique que protéique et ce pour de nombreux plasmides de lactocoques séquencés.

Sur la carte plasmidique, l'*orf 5* est le gène le plus long et code potentiellement pour une séquence protéique de 998 acides aminés. Sur la base de l'hydrophobicité de cette séquence, trois régions semblent être transmembranaires. Les deux extrémités de cette séquence protéique (25-45 et 969-989) seraient transmembranaires, alors que la troisième région transmembranaire (358-378) est localisée au premier tiers de la séquence (figure 14). La probabilité de la localisation de la séquence protéique de l'*orf 5* a été vérifiée une autre fois (avec un programme différent) et dans ce cas, seulement deux régions transmembranaires auraient été identifiées (figure 15). Les 25 premiers acides aminés du côté N-terminal et les huit derniers acides aminés du côté C-terminal seraient situés à l'intérieur du cytoplasme, toute la région entre les deux serait à l'extérieur du cytoplasme. Fait étonnant, la composition théorique en acides aminés de l'*orf 5* révèle que 25% du contenu de la séquence protéique est composé de seulement deux acides aminés (sérine 14,33% et thréonine 10,62%). AbiC aussi présente deux segments transmembranaires (en N-terminal) (Durmaz *et al.*, 1992) et c'est pourquoi un alignement de séquence entre l'*orf 5* et AbiC est présenté aux figures 16 et 17 (nucléotides et acides aminés, respectivement). AbiC (1032 nucléotides ou 344 a.a.) s'insère pratiquement en plein centre de l'*orf 5* (1032 nucléotides ou 998 a.a.).

Tout juste en aval de l'*orf* de 998 acides aminés, se trouve une région (*orf* 6) présentant une identité de 96% (301/311 nucléotides, position 9883 à 10193) avec une portion de séquence du plasmide pCI750 porteur de la séquence codant pour AbiG. Cette région d'identité élevée contient chez pCI750 une séquence tronquée du gène *lin* (invertase/resolvase site specific DNA recombinase) et correspond à la première de deux répétitions directes de 309 paires de bases. Chez pED1, il n'y a pas ces deux répétitions directes, mais plutôt une seule région homologue aux deux répétitions de pCI750 (*orf* 6).

Par rapport au gène *lin* sauvage issu de *L. lactis* ssp. *cremoris* (no. d'accension GenBank Z48180), pED1 contient deux insertions (figure 18). Lorsque les insertions du gène *lin* de pED1 sont retranchées et qu'ensuite un alignement de séquence avec le gène *lin* sauvage est effectué, on obtient 46,6% d'identité pour la séquence nucléotidique (logiciel Multalin; Corpet, 1988) et 57,1% de similarité au niveau protéique dont 33,3% d'identité (logiciel ClustalW 1.74; Thompson *et al.*, 1994). Les homologies d'ADN et d'acides aminés sont présentées aux figures 18 et 19. Bref, pED1 contient une séquence analogue à la totalité de celle codant pour le gène *lin* chez *L. lactis* ssp. *cremoris*.

Les *orf* 7 et 8 suivent le gène *lin*. Le site potentiel de liaison au ribosome (RBS) en amont du premier des deux *orf* (GGAG, nucléotides 11165 à 11168, tableau 7) est identique à celui de l'*orf* codant pour Abi Eii. La séquence -10 (TATAAG, nucléotides 11155 à 11160), séparée de cinq nucléotides du RBS, est similaire à la séquence consensus de *E. coli* (TATAAT) ou celle de la boîte de Pribnow de *abi Ei* (TATAAT). Encore une fois, comme pour plusieurs autres promoteurs de lactocoques, le dinucléotide TG est présent, mais quatre nucléotides en amont de la boîte -10. Une portion de séquence (TTGATA, nucléotides 11113 à 11118) correspond assez bien à la séquence -35 de *E. coli* (TTGACA), mais est séparée de 35 nucléotides de la boîte -10. La boîte -35 est probablement absente dans ce cas. Aucun promoteur potentiel n'a été identifié en amont de l'*orf* 8 de pED1. Malgré que la boîte -10 corresponde assez bien avec la séquence consensus de *E. coli*, le promoteur putatif demeure improbable *in vivo* à cause de la courte distance entre le RBS et la séquence -10.

Figure 11 Carte plasmidique du plasmide pED1 (12232 pb). Sites uniques (*); *EcoRI*, *NcoI*, *ScaI*, *PvuII*, *PmII*, *Eco47III*, *BstAPI*, *BsmBI*, *BbvCI*. 2 sites de coupures; *EcoRV*, *SryI*, *BstrI*, *TaqII*, *ThaI*, *Bpu10I*. 3 sites de coupures; *BgIII*, *HindIII*, *XbaI*, *HaeII*, *NspI*, *BbsI*. Région contenant 12 sites de clivage; *TaqII* (387), *PmII* (419), *BstAPI* (463), *HaeII* (480), *SryI* (682), *BgIII* (867), *ThaI* (913), *Eco47III* (1134), *BbcCI* (1136), *Bpu10I* (1136), *HaeII* (1136), *BsmBI* (1211). Les sites de restriction ne sont pas tous représentés sur la carte, pour plus de détails consulter la séquence en annexe.

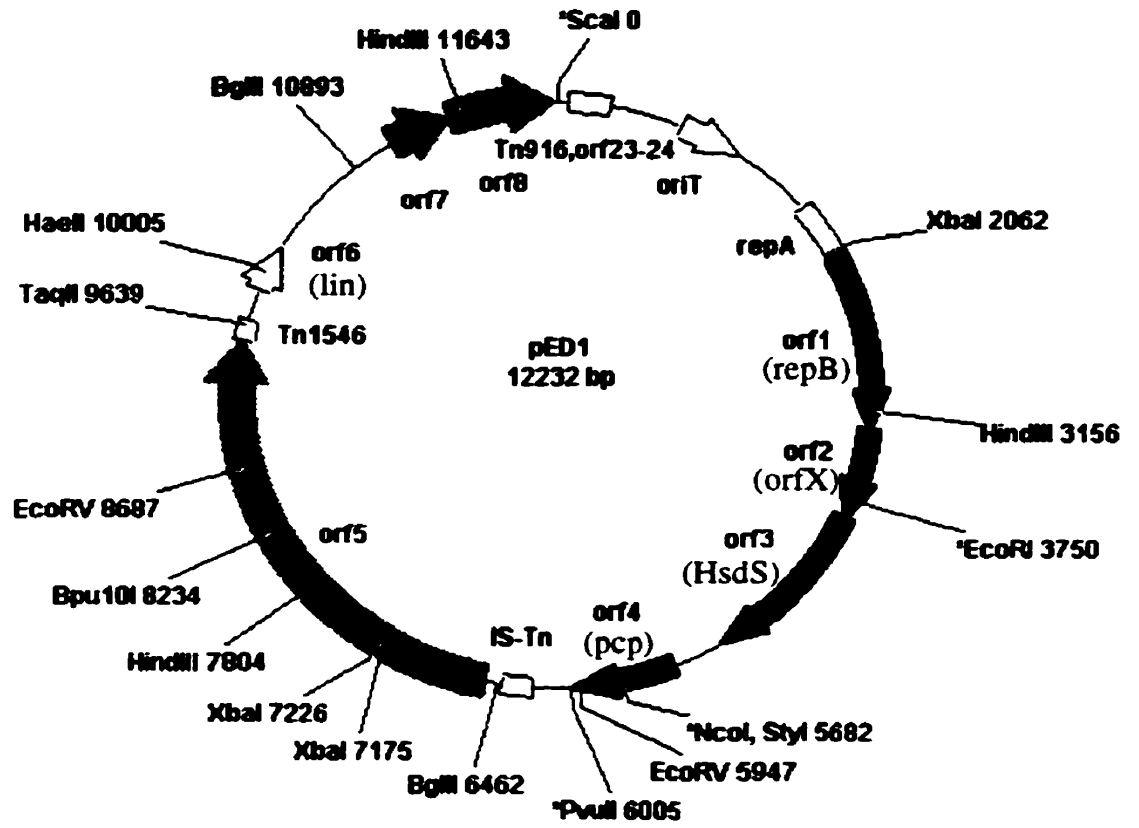


Tableau 7 Sommaire des caractéristiques des cadres de lecture ouverts contenus dans le plasmide pEDI

ORF	Début	Fin	% G+	Taille (a.a.)	P.M. (kDa)	PI	Promoteur (-10, -35)	Séquence SD ARNr 16S	Fonction ou similarité	Pourcentage d'identité (a.a.)	No. accession GenBank
1	2090	3289	34,9	400	47,1	9,0	Présent	<u>GCAAAAGGAGCG</u> GtactctATG	Protéine de réplication (RepB), chez <i>L. lactis</i>		
									pCI305	88 (339/383)	M74063
									pNZ4000 (B1)	81 (326/399)	AF036486
									pNZ4000 (B3)	80 (309/383)	AF036487
									pCI582	80 (309/383)	L06274
2	3282	3896	32,0	204	24,3	9,2	Présent	<u>GT'AAAAGG'IG</u> CAgicATG	Orf X, inconnue, <i>L. lactis</i>		
									pNZ4000 OrfC1	53 (114/213)	AF036486
									pNZ4000 OrfC2	48 (98/204)	AF036485
3	3884	5020	34,3	379	43,9	7,7	Incertain	<u>ΔAAA'IGG'IGG</u> GaacATG	pSRQ900	43 (92/213)	AF001314
									HsdS (sous-unité), chez <i>L. lactis</i>		
									pSRQ900 (inconnue)	80 (150/186)	AF001314
									pSRQ900 (inconnue)	45 (103/225)	AF001314
									<i>L. lactis</i> IL.1403	43 (160/367)	AF013165
4	5330	5977	46,3	216	23,5	5,1	Non- identifié	<u>AGAAAAGGAAA</u> TctctcATG	pIL7 pyrrolidone-carboxylate peptidase (pcp)	41 (157/378)	AF013596
									<i>L. lactis cremoris</i> MG1363	99 (213/215)	AJ223960
									<i>L. lactis cremoris</i> ML.3	99 (204/206)	AJ223962
									<i>S. pyogenes</i>	58 (126/215)	A25845

Tableau 7 (suite)

ORF	Début	Fin	% G+	Taille (a.a.)	P.M. (kDa)	PI	Promoteur (-10, -35)	Séquence SD	Fonction ou similitude	Pourcentage d'identité (a.a.)	No. accession GenBank
								AGAAAGGAGGT			
								ARNr 16S			
5	6531	9527	39,0	999	105,8	5,5	Incertain	<u>ΔCAAAGGAGT</u> TAAATG	<i>S. suis</i> (protéine précurseure de la muramidase libérée)	32 (81/249)	X64450
									<i>S. flexneri</i> (flagelline)	31 (81/258)	X64450
									<i>C. elegans</i> (inconnue)	25 (112/436)	D16819
6	9883	10193	28,6	103	11,4	10,	Présent	ATGAAAGGAAAAaaATG	<i>Lin</i> (homologie ADN)	22 (101/450)	AF077538
									<i>L. lactis</i> Résolvase	100 (13/13)	X92946
7	11176	11559	33,1	128	14,1	5,7	Présent	GAAACCGGAGGGGacattATG	Inconnue		
8	11570	12211	31,2	214	24,4	5,0	Absent	<u>ΔATTTAGAGG</u> TagtacaATG	Inconnue		

Le poids moléculaire et le point isoélectrique ont été déterminés avec le logiciel Compute pI/Mw tool (Wilkins *et al.*, 1998).

Tableau 8 Sommaire des régions d'ADN du plasmide pED1 ayant une fonction déterminée ou de l'homologie avec des gènes répertoriés dans les banques de données

SNC	Début	Fin	% G+C	Taille (nt)	Fonction ou similarité	Pourcentage d'identité (nt)	No. accession GenBank
I	71	331	37,93	261	Tn916; orf 23,24		
					<i>E. faecalis</i>	89 (235/262)	U09422
					Tn5251		
					<i>S. pneumoniae</i>	89 (235/262)	X90941
II	798	1202	36,30	405	OrfT		
					<i>L. lactis</i> pNZ4000 (orfT2)	97 (395/405)	AF036485
					<i>L. lactis</i> pNZ4000 (orfT1)	95 (386/405)	AF036485
III	1713	2053	28,74	341	RepA		
					<i>L. lactis</i> pSRQ900	96 (54/56)	AF001314
IV	6239	6439	30,85	201	Is-Tn tronqués		
					<i>L. lactis</i> IL964	98 (98/99)	L35176
					<i>L. lactis</i> MG1820	98 (96/97)	X60734
					<i>S. thermophilus</i>	97 (97/99)	X94761
					<i>L. mesenteroides</i>	96 (96/99)	U59101
V	9630	9671	34,51	142	Tn1546 tronqué, <i>E. faecium</i>	99 (141/142)	AF093508
					IS1216V tronqué, <i>E. faecium</i>	99 (141/142)	L40841

SNC = séquence non codante (ou séquence protéique tronquée)

Figure 12 Alignement des séquences nucléotidiques de plasmides de lactocoques contenant la séquence des origines de transfert (*oriT*). Alignement selon la longueur totale de l'*oriT* de pED1. *oriT1* et *oriT2* (pNZ4000, no. accession GenBank AF036485), *oriT* de pED1, région contenant au moins une partie de l'*oriT* de pSRQ900 (no. accession GenBank AF001314), codant pour AbiQ et de pCI528 (no. accession GenBank L08601), codant pour un mécanisme de résistance aux phages. La région correspondant à celle utilisée pour la figure 13 est comprise entre les deux flèches verticales (↑). Le site de coupure présumé (nic, selon le plasmide IncII R64, figure 13) est identifié par le ▲. Le site de liaison potentiel de NikA est identifié par la double flèche (↔). Les deux lignes pleines indiquent les séquences inverses répétées présentées à la figure 13. Le rouge indique une forte identité, le bleu indique une identité moyenne, le gris n'indique aucune identité. Alignement fait avec Multalin 5.3.3 (Corpet, 1988).

1 10 20 30 40 50 60 70

pED1 CCAAAAAGAGGGACGATTTCCGAGACGAAATTCGTCTCTTTTTCTTCTTTTTGTATGACAAAAGA
 or i T2 GAAAAAGAGGGACGATTTCCGAGAGAAATTCGTCTCT-TTTTTCTTCTTTTTGTATGACAAAAGA
 or i T1 GAAAAAGAGGGACGATTTCCGAGAGAAATTCGTCTCTTTTTTTTTCTTCTTTTTGTATGACAAAAGA
 pSRQ900 GAAAAAGAGGGACGATTTCCGAGAGAAATTCGTCTCT-TTTTTCTTCTTTTTGTATGACAAAAGA
 pCI528
 Consensus aaaaagaggacgatttcggaaga gaa tcgt ct tttttctcttttttgatgacaaaaaga

80 90 100 110 120 130 140

pED1 AAGATCTTTTGCCCATTTTATTTTTATAAATCGGTAGGTGGCGTTCCGTAAGCAATCGACACAAATC
 or i T2 AAGATCTTTTGCCCATTTTATTTTTATAAATCGGTAGGTGGCGTTCCGTAAGCAATCGACACAAATC
 or i T1 AAGATTTTTTGCCCATTTTATTTTTATAAATCGGTAGGTGGCGTTCCGTAAGCAATCGACACAAATC
 pSRQ900 AAGATCTTTTGCCCATTTTATAAATCGGTAGGTGGCGTTCCGTAAGCAATCGACACAAATC
 pCI528 AAGATCTTTTGCCCATTTTATTTTTATAAATCGGTAGGTGGCGTTCTGTAAAGCAATCGACACAAATC
 Consensus AAGATcTTTGCCCATTTTATctttATAAATCGGTAGGTGGCGTTTCcGTAAGCAATCGACACAAATC

150 160 170 180 190 200 210

pED1 CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCCCCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC
 or i T2 CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCCCCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC
 or i T1 CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCCCCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC
 pSRQ900 CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCCCCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC
 pCI528 CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCCCCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC
 Consensus CAAAGCCGATAAAGCCGAAGTGAARCTTCCcCTTTTCAGCCACATTGTAATACAGACGAACTGC

220 230 240 250 260 270 280

pED1 TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTTCTTGTGAGGATTGTAA
 or i T2 TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTTCTTGTGAGGATTGTAA
 or i T1 TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTCTTATATGATTGTAA
 pSRQ900 TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTCTTGTGAGGATTGTAA
 pCI528 TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTTCTTATATGATTGTAA
 Consensus TTTGATTACAATGCGATAGCTTGCAGTATTTATCGT TTTATATCGTCTATTTTCTTAtaAtcATTGTAA

290 300 310 320 330 340 350

pED1 CCGAATAGGGCCAACTACTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGAGCCATT
 or i T2 CCGAATAGGGCCAACTACTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGAGCCATT
 or i T1 CCGAATAGGGCCAACTGCTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGAGCCATT
 pSRQ900 CCGAATAGGGCCAACTACTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGAGCCATT
 pCI528 CCGAATAGGGCCAACTGCTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGAGCCATT
 Consensus CCGAATAGGGCCAACTgCTTATTACAAATCAATGACAAAGCCGATTGAGCAATGAGCCCTGgCCATT

360 370 380 390 400 407

pED1 TTATCTTTGAGGAGG-TTCTTGATCGATCAGAAAATGTATCACAATTCARACAAA
 or i T2 TTATCTTTGAGGAGG-TTATTCATCGATCAGAAAATGTATCACAATTCARACAAA
 or i T1 TTATCTTTGAGGAGG-CTATTTATCGATCAGAAAATGTATCACAATTCARACAAA
 pSRQ900 TTATTTTTAAAAAATCTATTTATACTTCCAAATATGTATCACAATTCARACAAA
 pCI528 TTATCTTTGAGGAGG-CTATTTATCGATCAGAAAATGTATCACAATTCARACAAA
 Consensus TTATcTTtgAggAgg cTATTtATggaTcaGAAAATGTATCACAaaTcARAcAAA

Figure 13 Alignement des séquences nucléotidiques contenant la séquence répétée inverse 3 (IR3) des *oriT*; *oriT1* et *oriT2* (pNZ4000), *oriT* de pED1 et *oriT* du plasmide IncI1 R64. Le site de coupure (nic, plasmide IncI1 R64) est identifié par le ▲. Le site de liaison de NikaA (plasmide IncI1 R64) est identifié par la double flèche. Les deux lignes pleines indiquent les séquences inverses répétées de *oriT1* et *oriT2* (pNZ4000). Les lignes pointillées indiquent les séquences inverses répétées de l'*oriT* du plasmide IncI1 R64. Le rouge indique une forte identité, le bleu indique une identité moyenne, le gris n'indique aucune identité. Alignement fait avec Multalin 5.3.3 (Corpet, 1988).

1 10 20 30 40 50 60 70
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 ori T1 AAGCCACATTGTAATACAGACCCAGAGTGTATTTCATTACAACTGTGATAGCTTGCAGTATTTATGCTTTT
 ori T2 AAGCCACATTGTAATACAGACCCAGAGTGTATTTCATTACAACTGTGATAGCTTGCAGTATTTATGCTTTT
 pED1 AAGCCACATTGTAATACAGACCCAGAGTCCITTCATTACAACTGTGATAGCTTGCAGTATTTATGCTTTT
 IncI GATGCCAATTGTAATAGCGTCCCGTCTGACG--GTATTACAACTGCACATCCGTCCCGTTTTTCGGG
 Consensus aAgc acATTGTAATAcagaaCCaagtgttttCTATTACAACTgtgAtAgCtGCagtattTtAgCtttt

Figure 14 Prédiction de la topologie, d'après l'hydrophobicité de la protéine potentielle (998 acides aminés) codée par l'*orf 5* (d'après le logiciel TopPred 2, Topology prediction of membrane proteins, Stockholm University Theoretical Chemistry Protein Prediction Servers, von Heijne, 1992).

Fri Mar 12 20:50:50 1999

sequence

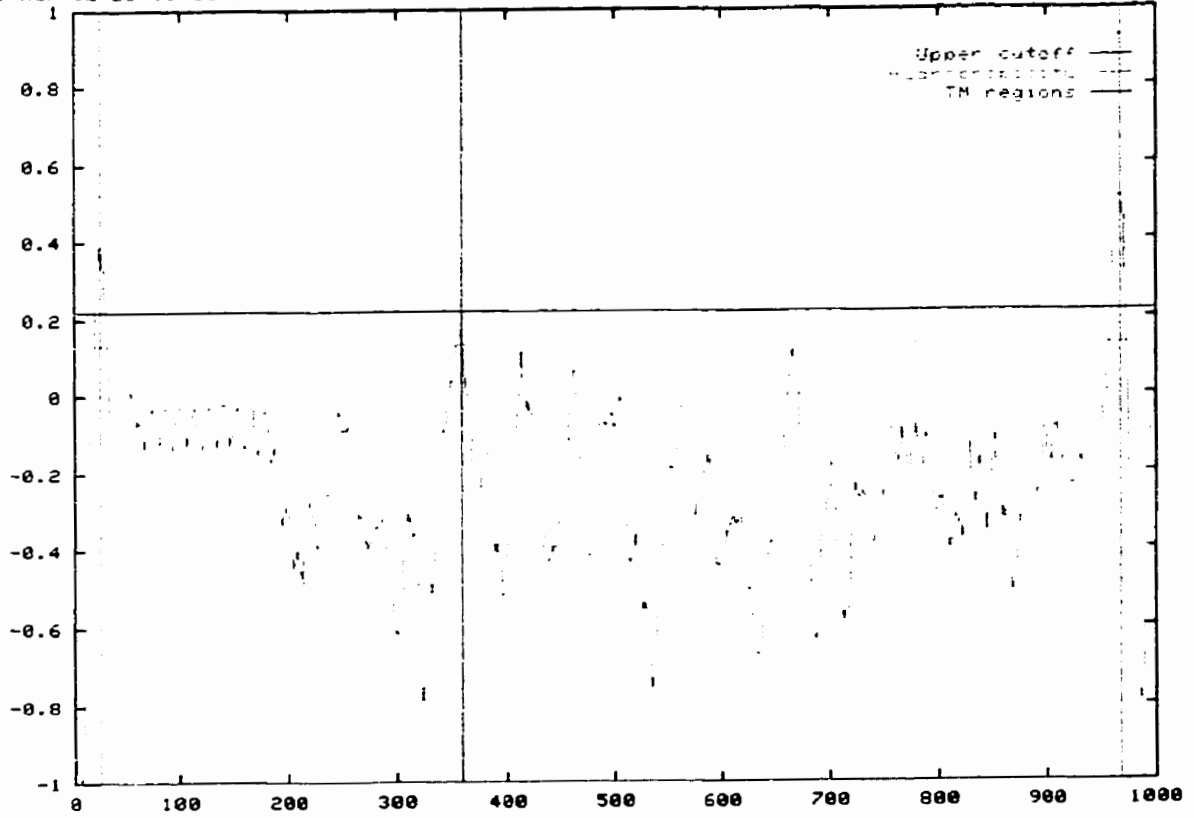


Figure 15 Probabilité de la localisation de la protéine potentielle (998 acides aminés) codée par l'*orf 5* (d'après le logiciel TMHMM, Sonnhammer *et al.*, 1998). Les régions à l'intérieur du cytoplasme vont de l'acide aminé 1 à 25 et de 990 à 998. Les régions dites transmembranaires vont de l'acide aminé 26 à 48 et de 967 à 989. La région couvrant les acides aminés 49 à 966 est présumée à l'extérieur de la membrane cellulaire.

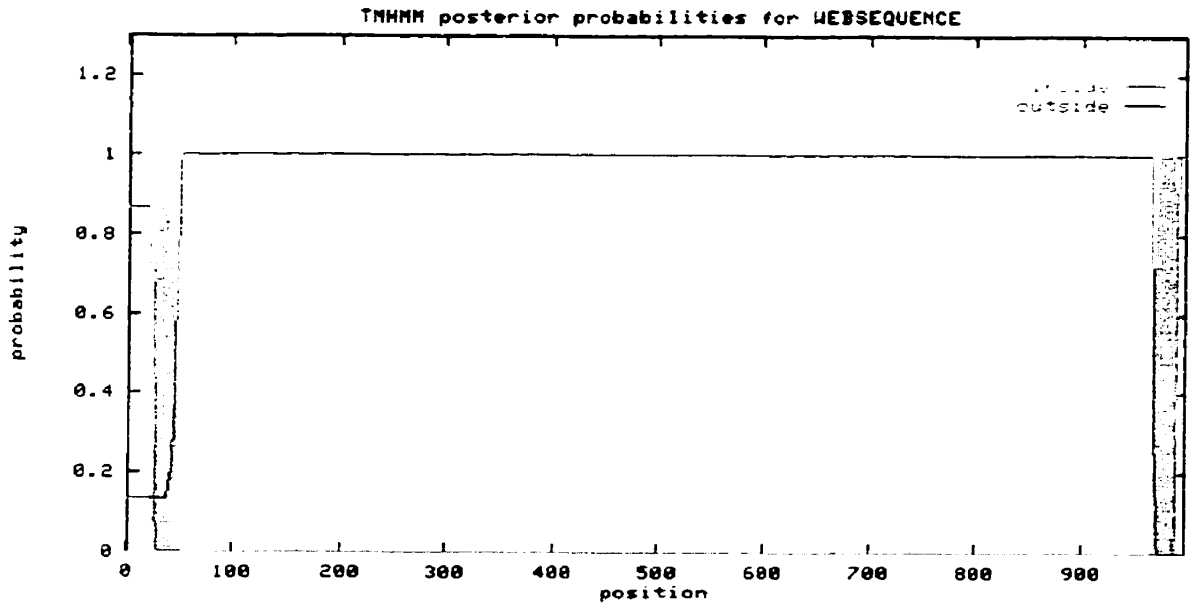


Figure 16 Alignement de la portion de séquence nucléotidique de l'*orf 5* présentant de l'homologie de séquence avec *abiC*. Les nucléotides sont numérotés à partir du début de chacun des gènes et non de la séquence totale du plasmide. Fait avec le logiciel Lalign version 2.0.

```

                                10      20
AbiC -----ATGTCAGAAAAGAAAAATACAAAAG
                        : : : : : : : : : : : :
orf5 CTTGGTCTTTTCAACTCAGGAECTTATCTCTTCCAACCTCAGATAGGTTATGGAGAAAAC
      1090      1100      1110      1120      1130      1140

      30      40      50      60      70
AbiC GC---AGTCC-CATTTATATGAAAA-----AAAGTTTTTGGATTCCGACAATTATAT
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 GCTACAGTTAACGACTATATGTTGACCCCAGGTAATGATTTT--ATTATTCCAACCTCGGT
      1150      1160      1170      1180      1190

      80      90      100      110      120
AbiC TTGTTGTATTT-GTATTTGTGTTTGTAAATGCTATTGAAATTA---CCTAGTTTTGGATTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 TTAATACAATAAGGAATGATGTATATCTCACAATGAGAAGTAGGGCCTA-TTTTGGAGCA
      1200      1210      1220      1230      1240      1250

      130      140      150      160      170      180
AbiC TGGTATGGAGCAAACGTTAAAGATAAAAGTTAGTCCAAATTC-AATCA-ATATCAGTAGAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 GGAT-TACAGGGA--GCTCAAGCTTCCCTAACAGCGACTTCTAATGGTAAACCTGTTGT-
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

      190      200      210      220      230      240
AbiC TCGAGCTTTTAAAAATATTAATATCTTTAATGCT-CCTATACTAACTTTT--TTGGTCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 TGGTCTTCTGAAAAT-TCAAAATTCATATATGATACCGATAGTAATGTTTACTTGACCA
      1320      1330      1340      1350      1360      1370

      250      260      270      280      290
AbiC T-CA-----TGAACACATTAAGTATACAGAAAAAAAATCAAGAGGAGT--CGAAGAAAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 AACAAAGGATTTGATCA-ATTAGGTA-ATTTTGGAAAAATTATGGCTCCTTTCGTCTATAC
      1380      1390      1400      1410      1420      1430

      300      310      320      330      340      350
AbiC TTAATAA--TTCTGATAGTGCTAATAG-AGAGTTTTATAGTTTATTAGACCTATTTAAAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 TTCAGCAAGTAATGATC-TAAAAAAGTAGGAATTGATAAATTCCTCAGCAATGATGAATC
      1440      1450      1460      1470      1480

      360      370      380      390      400
AbiC AAGAACA AAAA-TAAATCAGAAACAATAAAAGCGAT--AAGTTTTTGTATAAGAGGGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 AAGGTCTCTCCTCAAT-ACAGTCAA--AAAGCGGTGCCAACACTATTGTTTC---CGGTA
      1490      1500      1510      1520      1530      1540

      410      420      430      440      450      460
AbiC ATTAACGACAAACATGGCAACTCATTTATAAATGATTACAATATAGATATAGGAAATGGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 ATGGAGGCCAAAATA---CAACTGAGCGGTTT-TAATAGGGAAACAGATTTAG---ATGGG
      1550      1560      1570      1580      1590

      470      480      490      500      510      520
AbiC CTGGATTTTTCGATTTAATTTATTTGAAAGTAATCAATGGTTTTCTATTACATATAACAGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5 ---GCCTTCAGTTCAAGCATATCTGATAG-AGAAAATGATGCTTTAAAAAATACAGATGT
      1600      1610      1620      1630      1640      1650

```

```

530      540      550      560      570      580
AbiC    TCAAAATATAAAGGCAAGAATTTAACTAAAGAGCAAAAAGTAGAATTAGTTATTTCCCGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    -CAACTTTTATATGTACACAAAGGGGAACACAGAAACAAATGTGACTACACCCTTAGCAC
      1660      1670      1680      1690      1700      1710

590      600      610      620      630      640
AbiC    CAATTTG--ATGATGTTTATAATAAAATGAGCTCATACTTTAAAATATTTACAGAATAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    CAAACGGGTATCATCTTTATTCTCCAAACGTTTCAGAATTTAAAAT---TCAAACCA---
      1720      1730      1740      1750      1760

650      660      670      680      690      700
AbiC    TGAAGAGCCTAAACAAAAGATTTGACGAAAAGAAATTAGATGAAAGTGATTATAAAAATT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    -----CTAGACCATATTTTAGCTGGACGGGTGATATATCTAA-TGCT-ATAAAA---
      1770      1780      1790      1800      1810

710      720      730      740      750      760
AbiC    ATATAGGAAT--ATTGCGGACTCAGCTATCTTCTGAAGAAGTGTGTAATACTTATCAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    ATATCGGAAGCAAATGCGGATTTGATGACTTATTAGGG-----TCTAATAGTCTTCAA
      1820      1830      1840      1850      1860

770      780      790      800      810
AbiC    TTCTCTCTATGTTAAGAGGG--GCTTGGGACTGGG----TAT-TGAATTAATAGGAACTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    GTTACT----GACAATGGGGTAGATTTCAGACGGAACCCCTATATCAGTTGATCTGAATAG
      1870      1880      1890      1900      1910      1920

820      830      840      850      860      870
AbiC    ATTTATTTGGAGATGAAAAGATTTTAAAATTGACCAA--CAT-TTCGTA--ATTCCTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    AGTTA---GGATTGCAATTAG---TGAAGATGGAGGAAGTACATATTCCAATGATTGTA
      1930      1940      1950      1960      1970

880      890      900      910      920      930
AbiC    AACCCGAAATTATTCAAGACGATTTATCAATCTTTATTAACGATAATGAAGGTAAAATA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    TACCCTTAATGATTTAAAAGCACTTCT-AACAAGTGGTAATATTACAGTCCCTAAAATAG
      1980      1990      2000      2010      2020      2030

940      950      960      970      980      990
AbiC    TAAAAAACGAAAAGATTATGAG-AAGAAATTA AAAAGTATTGATAATATAGCAGAATTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    TTATTG--CTTATACATATTGCAACTGATTCAAAA--ACGGATAATATTGGAAAAGTT
      2040      2050      2060      2070      2080      2090

1000     1010     1020     1030
AbiC    GAGGATATAATGAATTTCA----AATCCTTTGTGTCAGCCGATTG-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
orf5    CC-----TAGTGAAATTGATGATAATACTGGAGCTTATGCTGTTCCCTTTTACACGTACAC
      2100      2110      2120      2130      2140

```

Figure 17 Alignement de la portion de séquence protéique déduite de l'*orf 5* présentant de l'homologie avec AbiC. Régions transmembranaires; *orf 5* (a.a. 26-48 et 967-989), AbiC (a.a. 18-44 et 65-86). Fait avec le logiciel ClustalW version 1.74 (Thompson *et al.*, 1994). Légende; * (identité), : (substitution conservative), . (substitution semi-conservative).

```

AbiC -----MSEKKNKSGSPIYMKKSFWIPTIIFVVFVVFVMLLKLKLP-----S 40
orf5  LNANPNPKGAKDDSGNIVDYITYVGPTDDRGAYWGDKELEDVLF SRLTVGELPSASEGT 360
      . * . * : : * . : . : * : : * * :
      :

AbiC FGLW-----YGAN--VKD-KVSPNSINISRVELLKILISLIAPILTFLVFMNT 85
orf5  LGLFNSTYLFPTQIGYGENATVNDYMLTPGNDFIIPTRFNTIRNDVYLTMRSRAYFGAG 420
      : ** : ** * * : * : * . * . . : * . : : : *
      :

AbiC LS-IQKKNQEESK-KLNNSDSANREFYSLLD--LFKKEQNKSET---IKAIS-FLYKRAI 137
orf5  LQGAQASLTATSNGKPVVGSSENSKFYIDTDSNVYLTQGFQDQLGNFGKIMAPFVYTSAS 480
      * . * . * : * . . * * : * * * . : : * . . : * : : * * . *
      :

AbiC NDK-----HGNSFINDYN----IDIGNGLDFRNLFESENQWFSITYNSSKYK 180
orf5  NDLKKVGIDKFSAMMNQGLSSIQSKSGANTIVSGNGGQIQLSGFNRETDLDGAFSSSISD 540
      ** : * * * : . . * * * * : : : . * : : . : : * * .
      :

AbiC GKN-----LTK---EQKVELVISRQFDDVYNKMSSYFKIFH-RILKSLNKRFD 224
orf5  RENDALKNTDVNFYMYTKGNTETNVTTPLAPNGYHLYSPNVSEFKIQTTRPYFSWTGDIS 600
      : * : * * * : * : : : : * . * * * * * * . : .
      :

AbiC -EKKLDES--DYKNYIGILRTQLSSEEL-----VVILINSLYVKRGLGLGIELIG-TNL 274
orf5  NAIKISEANADFDDLGSNSLQVTDNGVDSGTPISVDLNRVIRISEDGGSTYSNDSY 660
      * : * * : * : : : * * : : : : : * : : : . . * . :
      :

AbiC FGDEKDFKIDQHFVIPKPEIIQDD-LSIFINDNEGKNIKRRKDYEKKLKSIDNIAEFEDI 333
orf5  LNDLKALLTSGNITVPKIVIAYTYSATDSKTDNIGKLPSEIDDNTGAYAVPFTRTLTNDI 720
      : . * * : . : : : * * * : . * * * * . : . * . : : * *
      :

AbiC MNFKSFVSADS----- 344
orf5  PDKKSNITVKYIDISGNTISDNIVKAGNVGDSYTTEQKAI PGYTFKAVQGNPTGQFTSDA 780
      : * * : : .
      :

```

Figure 18 Alignement de la séquence complète du gène *lin* (*L. lactis* ssp. *cremoris*, no. accession GenBank Z48081) avec la séquence homologue de pED1 (nucléotides 9883 à 10193). Deux insertions sont présentes dans pED1 comparativement au gène *lin* en position 77-125 et 196-266. Rouge; identité. Gris; aucune homologie. (logiciel Multalin 5.3.3, Corpet 1988).

1 10 20 30 40 50
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin ATGAAATAGGATACGCACGAGTTTCAACTGGACTTCARATTTAGATT
 pED1 CTATTATGGCAATTCCTCTATTATTATTTCTGTATTTCAGTATTTTTA
 Consensus aTaaaRagacaATaCcCaCgAgTaaCaAcTgcacTacaAaTaTagaTTa

51 60 70 80 90 100
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin ACAAAAAGATAGTCTCAAAAAATAA
 pED1 TGGCCAGATATTTTACTAAATATCGGCAATCCTATTACTARTACCT
 Consensus acaaaaRAGATgTcTcRaaAAAAATaA

101 110 120 130 140 150
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin -----ACTGTGAAAAATATTTACTGACCA
 pED1 TGATTGTAAGTATATATATATGAGTTACGAGCAATAAAAAATAGACTATA
 Consensus -----ACgaaGAAaAAAaRaaTAcacaacA

151 160 170 180 190 200
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin TATGTCACCAAGTAAACAGAACACCTCGATTAAATCCGCCAT-----
 pED1 TTTTTCARACTAGAAACACAAAAAGCACCTTTTGAAGCGCTTTTCTAA
 Consensus TaTgTCAaaaaagAARAAAAAARaaCaccgaTTaARRgcCGCcaT

201 210 220 230 240 250
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin -----
 pED1 TTCARCCGTTTTCATAAACATTAAGTTCAGTACACTCCCTTGTTTTAA
 Consensus -----

251 260 270 280 290 300
 |-----|-----|-----|-----|-----|
 lin -----CGAATTTTCTCGTCTCGGCATACGATTGTTGTT
 pED1 TAGATTTTGTTTTACCCATTTGAGTCCACTTGAACCTCGTCCATAT
 Consensus -----CGaRaTTTcaaGTCCaCggGAaACgagTGcagaT

301 309
 -----|
 lin TGGCGATTG
 pED1 CCGATATTC
 Consensus ccGagATTc

Figure 19 Alignement de la séquence protéique déduite du gène *lin* avec la traduction correspondante de pED1 (séquence de la figure 18, traduite). Toutefois, si deux nucléotides supplémentaires sont considérés, cela permet d'obtenir un codon complet en position un de pED1, plutôt qu'un codon incomplet (-). Ce codon correspond à une méthionine (ATG), soit un codon d'initiation. Alignement fait avec Clustal W 1.74 (Thompson *et al.*, 1994). Légende; * (identité), : (substitution conservative), . (substitution semi-conservative).

lin MKIGYARVSTGLQNLDLQKDS-LKKINCEKIFTDHMSGSKRERPG-----LKSAIEFSR 53
pED1 -NIGYARVSTGLQIALKQKSI-NKGSVLNLLFMKTVELEKRLSKGAFCLSSLKNIVYFFI 58
:***** ** . * : : * . : . ** * ** . : *

lin PGDTIVVWRL 63
pED1 LRNSLYILTI 68
::: : :

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

A. Le plasmide pED1

Trois niches écologiques différentes nous permettaient de rechercher au moins une souche de lactocoques résistante aux bactériophages. D'abord, le lait cru, ensuite les ferments industriels (deux compagnies différentes, issues d'autant de pays, ont collaboré) et finalement des souches de la collection du laboratoire. Aucune souche exploitée commercialement n'a démontré suffisamment de résistance au phage p2, selon la méthodologie utilisée. Du lait cru, six colonies démontrant une résistance au phage p2 ont été découvertes. D'après les tests préliminaires d'EOP, une efficacité d'environ 10^{-9} était démontrée (tableau 4). Selon le patron de fermentation, cinq des six isolats sont des lactocoques. L'isolat 1-1f possède un profil plutôt divergent (moins de la moitié des substrats fermentés par les autres isolats). D'autres tests plus poussés, tels ceux nécessitant des sondes d'acides nucléiques (Salama *et al.*, 1991), n'ont pas été menés afin d'identifier avec certitude l'espèce. Donc, l'isolat 1-1f a été écarté des travaux subséquents.

Les isolats 1-1c, 1-1d, 1-1e et 1-1g s'agglutinent lorsqu'on les fait croître dans le bouillon GM17 et forment un culot «duveteux» lorsqu'il est agité. Un tel phénomène a déjà été répertorié pour un système de résistance inhibant l'adsorption phagique (Lucey *et al.*, 1992). Lorsque l'adsorption est entravée, soit le récepteur cellulaire sur lequel la particule virale se fixe est absent ou défectueux, soit un composé quelconque produit un encombrement stérique masquant ledit récepteur. Les substances impliquées sont d'origine glucidique ou lipoprotéique (Dinsmore et Klaenhammer, 1995). Pour les isolats 1-1c, d, e et g, on peut présumer qu'un système agissant sur l'adsorption phagique serait impliqué dans le phénotype de résistance. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, il serait possible de faire subir aux cellules divers traitements chimiques (hydrolyse acide, protéinase K, traitement alcalin, et autres...) qui vise à inactiver les composés masquant les récepteurs et conséquemment à rendre sensible aux phages les cellules qui naturellement ne le seraient pas. Donc, ces quatre isolats pourraient éventuellement faire l'objet de travaux de recherche.

Même si à première vue les isolats 1-1c, d, e et g sont fortement résistants au phage p2, ils n'ont pas été retenus pour la suite des travaux. Principalement, parce que le caractère d'agglutination n'est pas désiré et qu'il y a une forte probabilité d'y trouver un mécanisme inhibant l'adsorption ou même deux mécanismes de résistance, dont l'un pourrait être un Abi, ce qui expliquerait la si forte efficacité. De plus, une combinaison du genre ne serait pas une première, c'est d'ailleurs ce que l'on retrouve sur le plasmide pCI528 (Coffey *et al.*, 1991; Costello, 1988).

La collection du laboratoire nous a permis de trouver la souche qui correspondait aux objectifs du projet. Il s'agit de la souche SMQ-215 qui possède un plasmide conférant un EOP de 10^{-5} ou 10^{-6} , selon le phage utilisé (tableau 6). C'est le seuil minimal d'efficacité requis pour qu'un système puisse être utilisé comme seule arme pour contrer les phages lors d'une fermentation à grande échelle. À l'origine, cette souche de laboratoire était exempte de tout plasmide (*L. lactis* LM0230). Ensuite, un plasmide de lactocoque (isolé du lait cru) lui a été additionné par électroporation. Donc, le phénotype de résistance au phage p2 provient de l'ADN exogène qui lui a été ajouté, ce qui répond à un autre critère fixé au départ.

Ce plasmide de 12232 pb, nommé pED1, est de petite taille, ce qui pourrait éventuellement faciliter son transfert dans une souche industrielle. Ce plasmide est très stable, du moins dans la souche LM0230. Élément non négligeable, la résistance est conférée contre l'espèce 936, soit la plus problématique pour l'industrie fromagère (Jarvis *et al.*, 1991; Moineau *et al.*, 1992; Moineau *et al.*, 1996). De surcroît, pED1 code pour un nouveau mécanisme anti-phagique, étayé principalement par l'analyse de la séquence complète du plasmide qui ne présente pas d'homologie avec les séquences des gènes *abi* des banques de données.

Les résultats de plusieurs expériences convergent afin de prouver que pED1 contient un mécanisme Abi. D'abord, le pourcentage d'adsorption est similaire entre SMQ-215 et SMQ-16 (tableau 5). Ce qui élimine par la même occasion la possibilité d'un mécanisme inhibant l'adsorption virale. La possibilité d'un mécanisme bloquant l'éjection de l'ADN phagique (qui est un mécanisme très rare) est exclue puisque l'expérience de répllication de

l'ADN total a démontré que l'ADN du phage p2 est bel et bien éjecté. Un mécanisme de restriction/modification est aussi rejeté par la même expérience car l'ADN du phage p2 n'était pas clivé *in vivo*. Une autre méthode classique aurait aussi pu être mise à profit pour vérifier s'il s'agit ou non d'un mécanisme de R/M. Elle consiste à mettre de l'ADN en présence d'un extrait cellulaire de la souche hôte de pED1 afin de vérifier si l'ADN est digéré ou non.

Une des caractéristiques des systèmes d'avortement de l'infection consiste en la mort cellulaire tributaire à l'infection et qui se traduit par un taux de survie cellulaire équivalent qu'il s'agisse de cellules sensibles (Abi⁻) ou résistantes (Abi⁺) aux phages. Ce phénomène a aussi été observé avec les cellules porteuses de pED1 (tableau 5). Lorsqu'un mécanisme Abi est impliqué, il est normal de voir diminuer l'ECOI et le relarguage phagique. Cela s'explique par le fait que moins de cellules permettent la libération de particules phagiques matures étant donné qu'elles sont «protégées» et que tout phage adsorbé ne va pas nécessairement engendrer un cycle lytique complet. Le cas échéant, beaucoup moins de virions matures en résulteront. Une fois de plus, pED1 répond à ce critère (tableau 5). Malgré tout, lorsque des bactériophages matures sont relargués dans le milieu, la quantité libérée par cellule est de beaucoup inférieure lorsqu'un Abi est présent (tableau 5), ce qui se reflète par une taille réduite des plages de lyse. Toutes ces caractéristiques tendent à prouver que pED1 contient un nouveau mécanisme de l'avortement d'infection, efficace contre l'espèce 936 de phages de *L. lactis*.

D'autres expériences menées, ont mis en valeur des qualités intrinsèques distinctives du plasmide de résistance pED1, telle que l'efficacité à différentes températures, ou la démonstration que l'ADN phagique peut se répliquer en présence de pED1. Ainsi, l'ADN du phage p2 est présent sous forme répllicative et encapsidé autant chez les cellules sensibles que résistantes (figure 10). Ce qui diffère de AbiQ (Dion *et al.*, 1998; Emond *et al.*, 1998) pour lequel l'ADN du phage p2 n'était présent que sous la forme répllicative, de même que pour AbiK où l'ADN phagique n'était détecté que sous forme immature (pour le phage p2) (Boucher *et al.*, 1999).

La souche hôte de pED1 (LM0230) est naturellement sensible aux phages des espèces 936 et c2. Selon les informations publiées jusqu'à présent, aucune souche de lactocoques n'est sensible aux trois espèces de bactériophages les plus fréquemment impliquées dans les fermentations défailantes, à savoir les espèces 936, c2 et P335. Ce qui impose des contraintes supplémentaires afin de vérifier l'efficacité d'un Abi contre ces trois espèces. Dans le cas de pED1, aucun test n'a été réalisé afin de vérifier s'il agissait contre l'espèce P335. Pour explorer cette avenue, il faut utiliser une nouvelle souche qui y serait sensible. Or, il faut s'assurer que d'autres facteurs propres à cette souche n'interféreraient pas avec le mécanisme Abi qui y serait introduit. Dernièrement, la souche F7/2 de *L. lactis* (Boucher *et al.*, 1999) a été utilisée comme hôte pour tester les espèces phagiques 936 et P335. Conséquemment, des travaux futurs de transformations de l'hôte bactérien F7/2 avec pED1 devraient être menés dans le but d'examiner si une résistance à l'espèce P335 peut être conférée par pED1. Dans l'éventualité où une résistance serait démontrée, l'ensemble des expérimentations faites pour caractériser pED1 avec le phage p2 devrait être reprise avec un phage de l'espèce P335. Si jamais la résistance à l'espèce P335 pouvait être démontrée pour pED1, cela en ferait un système Abi aussi intéressant à utiliser à l'échelle commerciale du point de vue de l'efficacité que AbiK. Critère technique intéressant pour l'application de pED1 en production fromagère, son efficacité est stable à une gamme étendue de températures utilisées, pouvant varier entre 20°C et 42°C, alors que AbiK est sensible à la chaleur. Cette palette thermique d'efficacité procure une souplesse non négligeable à pED1, le démarquant de la concurrence pour un transfert technologique vers l'industrie.

Le plasmide pED1 a été cloné partiellement dans le vecteur pBlueScript II KS (désigné pBS KS), afin de pouvoir en déterminer la séquence nucléotidique. Deux clones contenant chacun une insertion (*Hind*III) d'environ 3,8 kpb ont été construits. Le dernier fragment (*Hind*III) d'environ 4,6 kpb de pED1 n'a pu être cloné. Plusieurs vecteurs, souches hôtes (Gram+ et Gram-), enzymes de restrictions et stratégies de clonage ont été utilisés, mais en vain.

Afin d'en déterminer la séquence complète, nous avons procédé par marche sur le plasmide pED1, d'après les amorces déduites des séquences des deux clones de pED1 dans

pBS KS. Le plasmide de résistance pED1 est désormais entièrement séquencé. Plusieurs avantages sont tirés du séquençage complet de pED1 plutôt que de la seule séquence responsable du caractère Abi comme c'est le cas dans plusieurs travaux parus. D'abord, de l'information génétique sur un nouveau plasmide de lactocoques est obtenue ainsi que des informations pertinentes pour plusieurs autres projets en route ou à venir au sein du laboratoire du Dr Moineau. On n'a qu'à penser aux promoteurs et aux protéines de réplifications, l'organisation ou la structure générale d'un plasmide porteur d'un système Abi (présence ou non d'éléments indicateurs d'un Abi; origine de transfert [*oriT*], *orf X*, *hsdS*, *repA*, *repB*, séquences répétées et/ou inversées). Les comparaisons possibles avec d'autres plasmides porteurs d'un système Abi (ou d'autres mécanismes) et dont la séquence entière est connue figurent parmi les éléments à considérer. Il s'agit d'un exercice plus long et coûteux, mais qui peut s'avérer très profitable à moyen et long terme. Techniquement, il reste une ultime étape à franchir afin de prouver qu'un fragment de pED1 est impliqué dans le phénotype de résistance aux phages de l'espèce 936.

À la mi-avril, les cadres de lecture ouverts 7 et 8 (fragment *Bgl*III de 2,2 kpb) ont été clonés dans le plasmide navette pTRKH2 (*E. coli* - *L. lactis*). Le test de la résistance aux phages a révélé un EOP approximatif de 10^{-1} , alors que l'EOP attendu oscillait entre 10^{-5} et 10^{-6} . Donc, les orf 7-8 ne sont pas impliqués dans la résistance aux phages ou sinon ils interagissent avec au moins une autre région du plasmide pED1. À moins que le fragment cloné contienne une mutation ponctuelle (par exemple) diminuant le phénotype. L'autre cadre de lecture soupçonné pour son implication dans le phénotype de résistance est l'orf 5 (figure 11), bien que son contenu en guanine et cytosine soit plus élevé que celui des orf 7 et 8. Les tentatives de clonages de ce fragment sont demeurées vaines, alors son implication dans la résistance reste à prouver. Peut-être que les cadres de lecture ouverts 5, 7 et 8 agissent en synergie. Il serait alors très intéressant d'obtenir un clone dans *L. lactis* contenant ces trois orf.

Différents autres tests pourraient ensuite être menés (advenant le cas où l'Abi avec le phénotype correspondant serait cloné) : sous-clonage dans des vecteurs à haute ou faible copie, influence de divers promoteurs, vérification si plus d'un gène contribue à l'effet de

résistance, combinaisons avec d'autres systèmes de résistance, etc. Le niveau d'étude suivant mène à l'étude de l'expression de la protéine, sa purification et sa structure.

Les difficultés de clonage du gène de l'Abi ne sont pas exclusives à pED1. Il a notamment été impossible de cloner le déterminant génétique codant pour AbiN (Prévost *et al.*, 1998) et AbiO (Prévost *et al.*, 1998), prétendument à cause de leur toxicité, seulement les formes tronquées de ces gènes ont pu être clonées avec succès.

B. L'analyse de la séquence de pED1

Avant tout, il importe de rappeler les objectifs principaux du travail qui sont l'identification et la caractérisation d'un nouveau système antiphagique, de préférence de type Abi. Ce qui signifie que l'analyse de la séquence est utilisée ici comme support à la caractérisation du plasmide de résistance et ne constitue pas une finalité en soi. Dans le cadre des résultats présentés, seulement les principales caractéristiques retrouvées dans la séquence seront investiguées.

L'origine de transfert

Par homologie entre les *oriT* de pNZ4000 et du plasmide Inc11 R64, le site de coupure (nic) avait été déterminé chez pNZ4000. Puisque l'identité d'ADN, entre l'*oriT* de pED1 et celles de pNZ4000, atteint 100% dans la région contenant le prétendu site de coupure (nic), cette région de pED1 est donc aussi présumée contenir le site de coupure (nic) (figure 13). Les séquences de plasmides de lactocoques (pED1, pNZ4000) sont conservées entre elles au niveau des répétitions inverses, au site de liaison de NikA (sauf une mutation ponctuelle d'une adénine pour une cytosine) et du site de coupure (nic). Par contre, elles ne sont pas aussi bien conservées lorsqu'on les compare au plasmide Inc11 R64 (*Salmonella typhimurium*). Néanmoins, certaines régions sont particulièrement conservées. Chacune des répétitions inverses compte un bloc de neuf nucléotides identiques pour les trois plasmides. Un di-nucléotides (CG) conservé est présent entre les deux répétitions. Un second couple de

nucléotides (TG) conservés est présent au site de coupure, lequel est bordé (6 nucléotides en aval) par un triplet de thymine. Quelques autres positions dans la région du site de coupure sont aussi conservées.

Une classification des *oriT* (F, P, Q) a été établie selon les groupes d'incompatibilités plasmidiques (Lanka et Wilkins, 1995). D'après l'homologie de séquence entre pED1 et Inc11 R64 en plus de la correspondance avec la séquence consensus établie pour le groupe de région de coupure P (Lanka et Wilkins, 1995), l'*oriT* de pED1 appartiendrait au groupe P. La taille de la région *oriT* de pED1 (figure 12) correspond assez bien à celle admise pour la classe P qui est d'approximativement 300 pb.

Normalement, chaque plasmide conjugatif ou avec un potentiel de mobilisation, encode ses protéines accessoires spécifiques à son origine de transfert (*oriT*). Ces enzymes impliquées dans la coupure et la ligature du brin d'ADN sont requises pour amorcer et finaliser le transfert d'ADN. De telles enzymes n'ont pas été identifiées chez pED1. Par contre, il a été démontré que des facteurs agissant en *trans* (déterminant génétique porté sur un autre plasmide que celui contenant l'*oriT*) pouvait permettre la mobilisation du plasmide porteur de l'origine de transfert. Ce qui permettrait de poser une hypothèse qu'un autre plasmide dans la souche mère de pED1 pourrait encoder les facteurs agissant en *trans* sur l'*oriT* de ce dernier. D'autres plasmides, notamment chez *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, ont déjà démontrés leur incapacité à se transmettre d'eux-mêmes, mais pouvaient tout de même être mobilisés par complémentarité lors de la présence d'un second plasmide (Projan *et al.*, 1989; Selinger *et al.*, 1990).

Des éléments permettant la conjugaison sont répertoriés tant chez les bactéries Gram négatif que chez celles à Gram positif. Les transposons en sont un exemple. Les éléments d'insertion mobilisables, contenant leur propre origine de transfert (*oriT*) et au moins un gène *mob* (mobilisation) forme une autre classe d'unités transmissibles (Lanka et Wilkins, 1995). Les *oriT* du groupe F sont flanquées d'un gène X, dont le rôle est inconnu. Peu importe l'*oriT*, le cofacteur cationique Mg^{2+} est requis pour que le clivage survienne. Fait très intéressant, MobA qui est une relaxase (Scherzinger *et al.*, 1992), est aussi connu sous le nom de RepB

(Scherzinger *et al.*, 1991) possédant une activité spécifique pour amorcer la réplication (Lanka et Wilkins, 1995). Or, pED1 possède une protéine RepB impliquée dans la réplication. Ce qui pourrait peut-être signifier que la protéine RepB de pED1 jouerait aussi le rôle de MobA. De plus, même une version tronquée de MobA dans sa partie C-terminale a pu démontrer sa capacité à cliver son substrat (Lanka et Wilkins, 1995). MobA est impliquée dans l'initiation et la terminaison du transfert conjugatif de l'ADN, i.e., qu'elle demeurerait liée à l'ADN (Bhattacharjee et Meyer, 1993; Bhattacharjee et Meyer, 1991) ce qui permet la ligature de l'ADN (dont la coupure a été faite dans l'*oriT*) pour reformer une molécule circulaire (Bhattacharjee *et al.*, 1993). Ces deux facteurs de mobilisation (*oriT* et RepB, i.e., MobA) nécessaires pour l'initiation et la terminaison du transfert pourraient peut-être se faire compléter en *trans* par des protéines issues des plasmides co-résidents de la souche sauvage (SMQ-210) ou du chromosome de cette même souche (Vedantam, *et al.*, 1999). Ces protéines agissant en *trans* serviraient à compléter l'appareil de transfert ou de couplage cellulaire («mating apparatus»). Le phénomène de conjugaison par l'entremise des pili est déjà connu, néanmoins toutes les bactéries n'ont pas de tels appendices, notamment *L. lactis*. Pour pallier cette lacune, une hypothèse faisant appel à des pores de transport de l'ADN a été émise (Lessl *et al.*, 1993; Beijersbergen *et al.*, 1994; Lanka et Wilkins, 1995; Vedantam *et al.*, 1999). Toutefois, les processus exacts et la composition des protéines composant les pores de transports demeurent mystérieux. La lumière reste à faire pour les plasmides n'encodant apparemment pas d'hélicase.

Un alignement de séquence de plasmides de lactocoques a été effectué afin de mettre en évidence les régions de nucléotides conservés. Les 70 premiers nucléotides présentent une homologie moyenne (bleue) puisque cette portion de séquence n'est pas disponible pour le plasmide pCI528 (figure 12). Néanmoins, les quatre autres séquences y présentent une région très conservée. L'origine de transfert de pED1 (*oriT*) pourrait donc constituer une cible potentielle pour la construction de sondes visant à identifier les plasmides de lactocoques avec un potentiel de mobilisation ou de conjugaison.

Le réplicon

Dans la partie C-terminale de RepB (dans certains cas appelée MobA), on retrouve le motif AKYXXXK (précisément AKYLKK) qui est identique à celui de RepB chez pCI305. Or, cette séquence est hautement conservée chez les protéines de réplication des plasmides se répliquant selon le mode de cercle roulant et produisant des intermédiaires d'ADN simple brin. Dans ce dernier cas, la séquence AKYXXXK serait impliquée dans le site actif pour la coupure de l'origine de réplication (Gruss et Ehrlich, 1989). Des séquences répétées dans les origines de réplifications (*repA* dans le cas de pED1) ont déjà vu un rôle leur étant assigné pour l'incompatibilité plasmidique et le contrôle du nombre de copie (Dorrington et Rawlings, 1989; Lin *et al.*, 1987; Persson et Nordstrom, 1986).

Si jamais pED1 était transformé dans une souche de lactocoque commerciale et que de l'incompatibilité plasmidique était remarquée, peut-être existerait-il une alternative pour palier à ce problème, soit d'enlever en tout ou en partie la séquence de *repA*, puisque pour le plasmide pCI305 (Hayes *et al.*, 1991), *repA* (agissant en *cis*) n'est peut-être pas essentiel pour la réplication, tel que démontré par une insertion (Tn5) entre *repA* et *repB*. Idéalement, la nécessité de *repA* (chez pCI305) aurait pu être prouvée en l'inactivant avec l'insertion Tn5 ou en l'excisant. Toutefois, le motif AKYXXXK à lui seul, n'est pas une preuve suffisante pour affirmer que la réplication de pED1 s'opère selon le mode du cercle roulant. Le plasmide pCI305 qui possède également ce motif et pour lequel des intermédiaires d'ADN simple brins (caractéristique des cercles roulants) n'ont jamais pu être détectés, appartient à une famille de plasmides qui se répliqueraient selon le mode thêta.

Puisque de l'homologie entre pED1 et quelques membres de cette famille (pWVO2-type theta replicons, Seegers *et al.*, 1994) a été trouvé, cela suggère que pED1 se réplique selon le mode thêta. Afin d'être certain du mode de réplication utilisé par pED1, il faudrait vérifier s'il y a présence d'intermédiaires simple brin, car des arguments pourraient appuyer tant le mode thêta que cercle roulant (conversion du relaxosome en appareil de réplication). Des gels 2D pourraient aussi être faits pour vérifier la présence d'intermédiaires thêta. Plusieurs plasmides ayant ce type de régions de réplication (*repA-repB*) peuvent se trouver au

sein d'une même souche. C'est le cas d'une souche industrielle, *L. lactis* ssp *cremoris* Wg2 (Seegers *et al.*, 1994). Les différences entre les répétitions directes de *repA* pourraient être responsables de l'affinité pour la protéine RepB, ce qui expliquerait la possible coexistence au sein d'une même souche, de plusieurs plasmides (Seegers *et al.*, 1994). Cela augure bien pour un transfert de pED1 dans une souche industrielle.

L'*orfX* et la sous-unité S de spécificité (*hsdS*)

Tel que rapporté pour quelques autres plasmides de lactocoques (Seegers *et al.*, 1994), les séquences de *repB* et de *orfX* se chevauchent sur quelques nucléotides (huit). De l'homologie tant au niveau protéique que nucléotidique a été relevée et ce pour de nombreux plasmide de lactocoques. Parmi ceux-ci, ont retrouve les plasmides pSRQ800 (codant pour AbiK) et pSRQ900 (codant pour AbiQ), bien que dans le cas de pSRQ800, toute la séquence de l'*orfX* ne soit pas encore disponible dans les banques de données. Le rôle d'*orfX* demeure inconnu puisqu'il a pu être enlevé dans le plasmide pJR7 (Seegers *et al.*, 1994), sans en empêcher la réplication. Toutefois, un motif hélice-coude-hélice est présent entre les acides aminés 1 et 41 d'*orfX* (8951 à 8829) chez pED1. Un tel motif est habituellement impliqué dans les liaisons à l'ADN. Le gène d'*orfX* chevauche également le gène suivant, *hsdS*, sur 13 nucléotides. Ceci pourrait signifier un couplage entre ces trois gènes lors de la traduction, mais des analyses de type northern seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Le gène *hsdS* qui code pour une sous-unité responsable de la spécificité pour un système de restriction modification (Schouler *et al.*, 1998), présente de l'homologie avec les sous-unités HsdS de plusieurs plasmides de lactocoques, dont pIL7, pIL103, pIL2614 et pNZ4000 (bien que non identifié par l'auteur dans ce dernier cas). La sous-unité codée par pED1 est de taille similaire (379 acides aminés) à la plupart de celles retrouvées chez *L. lactis* (300-400 acides aminés).

La pyrrolidone-carboxylate peptidase

En aval de la séquence homologue à divers *hsdS*, se trouve un cadre de lecture de 215 acides aminés qui présente plus de 98% d'identité sur toute sa longueur avec la protéine pyrrolidone-carboxylate peptidase (pcp) de *L. lactis*, ainsi qu'une forte identité et de l'homologie avec celles d'autres procaryotes Gram-positif (dont plusieurs streptocoques). Cette protéine cytosolique se présenterait sous forme d'un homotétramère et appartient à la famille de peptidases C15. Sa fonction *in vivo* consisterait à enlever la 5-oxoproline de divers peptides. Ce gène d'origine chromosomique avait antérieurement été sélectionné (Cleuziat *et al.*, 1992) pour définir une sonde d'ADN permettant la détection spécifique de streptocoques du groupe A qui constituent un groupe de micro-organismes pathogènes pour l'homme. Or, ce gène de pcp a été retrouvé aussi dans le chromosome de lactocoques tels que MG1363 et NCDO763 (Daveran-Mingot *et al.*, 1998), en plus du plasmide pED1. Par conséquent, l'usage de cette sonde devient vétuste puisque désormais non spécifique aux streptocoques. L'identité s'élève à 98,6% (acides aminés) entre le gène de pcp situé sur pED1 et celui de MG1363. La similarité est de 71% et l'identité (acides aminés) est de 58% en comparant avec la séquence de *S. pyogenes* (no. accession Q01328). Pour ce qui est de l'homologie en terme de nucléotides, elle est à toute fin pratique inexistante, ce qui est un peu étonnant (peut-être à cause d'un biais de codon). Le contenu en G+C de ce gène chez pED1 est de 46,30%, ce qui est bien au-delà de la moyenne admise de 37% pour les gènes de *L. lactis* (van de Gutche *et al.*, 1992). Cela pourrait signifier qu'un transfert horizontal aurait pu se produire afin d'acquérir dans le chromosome de *L. lactis* ce gène d'un organisme inconnu. Ensuite, un événement de recombinaison aurait pu se produire pour en permettre le passage du chromosome vers plasmide pED1.

Les séquences d'insertion

La région de pED1 comprise entre les positions 6239 et 6439 est homologue à de nombreuses séquences d'insertions (IS) et transposases, toutes tronquées. Effectivement, il semble que ce ne soit qu'à partir des quelques derniers acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale que se présentent de l'homologie avec pED1, ce qui se poursuit avec quelques

dizaines de nucléotides non-codants en aval de ces séquences. Évidemment, aucune protéine ne peut être exprimée depuis ces séquences tronquées, il s'agit probablement d'artefacts d'échanges génétiques d'une lointaine époque. Les séquences d'insertions et de transposases de nombreux genres et espèces bactériens présentent de l'homologie dans leur portion C-terminale avec pED1 et conséquemment entre elles, laissant supposer une origine commune à tous ces éléments mobiles. Il s'agit d'un moyen efficace afin d'accélérer l'évolution génétique, par échange de blocs d'informations, avec pour toute trace de son passage, ces stigmates repérables (séquences d'IS et de Tn tronquées).

Le cadre de lecture ouvert (*orf 5*) de 998 acides aminés

La protéine potentielle la plus longue contenue dans le plasmide pED1 est composée de 998 acides aminés. La fonction de ce gène potentiel n'est pas encore clairement identifiée. À prime abord, il est tentant de penser qu'il s'agirait peut-être du gène de l'Abi. L'analyse de la composition nucléotidique indique que le contenu en guanine et cytosine (G+C) est de 38,97%. Les systèmes Abi répertoriés ont un contenu en G+C inférieur à 30% (Allison et Klaenhammer, 1998), ce qui laisse présager que cette séquence n'est pas un gène codant pour un Abi.

Les comparaisons avec les séquences nucléiques ou protéiques des banques de données révèlent de l'homologie avec soit des protéines inconnues (potentielles) et/ou avec des protéines membranaires issues de levures, particulièrement chez *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*. D'après l'analyse de la topologie (logiciel TopPred2; von Heijne, 1992; Cserzo *et al.*, 1997) il est fort probable, dans l'éventualité où la protéine serait effectivement produite, qu'elle soit localisée à la surface de la membrane. D'après les résultats d'hydrophobicité, deux régions transmembranaires, une à chaque extrémité, ont été identifiées avec certitude (logiciels; TopPred2; TMHMM : Sonnhammer *et al.*, 1998; PSORT : Klein *et al.*, 1985; TMAP prediction : Persson et Argos, 1994, 1996). AbiC aussi possède deux régions transmembranaires, mais elles sont localisées du côté amino-terminal (acides aminés 18 à 44 et 65 à 86) (Durmaz *et al.*, 1992). Puisque l'*orf 5* et AbiC ont chacune deux régions

transmembranaires, un alignement de séquence nucléotidique et protéique a été fait afin de vérifier s'il y avait de l'homologie. La première région transmembranaire est quasiment au même endroit pour AbiC (acides aminés 18 à 44) et l'*orf 5* (acides aminés 26 à 48). Les séquences transmembranaires d'AbiC et de l'*orf 5* ne présentent pas d'homologie entre elles. Quant à la protéine putative issue de l'*orf 5*, toutes les données prédictives convergent dans le même sens, à savoir qu'il s'agirait d'une protéine d'origine bactérienne localisée dans la membrane. Les comparaisons avec la banque de données PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999; Bucher et Bairoch, 1994) a permis de trouver sept motifs dont le plus probable est celui d'un hexapeptide d'une protéine de surface d'ancrage de cocci Gram-positif (randomized probability = $8,728 \times 10^{-6}$). Plusieurs protéines connues ont un tel motif, dont des protéines de streptocoques et de lactocoques (nisp : «nisin leader peptide processing protease» et «wall-associated serine proteinase»). Le logiciel ProtParam tool (Guruprasad *et al.*, 1990), classe cette protéine potentielle dans la catégorie des protéines stables.

L'invertase/résolvase (recombinase; *lin*)

La séquence de pED1 homologue au gène *lin* possède toutes les caractéristiques habituelles permettant l'expression d'une protéine, soit un codon d'initiation, précédé d'un site de liaison au ribosome, d'un promoteur potentiel composé des boîtes -10 et -35. Comme pour plusieurs promoteurs de *L. lactis* (van der Vossen *et al.*, 1987), le couple de nucléotides TG est présent un nucléotide en amont de la boîte -10. Par contre, il est peu probable (non vérifié expérimentalement) que cette recombinase soit produite chez la souche hôte de pED1 puisqu'un codon d'arrêt est présent dans la séquence (après le premier quart de la séquence protéique théorique).

La même région de pED1 a une identité de 97% (884/903 nucléotides, 9725 à 10627) avec le plasmide pNZ4000. Toutefois, cette portion de pNZ4000 n'a pas encore été caractérisée. On peut néanmoins penser que la très grande identité entre pED1 et pNZ4000 signifie qu'une recombinase pourrait être encodée par ce dernier plasmide. Le transposon Tn1546 présente aussi de l'homologie pour cette portion de pED1. Deux régions de ce

transposon sont certainement contenues dans pED1. Le transposon Tn1546 est encadré par deux répétitions inverses juxtaposées directement à la séquence du transposon. La séquence de la répétition inversée de droite (l'autre étant absente de pED1) est identique à 100% à la séquence de pED1. Cette région flanquante est précédée du transposon Tn1546 tronqué. Seuls les 87 derniers nucléotides (12,9% de la séquence) du transposon sont présents, mais l'identité avec pED1 est de 100% (nucléotides 9584 à 9670). Cette région de pED1, identique au Tn1546, est séparée de l'orf de 998 acides aminés uniquement par deux nucléotides. Une séquence d'insertion, IS1216V, présente le même niveau d'identité à pED1 que Tn1546 et ce, exactement pour les mêmes nucléotides. IS1216V et Tn1546 ont donc au moins une région très homologue. Tn1546 et IS1216V codent tous les deux pour une transposase (tronquée chez pED1) dans cette région.

Les cadres de lecture ouverts 7 et 8

En aval de l'orf de 998 acides aminés, sont situés deux cadres de lecture ouverts séparés l'un de l'autre par 10 nucléotides. Le contenu en G+C de l'orf 7 est de 33,07% et de 31,15% pour l'orf 8. Ce qui en ferait un des trois premiers *Abi* avec un contenu G+C supérieur à 30% (en supposant qu'ils soient responsables du phénotype). Certains auteurs (Deng *et al.*, 1999) ont rapporté que *AbiN* faisait déjà exception à cette «règle». L'article original (Prévost *et al.*, 1998) fait mention de 32% pour tout le cadre de lecture comprenant *AbiN* et l'analyse de la séquence d'*AbiN* lui-même (no. d'accèsion GenBank Y11901) indique un pourcentage G+C de 31,28% pour les 537 nucléotides qui le compose. L'analyse de la séquence du gène *abiJ* (Deng *et al.*, 1997, no. accèsion GenBank U41294) indique un contenu en G+C de 30,4%. Trois autres *abi* connus (*AbiE* [Garvey *et al.*, 1995], *AbiG* [O'Connor *et al.*, 1996] et *AbiL* [Deng *et al.*, 1999]) requièrent deux cadres de lecture ouverts pour leur phénotype *Abi*.

Il semble que chez les *Abi* à deux orf (*AbiE* [Garvey *et al.*, 1995], *AbiG* [O'Connor *et al.*, 1996] et *AbiL* [Deng *et al.*, 1999]), le deuxième ne possède jamais de séquence consensus -10 et -35. Pour ces trois systèmes *Abi*, les deux orf sont co-transcrits ou présumés comme tel. Bien que les analyses de transcription n'aient pas été menées avec pED1, il semble probable

que les orf 7 et 8 seraient transcrits comme un opéron à deux cistrons à partir du RBS et des séquences -10 et -35 qui précèdent le premier de ces deux orf, puisqu'aucun promoteur potentiel n'a pu être identifié pour le second cadre de lecture ouvert. L'analyse comparative des séquences nucléotidiques ou protéiques des orf 7 et 8 de pED1 ne révèle aucune homologie significative entre ces séquences et celles contenues dans les banques de données (SwissProt et PIR).

Si, plutôt que de tenir compte de la séquence des orf 7 et 8, on porte attention à l'organisation de ces derniers par rapport aux autres gènes de pED1, la discordance avec l'organisation d'autres plasmides porteurs d'Abi devient flagrante. Habituellement, les séquences *repA*, *repB*, *orfX*, *hsdS* et *Abi* se suivent de manière assez compacte. Les systèmes d'avortement de l'infection *AbiA* (Hill, *et al.*, 1990), *AbiG* (O'Connor, *et al.*, 1996) et *AbiO* (Prévost *et al.*, 1998), ont un *orfX* répertorié dans la littérature (disponibles dans les banques de données), mais aucune séquence présentant de l'homologie avec *hsdS* n'y est contenue. Dans le cas des trois *Abi* susmentionnés, jamais l'*Abi* n'est séparé par plus de 1,5 kpb de la séquence codant pour l'*orfX*. Les séquences complètes (Boucher, 1999, communication personnelle) de deux autres plasmides codant pour les systèmes d'avortement de l'infection *AbiK* (Emond *et al.*, 1997) et *AbiQ* (Emond *et al.*, 1998), permettent une comparaison avec celle de pED1. Il s'agit des trois seuls *Abi* pour lesquels la séquence complète de leur plasmide d'origine m'était accessible. Il en ressort que pour *AbiK* et *AbiQ*, la distance entre le *hsdS* et l'*Abi* est inférieure à 600 paires de bases. Si on suppose que l'orf 7 et l'orf 8 sont responsables du phénotype de résistance aux phages, c'est plus de 6 kpb qui s'immiscent entre le *hsdS* et l'*Abi*. C'est dix fois plus important que dans le cas de *AbiK* et *AbiQ*. Qui plus est, cette séquence supérieure à 6 kpb contient un gène chromosomique (pyrrolidone-carboxylate peptidase) ainsi qu'un orf codant pour 998 acides aminés qui ne présentent aucune homologie significative avec les banques de données. Ces deux faits contribuent à émettre une hypothèse selon laquelle un échange génétique aurait eu lieu antérieurement au sein de pED1 et cette insertion s'est positionnée entre la séquence du gène *pcp* et les orf 7-8. On retrouve d'ailleurs de l'homologie pour des IS et Tn en amont de l'orf 7 et en aval du gène *pcp* (mais pas en amont de ce dernier). Le gène *pcp* aurait pu aussi être acquis par un échange entre le chromosome et pED1.

Une région d'environ 200 nucléotides localisée entre l'orf 8 et l'*oriT* présente une forte homologie avec des séquences de transposons. Essentiellement, l'homologie est reliée au transposon Tn916 contenu en partie dans divers plasmides ou dont certaines portions sont identiques à celles d'autres transposons. Plus précisément, l'homologie implique les cadres de lecture ouverts 23 et 24 du transposon Tn916. L'orf 23 présente de l'homologie avec une protéine de mobilisation MbeA (relaxase) du plasmide ColE1 (Boyd *et al.*, 1989; Flannagan *et al.*, 1994). La fonction particulière de l'orf 24 n'est pas connue. La région d'homologie entre pED1 et Tn916 s'étend sur 262 nucléotides et s'élève à 89% d'identité. Aucun des cadres de lecture ouverts n'est compris en totalité par cette région. En fait, 138 des 314 nucléotides (44%) de l'orf 23 sont compris dans cette région. Pour l'orf 24, 93 des 114 nucléotides (79%) sont inclus dans la région d'homologie avec pED1. Ces deux cadres de lectures de Tn916 en constituent l'extrémité droite et sembleraient nécessaires pour la conjugaison (Flannagan *et al.*, 1994).

CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un système anti-phage possédant les caractéristiques d'un Abi a pu être isolé d'une souche de *L. lactis* provenant du lait cru. De surcroît, l'Abi en question ne présente aucune homologie significative avec les protéines Abi répertoriées dans les banques de données. Ce qui en fait donc un nouvel Abi dans l'arsenal qui pourrait être employé pour combattre les bactériophages au sein de l'industrie de la transformation du lait.

La démonstration du caractère Abi a été faite à plusieurs niveaux. D'abord en exploitant le phénotype conféré et ensuite en étudiant le génotype. Le phénotype permettait deux approches, l'une indirecte (inférence ou d'exclusion) et l'autre directe. Le principe d'exclusion, consistait à démontrer qu'il ne s'agissait pas d'un système bloquant l'adsorption, empêchant l'éjection de l'ADN, ou encore de type restriction/modification. La méthode directe, fait appel aux caractéristiques particulières des Abi (EOP, ECOI, diminution du relarguage viral, adsorption, survie, etc).

L'adsorption cellulaire est demeurée similaire pour une souche hôte dont la seule variation génétique était l'ajout du plasmide pED1, rejetant ainsi la possibilité d'un mécanisme inhibant l'adsorption du phage. L'expérience de réplication de l'ADN total a démontré que l'ADN phagique pouvait être détecté dans le contenu intracellulaire de la souche hôte. Un mécanisme empêchant l'éjection de l'ADN viral est ainsi exclu. La même expérience de réplication a permis de visualiser l'ADN du phage p2. Si un système de restriction/modification avait été présent, un autre patron de digestion aurait été obtenu. Ainsi, un système de restriction/modification ne peut pas être considéré pour expliquer la résistance aux phages conférée par pED1. Compte tenu de la présente classification des mécanismes de résistance aux phages, il ne reste plus qu'une possibilité soit un mécanisme Abi.

L'analyse des caractéristiques phénotypiques directes suggère la présence d'un système Abi codé par pED1. L'EOP pour les phages testés de l'espèce 936 oscille entre 10^{-5} et 10^{-6} , indiquant que de 100 000 à 1 million fois moins de plages de lyse sont formées.

L'efficacité à former des centres d'infection (ECOI) est de 6,8%. Lorsque des virions matures seront libérés, c'est en moyenne 5,5 phages plutôt que 58 qui s'échappent d'une cellule, ce qui réduit le relargage d'un logarithme. En plus d'agir comme discriminant pour les divers mécanismes de résistance aux phages, les taux d'adsorption phagique et de survie cellulaire lorsqu'ils sont comparables pour une souche sensible (Abi-) et pour une souche résistante (Abi+), sont des caractéristiques intrinsèques des mécanismes d'avortement de l'infection. Contrairement à d'autres systèmes Abi, celui encodé par pED1 permet la coexistence de l'ADN phagique sous forme linéaire et répliquative (circularisée). Sans oublier la stabilité thermique (de 20 à 39°C) de l'effet protecteur de pED1, avantage non négligeable pour certaines applications industrielles. Finalement, pED1 est stable dans la souche hôte utilisée.

Les principaux cadres de lecture ouverts (orf) ont été déterminés et la comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques ont pu dans certains cas, permettre de leur associer des fonctions. D'autres cadres de lectures ouverts d'importance (de par leur taille) n'ont présenté aucune homologie significative avec les séquences des banques de données. Lorsque cela s'avérait possible, le site de liaison aux ribosomes (RBS) et le promoteur (régions -10 et -35) étaient identifiés en amont de la séquence des protéines potentielles. De cette manière, trois cadres de lecture ouverts (5, 7 et 8) sont particulièrement susceptibles d'être impliqués dans le phénotype d'avortement de l'infection.

Le premier d'entre eux coderait pour une protéine ayant jusqu'à 998 acides aminés. Son contenu en guanine et cytosine (38,95%) déroge énormément du contenu retrouvé habituellement chez les autres Abi (30%). Les deux cadres de lecture ouverts suivants (orf 7 et 8) ont aussi un contenu G+C supérieur à 30% et qui se situe respectivement à 33,07% et 31,15%. S'ils s'avéraient effectivement responsables du caractère anti-phagique, il s'agirait du troisième système Abi dont le contenu G+C est supérieur à 30% (AbiN = 31,3%, AbiJ = 30,4%, tableau 1). La structure génétique ne serait pas nouvelle en soit puisque pED1 serait porteur du quatrième Abi composé de 2 cadres de lecture ouverts. Les trois autres étant AbiE (Garvey *et al.*, 1995), AbiG (O'Connor, *et al.*, 1996) et AbiL (Deng, *et al.*, 1999).

D'un point de vue évolutif, cela pourrait signifier que l'Abi aurait été acquis d'un organisme étranger (avec un faible contenu en G+C) et que les mutations au sein de l'organisme hôte (lactocoque) auraient évoluées de façon à ce que le contenu se rapproche davantage de ce que l'on retrouve au sein des gènes de *L. lactis*, soit une composition moyenne 37% en guanine et cytosine. Quoiqu'il en soit, les deux cadres lectures seraient vraisemblablement produits sur le même cistron et semblent tout désignés pour contenir l'Abi.

En plus d'un système Abi, pED1 est porteur d'un gène chromosomique de lactocoque (pyrrolidone-carboxylate peptidase) et d'une origine de transfert pouvant potentiellement être utilisée pour de la mobilisation ou de la conjugaison. La protéine RepB pourrait alors être impliquée au cours de la mobilisation (MobA). De plus, quelques régions homologues à de nombreuses séquences d'insertions ou des transposons sont aussi présentes au sein de pED1. Ces régions du plasmide pED1 sont peut-être en partie responsables des difficultés de clonage rencontrées.

Outre la souche mère de pED1, des souches de lactocoques démontrant un potentiel de résistance aux phages qui n'est pas nécessairement de type Abi, mais qui pourrait susciter un intérêt étant donné leur efficacité (tableau 4) ont été trouvées. Il y a peut-être des perles qui dorment dans le congélateur!

Pour pED1, il reste une ultime étape à franchir, le clonage du déterminant génétique Abi. Une fois les clones obtenus, plusieurs autres manipulations pourraient en découler, dont celles impliquant l'ARN. Autre élément essentiel, tester la résistance à l'espèce P335. De plus, une expérience supplémentaire concernant l'infection des cellules serait pertinente à effectuer. En effet, puisque les composantes intracellulaires peuvent devenir un facteur limitant pour la synthèse de nouveaux virions, les phages qui peuvent dominer les coinfections hétérogènes (néologisme) ont un avantage favorisant leur propagation. Cet aspect est intéressant, particulièrement pour étudier l'efficacité d'un système anti-phage à contrer simultanément une multitude de molécules d'ADN exogènes. L'étude de la limite de coinfection a d'ailleurs été réalisée pour un phage de *Pseudomonas phaseolicola* (Turner *et al.*, 1999). Des travaux

similaires, pour les mécanismes de résistance aux phages de lactocoques, seraient fort pertinents.

Jusqu'à présent, pED1 est le premier système Abi a être disponible au Canada sans restriction de brevet et pourrait potentiellement être exploité commercialement. Qui plus est, il est le seul à avoir été découvert au Canada, uniquement par des travaux canadiens (québécois).

BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann, H. W., M. S., DuBow.** 1987. Viruses of prokaryotes. Vol. 1 CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 103-142.
- Akçelik, M.** 1998. A phage DNA injection-blocking type resistance mechanism encoded by chromosomal DNA in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PLM-18. *Milchwissenschaft.* **53** : 619-622.
- Akçelik, M., N. Tunail.** 1992. A 30 kD cell wall protein produced by plasmid DNA which encodes inhibition of phage adsorption in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft.* **47** : 215-217.
- Allison, G. E., T. R. Klaenhammer.** 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **8** : 207-226.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** : 3389-3402.
- Anba, J., E. Bidnenko, A. Hillier, D. Ehrlich, M. C. Chopin.** 1995. Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. *J. Bacteriol.* **177** : 3818-3823.
- Batt, C. A., K. Erlandson, N. Bsat.** 1995. Design and implementation of a strategy to reduce bacteriophage infection of dairy starter cultures. *Int. Dairy J.* **5** : 949-962.
- Behnke, D., H Malke.** 1978. Bacteriophage interference in *Streptococcus pyogenes*. I. Characterization of a prophage-host systems interfering with the virulent phage A25. *Virology.* **85** : 118-128.

- Beijersbergen, A., S. J. Smith, P. J. Hooykaas.** 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*. **32** : 212-218.
- Bhattacharjee, M. K., R. J. Meyer.** 1991. A segment of a plasmid gene required for conjugal transfer encodes a site-specific, single-strand DNA endonuclease and ligase. *Nucleic Acids Res.* **19** : 1129-1137.
- Bhattacharjee, M. K., R. J. Meyer.** 1993. Specific binding of MobA, a plasmid-encoded protein involved in the initiation and termination of conjugal DNA transfer, to single-stranded oriT DNA. *Nucleic Acids Res.* **21** : 4563-4568.
- Bhattacharjee, M., X. M. Rao, R. J. Meyer.** 1992. Role of the origin of transfer in termination of strand transfer during bacteria conjugation. *J. Bacteriol.* **174** : 6659-6665.
- Bidnenko, E., S. D. Ehrlich, M. C. Chopin.** 1998. *Lactococcus lactis* phage operon coding for an endonuclease homologous to RuvC. *Mol. Microbiol.* **28** : 823-834.
- Boucher, I., E. Emond, E. Dion, S. Moineau.** 1997. Characterization of a variant bacteriophage generated by high multiplicity of infection of a phage-resistant *Lactococcus lactis*. 47e congrès annuel de la société canadienne de microbiologie, Québec.
- Boucher, I., E. Emond, E. Dion, D. Montpetit, S. Moineau.** 1999. Microbiological and molecular impacts of AbiK on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages of the 936 and P335 species. Soumis.
- Boyd, A. C., J. A. K. Archer, D. J. Sherratt.** 1989. Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products. *Mol. Gen. Genet.* **217** : 488-498.
- Bucher P., A. Bairoch.** 1994. A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Ismb.* **2** : 53-61.

Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson, A. J. Hiller. 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* **26** : 49-64.

Chibani-Azaïez, S. R., I. Fliss, R. E. Simard, S. Moineau. 1998. Monoclonal antibodies raised against native major capsid proteins of lactococcal c2-like bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4255-4259.

Chung, D. K., S. K. Chung, C. A. Batt. 1992. Antisens RNA directed against the major capsid protein of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* bacteriophage F4-1 confers partial resistance to the host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 79-83.

Cleuziat, P., A. Awadé, J. Robert-Baudouy. 1992. Molecular characterization of *pcp*, the structural gene encoding the pyrrolidone carboxylate peptidase from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **6** : 2051-2063.

Coakley, M., G. F. Fitzgerald, R. P. Ross. 1997. Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1434-1440.

Coffey, A., M. Coakley, A. McGarry, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross. 1998. Increasing phage resistance of cheese starters : a case study using *Lactococcus lactis* DPC4268. *Lett. Appl. Microbiol.* **26** : 51-55.

Coffey, A., V. Costello, C. Daly, G. Fitzgerald. 1991. Plasmid encoded bacteriophage insensitivity in members of the genus *Lactococcus*, with special reference to pCI829. *Genetics and molecular biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, p. 131-135. Édité par G. Dunne, P. Cleary & L. McKay. Washington, DC : American Society for Microbiology.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16** : 10881-10890.

- Costello, V.** 1988. Characterization of bacteriophage-host interaction in *Streptococcus cremoris* UC503 and related lactic streptococci. Thèse de doctorat. National University of Ireland.
- Cram, D., A. Ray, R. Skurray.** 1984. Molecular analysis of F plasmid *pif* region specifying abortive infection of T7 phage. *Mol. Gen. Genet.* **197** : 137-142.
- Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, A. Elofsson.** 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10** : 673-676.
- Dao, M. L., J. J. Ferretti.** 1985. *Streptococcus-Escherichia coli* shuttle vector pSA3 and its use in the cloning of streptococcal genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **49** : 115-119.
- Daveran-Mingot, M. L., N. Campo, P. Ritzenthaler, P. Le Bourgeois.** 1998. A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences. *J. Bacteriol.* **180** : 4834-4842.
- Deng, Y. M., M. L. Harvey, C. Q. Liu, N. W. Dunn.** 1997. A novel plasmid-encoded phage abortive infection system from *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146** : 149-154.
- Deng, Y. M., C. Q. Liu, N. W. Dunn.** 1999. Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive infection system, *AbiL*, from *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* **67** : 135-149.
- de Vos, W. M.** 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **46** : 281-295.
- Dinsmore, P. K., T. R. Klaenhammer.** 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Mol. Biotechnol.* **4** : 297-314.

Dinsmore, P. K., T. R. Klaenhammer. 1997. Molecular characterization of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defense mechanism AbiA. *J. Bacteriol.* **179** : 2949-2957.

Dinsmore, P. K., D. J. O'Sullivan, T. R. Klaenhammer. 1998. A leucine repeat motif in AbiA is required for resistance of *Lactococcus lactis* to phage representing three species. *Gene.* **212** : 5-11.

Dion, E., E. Emond, S. Moineau. 1998. Microbiological effect of the novel and powerful abortive infection mechanism Abi900 from *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* **81** : 33 (suppl. 1).

Djordjevic, G. M., T. R. Klaenhammer. 1997a. Genes and gene expression in *Lactococcus* bacteriophages. *Int. Dairy J.* **7** : 489-508.

Djordjevic, G. M., T. R. Klaenhammer. 1997b. Bacteriophage-triggered defense systems : phage adaptation and design improvements. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 4370-4376.

Djordjevic, G. M., D. J. O'Sullivan, S. A. Walker, M. A. Conkling, T. R. Klaenhammer. 1997. A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* **179** : 6741-6748.

Dorrington, R. A., D. E. Rawlings. 1989. Identification and sequence of the basic replication region of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **171** : 2735-2739.

Durmaz, E., D. L. Higgins, T. R. Klaenhammer. 1992. Molecular characterization of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ME2. *J. Bacteriol.* **174** : 7463-7469.

- Durmaz, E., T. R. Klaenhammer.** 1995. A starter culture rotation strategy incorporating paired restriction/modification and abortive infection bacteriophage defense in a single *Lactococcus lactis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** :1266-1273.
- Ebel-Tsipis, J., D. Bolstein.** 1971. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. 1. Exclusion of generalized transducing particles. *Virology.* **45** : 629-637.
- Emond, E., E. Dion, S.A. Walker, E.R. Vedamuthu, J.K. Kondo, S.Moineau.** 1998. AbiQ, an abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4748-4756.
- Emond, E., B. J. Holler, I. Boucher, P. A. Vandenberg, E. R. Vedamuthu, J. K. Kondo, S. Moineau.** 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism AbiK from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1274-1283.
- Flannagan, S. E., L. A. Zitzow, Y. A. Su, D. B. Clewell.** 1994. Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **32** : 350-354.
- Forde, A., C. Daly, G. F. Fitzgerald.** 1999. Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1540-1547.
- Freifelder, D.** 1965. Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **54** : 128-134.
- Furuya, N., T. Komano.** 1997. Mutational analysis of the R64 *oriT* region : requirement for precise location of the NikA-binding sequence. *J. Bacteriol.* **179** : 7291-7297.
- Garbutt, K. C., J. Kraus, B. L., Geller.** 1997. Bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* engineered by replacement of a gene for bacteriophage receptor. *J. Dairy Sci.* **80** : 1512-1519.

Garvey, P., G. F. Fitzgerald, C. Hill. 1995a. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 4321-4328.

Garvey, P., C. Hill, G. F. Fitzgerald. 1996. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 676-679.

Garvey, P., A. Rince, C. Hill, G. F. Fitzgerald. 1997. Identification of a RecA homolog (RecA_{LP}) on the conjugative lactococcal phage resistance plasmid pNP40 : evidence of a role for chromosomally encoded RecA_L in abortive infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1244-1251.

Garvey, P., D. van Sinderen, D. P. Twomey, C. Hill, G. F. Fitzgerald. 1995b. Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defense systems in the genus *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* **5** : 905-947.

Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus cremoris* NCD0712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154** : 1-9.

Geller, B. L., R. G. Ivey, J. E. Trempy, B. Hettinger-Smith. 1993. Cloning of chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* **175** : 5510-5560.

Geller, B. L., J. Kraus, M. D. Schell, M. J. Hornsby, J. J. Neal, F. E. Ruch. 1998. High titer, phage-neutralizing antibodies in bovine colostrum that prevent lytic infection of *Lactococcus lactis* in fermentations of phage-contaminated milk. *J. Dairy Sci.* **81** : 895-900.

Gerdes, K., F. W. Bech, S. T. Jorgensen, A. Lobner-Olesen, P. B. Rasmussen, T. Atlung, L. Boe, O. Karlstrom, S. Molin, K. von Meyenburg. 1986. Mechanism of postsegregational

killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *EMBO. J.* **5** : 2023-2029.

Groman, N. B., M. Rabin. 1980. Superinfection exclusion by heteroimmune corynebacteriophages. *J. Virol.* **36** : 526-532.

Groman, N. B., M. Rabin. 1982. Gene responsible for superinfection exclusion of heteroimmune corynebacteriophage. *J. Virol.* **42** : 49-54.

Gruss, A., S. D. Ehrlich. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53** : 231-241.

Guruprasad, K., B. V. B. Reddy, M. W. Pandit. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition : A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.* **4**: 155-162.

Harrington, A., C. Hill. 1992. Plasmids involvement in the formation of a spontaneous bacteriophage insensitive mutant of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96** : 135-142.

Hayes, F., P. Vos, G. F. Fitzgerald, W. M. de Vos, C. Daly. 1991. Molecular organization of the minimal replicon of novel, narrow-host-range, lactococcal plasmid pCI305. *Plasmid* **25** : 16-26.

Higuchi, T., K. Uchida, K. Abe. 1999. Preparation of phage-insensitive strains of *Tetragenococcus halophila* and its application for soy sauce fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** : 415-417.

Hill, C. 1993. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 87-108.

Hill, C., I. J. Massey, T. R. Klaenhammer. 1991. Rapid method to characterize lactococcal bacteriophage genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 283-288.

Hofmann, K., P. Bucher, L. Falquet, A. Bairoch. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27** : 215-219.

Holo, H., I. F. Nes. 1989. High frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 3119-3123.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

Jarvis, A.W. 1978. Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **36** : 785-789.

Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, M. Teuber. 1991. Species and types phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology.* **32** : 2-9.

Jarvis, A. W., M. W. Lubbers, N. R. Waterfield, L. J. Collins, K. M. Polzin. 1995. Sequencing and analysis of the genome of lactococcal phage c2. *Int. Dairy J.* **5** : 963-976.

Karran, P., R. Cone, E. C. Friedberg. 1981. Specificity of the bacteriophage PBS2-induced inhibition of uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry.* **21** : 6092-6096.

Kim, S. G., C. A. Batt. 1991a. Identification of a nucleotide sequence conserved in *Lactococcus lactis* bacteriophages. *Gene.* **98** : 95-100.

- Kim, S. G., C. A. Batt.** 1991b. Antisense mRNA-mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1109-1113.
- King, W. R., E. B. Collins, E. L. Barrett.** 1983. Frequencies of bacteriophage-resistant and slow acid-producing variants of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 1481-1485.
- Klaenhammer, T. R.** 1989. Genetic characterization of multiple mechanisms of phage defense from a prototype phage-insensitive strain, *Lactococcus lactis* ME2. *J. Dairy Sci.* **72** : 3429-3445.
- Klein, P., M. Kanehisa, C. DeLisi.** 1985. The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **815** : 468-476.
- Kliem, M., B. Dreiseikelmann.** 1989. The superimmunity gene *sim* of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion. *Virology.* **171** : 350-355.
- Komanapalli, I. R., B. H. Lau.** 1998. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** : 766-769.
- Krüger, D. H., T. A. Bickle.** 1983. Bacteriophage survival : multiple mechanism for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev.* **47** : 345-360.
- Krüger, D. H., T. A. Bickle.** 1987. Abortive infection of *Escherichia coli* F⁺ cells by bacteriophage T7 requires ribosomal misreading. *J. Mol. Biol.* **194** : 349-352.
- Kues, U., U. Stahl.** 1989. Replication of plasmid in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **53** : 491-516.
- Lanka, E., B. M. Wilkins.** 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64** : 141-169.

Le Marrec, C., V. Michotey, C. Blanco, A. Trautwetter. 1994. Φ AAU2, a temperate bacteriophage specific for *Arthrobacter aureus*, whose integrative functions work in other corynebacteria. *Microbiology*. **140** : 3071-3077.

Le Marrec, C., S. Moreau, V. Leret, A. Schäffer, C. Blanco, A. Trautwetter. 1998. Cloning and sequence determination of a Φ AAU2 gene whose product aborts the phage lytic cycle. *Res. Microbiol.* **149** : 177-188.

Lepeuple, A. S., L. Vassal, B. Cesselin, A. Delacroix-Buchet, J. C. Gripon, M. P. Chapot-Chartier. 1998. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **8** : 667-674.

Lessl, M., D. Balzer, K. Weyrauch, E. Lanka. 1993. The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175** : 6415-6425.

Lin, L.-S., Y.-J. Kim, R. Meyer. 1987. The 20 bp directly repeated DNA sequence of broad host range plasmid R1162 exerts incompatibility *in vivo* and inhibits R1162 replication *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* **208** : 390-397.

Lubbers, M. W., N. R. Waterfield, T. P. Beresford, R. W. Le Page, A. W. Jarvis. 1995. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 4348-4356.

Lucey, M., C. Daly, G. F. Fitzgerald. 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 2137-2143.

Maniloff, J., H. W. Ackermann. 1998. Taxonomy of bacterial viruses : establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. *Arch. Virol.* **143** : 2051-2063.

- Marshall, R. J., N. J. Berridge.** 1976. Selection and some properties of phage-resistant starters for cheese-making. *J. Dairy Res.* **43** : 449-458.
- McKay, L. L., K. A. Baldwin, E. A. Zottola.** 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **23** : 1090-1096.
- Mclandsborough, L. A., L. Sechaud, L. L. McKay.** 1998. Synergistic effects of *abiE* or *abiF* from pNP40 when cloned in combination with *abiD* from pBF61. *J. Dairy Sci.* **81** : 362-368.
- Mills, D. A., T. G. Phister, G. M. Dunny, L. L. McKay.** 1998. An origin of transfert (*oriT*) on the conjugative element pRS01 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 1541-1544.
- Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu, P. A. Vanderbergh.** 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* **79** : 2104-2111.
- Moineau, S., E. Durmaz, S. Pandian, T. R. Klaenhammer.** 1993. Differentiation of two abortive mechanisms by using monoclonal antibodies directed toward lactococcal bacteriophage capsid proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 208-212.
- Moineau, S., J. Fortier, H. W. Ackermann, S. Pandian.** 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38** : 875-882.
- Moineau, S., S. Pandian, T. R. Klaenhammer.** 1994. Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1832-1841.
- Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu, P. A. Vandenberg.** 1995. Cloning and sequencing of *LlaDCHI* restriction and modification genes from *Lactococcus lactis* and

relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae* DpnII system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2193-2202.

Molineux, I. J. 1991. Host-parasite interactions : recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol.* **3** : 230-236.

Moreno, F. 1979. On the trapping of phage genomes in spores of *Bacillus subtilis* 168. Reciprocal exclusion of phages phi29 and phiE during outgrowth of spores. *Virology.* **93** : 357-368.

Nauta, A. 1997. Molecular characterization and exploitation of the temperate *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. Thèse de doctorat. Université de Groningen, Hollande.

Nauta, A., B. van der Burg, H. Karsens, G. Venema, J. Kok. 1997. Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling. *Bio/Technology.* **15** : 980-983.

Nyengaard, N., F. K. Vogensen, J. Josephsen. 1995. Restriction-modification systems in *Lactococcus lactis*. *Gene.* **157** : 13-18.

O'Connor, L., A. Coffey, C. Daly, G. F. Fitzgerald. 1996. AbiG, a genotypically novel abortive infection mechanism encoded by plasmid pCI750 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 3075-3082.

O'Connor, L., M. Tangney, G. F. Fitzgerald. 1999. Expression, regulation, and mode of action of the AbiG abortive infection system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 330-335.

O'Sullivan, D., A. Coffey, G. F. Fitzgerald, C. Hill, R. P. Ross. 1998. Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4618-4622.

- O'Sullivan, D. J., T. R. Klaenhammer.** 1993a. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene* **137** : 227-231.
- O'Sullivan, D. J., T. R. Klaenhammer.** 1993b. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2730-2733.
- O'Sullivan, D. J., T. R. Klaenhammer.** 1998. Control of expression of *LlaI* restriction in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **27** : 1009-1020.
- Parreira, R., S. D. Ehrlich, M. C. Chopin.** 1996. Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant *AbiB*. *Mol. Microbiol.* **19** : 221-230.
- Pecota, D. C., T. K. Wood.** 1996. Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J. Bacteriol.* **178** : 2044-2050.
- Perrin, R., P. Billard, C. Branlant.** 1997. Comparative analysis of the genomic DNA terminal regions of the lactococcal bacteriophages from species c2. *Res. Microbiol.* **148** : 573-583.
- Persson, B., P. Argos.** 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **237** : 182-192.
- Persson, B., P. Argos.** 1996. Topology prediction of membrane proteins. *Prot. Sci.* **5** : 363-371.
- Persson, C., K. Nordstrom.** 1986. Control of replication of the broad host range plasmid RSF1010 : The incompatibility determinant consist of directly repeated DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* **203** : 189-192.

- Poblet-Icart, M., A. Bordons, A. Lonvaud-Funel.** 1998. Lysogeny of *Oenococcus oeni* (syn. *Leuconostoc oenos*) and study of their induced bacteriophages. *Curr. Microbiol.* **36** : 365-369.
- Prevelige, P. E. Jr.** 1998. Inhibiting virus-capsid assembly by altering the polymerisation pathway. *Trends Biotechnol.* **16** : 61-65.
- Prévost, F., P. Ritzenthaler.** 1998. Complete sequence of the new lactococcal phage resistance gene *abiO*. *J. Dairy Sci.* **81** : 1483-1485.
- Prévots, F., S. Tolou, B. Delpech, M. Kaghad, M. Daloyau.** 1998. Nucleotide sequence and analysis of the new chromosomal abortive infection gene *abiN* of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* S114. *FEMS Microbiol. Lett.* **159** : 331-336.
- Projan, S. J., G. L. Archer.** 1989. Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pGO1 involves three pC221 loci. *J. Bacteriol.* **171** : 1841-1845.
- Salama, M., W. Sandine, S. Giovanonni.** 1998. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1313-1318.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanders, M. E., T. R. Klaenhammer.** 1980. Restriction/modification in group N streptococci : effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 500-506.
- Santos, R., C. San Jose, H. Paveia, M. A. Santos.** 1998. Genome diversity in temperate bacteriophages of *Oenococcus oeni*. *Arch. Virol.* **143** : 523-536.

Scherzinger, E., V. Haring, R. Lurz, S. Otto. 1991. Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res.* **19** : 1203-1211.

Scherzinger, E., R. Lurz, S. Otto, B. Dobrinsky. 1992. In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucleic Acids Res.* **20** : 41-48.

Schouler, C., S. D. Ehrlich, M. C. Chopin. 1994. Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome. *Microbiology.* **140** : 3061-3069.

Schouler, C., M. Gautier, S. D. Ehrlich, M. C. Chopin. 1998. Combinational variation of restriction modification specificities in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **28** : 169-178.

Scott, J. R. 1984. Regulation of plasmid replication. *Microbiol. Rev.* **48** : 1-23.

Seegers, J. F. M. L., S. Bron, C. M. Franke, G. Venema, R. Kiewiet. 1994. The majority of lactococcal plasmids carry a highly related replicon. *Microbiology.* **140** : 1291-1300.

Selinger, L. B., N. F. McGregor, G. G. Khachatourians, M. F. Hynes. 1990. Mobilization of closely related plasmids pUB110 and pBC16 by *Bacillus* plasmid pXO503 requires *trans*-acting open reading frame beta. *J. Bacteriol.* **172** : 3290-3297.

Sing, W. D., T. R. Klaenhammer. 1990. Plasmid-induced abortive infection in lactococci : a review. *J. Dairy Sci.* **73** : 2239-2251.

Sing, W. D., T. R. Klaenhammer. 1993. A strategy for rotation of different bacteriophage defenses in a lactococcal single-strain starter culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 365-372.

- Snyder, L.** 1995. Phage-exclusion enzymes : a bonanza of biochemical and cell biology reagents. *Mol. Microbiol.* **15** : 415-420.
- Sommer, R., T. Haider, A. Cabaj, W. Pribil, M. Lhotsky.** 1998. Time dose reciprocity in UV disinfection of water. *Water Sci. Technol.* **38** : 145-150.
- Sonnhammer, E., G. von Heijne, A. Krogh.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Ismb.* **6** : 175-182.
- Su, P., M. Harvey, I. J. Hee, N. W. Dunn.** 1997. Isolation, cloning and characterization of the *abil* gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M138 encoding abortive phage infection. *J. Biotechnol.* **54** : 95-104.
- Su, P., H. Im, H. L. Hsieh, S. Kang'a, N. W. Dunn.** 1999. *LlaFI*, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 686-693.
- Susskind, M. M., D. Bolstein.** 1980. Superinfection exclusion by lambda prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. *Virology.* **100** : 212-216.
- Susskind, M. M., A. Wright, D. Bolstein.** 1971. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. II. Genetic evidence for two exclusion systems. *Virology.* **45** : 638-652.
- Susskind, M. M., A. Wright, D. Bolstein.** 1974. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. IV. Genetics and physiology of sieB exclusion. *Virology.* **62** : 367-384.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** : 4673-4680.

Turner, P. E., C. L. Burch, K. A. Hanley, L. Chao. 1999. Hybrid frequencies confirm limit to coinfection in the RNA bacteriophage phi 6. *J. Virol.* **73** : 2420-2424.

van de Gutche, M., J. Kok, G. Venema. 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **88** : 73-92.

van der Vossen, J. M. B. M., D. van der Lelie, G. Venema. 1987. Isolation and characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg-2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2452-2457.

van Kranenburg, R., W. M. de Vos. 1998. Characterization of a multiple region involved in replication and mobilization of plasmid pNZ4000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180** : 5285-5290.

van Sinderen, D., H. Karsens, J. Kok, P. Terpstra, M. H. J. Ruiters, G. Venema, A. Nauta. 1996. Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* **19** : 1343-1355.

Vedantam, G., T. J. Novicki, D. W. Hecht. 1999. *Bacteroides fragilis* transfer factor Tn5520 : the smallest bacterial mobilizable transposon containing single integrase and mobilization genes that function in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181** : 2564-2571.

von Heijne, G. 1992. Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225** : 487-494.

Walker, S. A., T. R. Klaenhammer. 1998. Molecular characterization of a phage-inducible middle promoter and its transcriptional activator from the lactococcal bacteriophage ϕ 31. *J. Bacteriol.* **180** : 921-931.

Walker, S. A., C. S. Dombroski, T. R. Klaenhammer. 1998. Common elements regulating gene expression in temperate and lytic bacteriophages of *Lactococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 1147-1152.

Watanabe, K., K. Ishibashi, Y. Nadashima, T. Sakurai. 1984. A phage-resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *J. Gen. Virol.* **65** : 981-986.

Watanabe, K., S. Takesue, K. Ishibashi. 1977. Reversibility of the adsorption of bacteriophage PL-1 to cell walls isolated from *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Virol.* **34** : 189-194.

Wells, J.M., P.W. Wilson, R.W.F. LePage. 1993. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* **74** : 629-636.

Wilkins M. R., E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser. 1998. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server in : 2-D proteome analysis protocols. A. J. Link. Humana Press, New Jersey, É-U.


```

e       E L S A M V K V Y R P N S * A L R S V I -
f       N L H L W S K L M D Q I L D L * D L F S -

          Tsp509I XcmI                DdeI
          |   |                       |
601  GTTAGACCAAATTGATTTTGGGTAATGAATGTTTAGAACTTAGTAGTCGTCCTCAAAAACGA 660
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAATCTGGTTTAACTAAAACCCATTACTTACAAATCTTGAATCATCAGCAGGTTTTTGTCT

a       V R P N * F W V M N V * N L V V V Q K R -
b       L D Q I D F G * * M F R T * * S S K N D -
c       * T K L I L G N E C L E L S S R P K T T -
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
d       H * V L N I K P L S H K S S L L R G F V -
e       N S W I S K P Y H I N L V * Y D D L F S -
f       T L G F Q N Q T I F T * F K T T T W F R -

          SfaNI   TaqI
          HinFI  BsaJI |HinFI |
          TfiI   StyI |TfiI |
          |       | | | | |
661  CTACTTTTTTTGTTGAATCGTCCAAGGACGATTGCGATGCTTTTGGACTTGTGAAGAACAGGA 720
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATGAAAAAACAACCTTAGCAGGTTCTGCTAAGCTACGAAAACCTGAACATTCTTGTCTCT

a       L L F L L N R P R T I R C F * L V R T G -
b       Y F F C * I V Q G R F D A F D L * E Q D -
c       T F F V E S S K D D S M L L T C K N R I -
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
d       V V K K T S D D L S S E I S K V Q L F L -
e       * K K Q Q I T W P R N S A K S K Y S C S -
f       S S K K N F R G L V I R H K Q S T L V P -

          NlaIII
          CviJI Bst4CI   NspI                FokI   FokI
          |   |   |   |   |   |   |   |   |
721  TTGAATGAAGCCATACTGTTCCGATGTTTTTAGTGGATGAACAAATAAAAATACGAGAGAT 780
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACTTACTTCGGTATGACAAGCGTACAAAAATCACCTACTTGTATTATTTATGCTCTCTA

a       L N E A I L F A C F * W M N K * N T R D -
b       * M K P Y C S H V F S G * T N K I R E I -
c       E * S H T V R M F L V D E Q I K Y E R F -
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
d       I S H L W V T R M N K T S S C I F Y S L -
e       Q I F G Y Q E C T K L P H V F L I R S I -
f       N F S A M S N A H K * H I F L Y F V L S -

          ApoI
          BbsI
          Tsp509I
          BsmFI | MboII
          MnlI  BslI   Hpy188IX | MboII |
          |   |   |   |   |   |   |
781  TTTTTGTTTCGTTTCATCCAAAAAGAGGGACGATTTCCGGAAGACGAAATTCGTTCTCTTTT  orIT 840
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAAACAAGCAAGTAGGTTTTTCTCCCTGCTAAAGCCTTCTGCTTTAAGCAAGGAGAAAA

```


e R N * F A R F S S K L S K L E F R D I Q -
f E I K F R E L V R N L R S * N S V T * K -

MseI Tsp509I
MseI AluI |
MseI CviJI | CviJI | MseI
| | | | |
1441 TTCAAAGGGAGCATTAAAGAAGGCTTAAACGAGCTTTTAAGGGGGTTTAAATTGATTTTGA 1500
AAGTTTCCCTCGTAATTCTTCCGAATTTGCTCGAAAATTCCCCCAAATTTAACTAAAACT

a F K G S I K K A * T S F * G G L N * F * -
b S K G A L R R L K R A F K G V * I D F E -
c Q R E H * E G L N E L L R G F K L I L S -
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
d T * L S C * S P K F S S K L P N L N I K -
e E F P A N L L S L R A K L P T * I S K S -
f N L P L M L F A * V L K * P P K F Q N Q -

MseI MseI
| |
1501 GTTGAATATCTTGTGTAGTTGTAACAAAAACAAGTTAAACAAAGTATCGGTTTTCCATT 1560
CAACTTATAGAACAACATTCAACATTTTTTTGTTCAATTTGTTTCATAGCCAAAAGGTAA

a V E Y L V V S C K K T S * T K Y R F S I -
b L N I L L * V V K K Q V K Q S I G F P F -
c * I S C C K L * K N K L N K V S V F H L -
1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
d L Q I D Q Q L N Y F F L N F L T D T K W -
e N F I K N Y T T F F C T L C L I P K G N -
f T S Y R T T L Q L F V L * V F Y R N E M -

BslI Cac8I Bst4CI HgaI HinfI |
CviJI | TfiI |NlaIII
| | | | |
1561 TAAGGGTTGTTAGGGCTTGCCCTGACCGTCTGTAAGACGCTTGATTCCATGATATGAGTA 1620
ATTCCAACAATCCCGAACGGGACTGGCAGACATTCTGCGAACTAAGGTACTATACTCAT

a * G L L G L A L T V C K T L D S M I * V -
b K G C * G L P * P S V R R L I P * Y E Y -
c R V V R A C P D R L * D A * F H D M S I -
1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
d K L T T L A Q G S R R Y S A Q N W S I L -
e L P Q * P K G Q G D T L R K I G H Y S Y -
f * P N N P S A R V T Q L V S S E M I H T -

BfaI Tth111III
AluI| MseI AluI| Tsp509I HinfI ApoI
CviJI| Bst4CI | CviJI| MnlII| TfiI Tsp509I
| | | | |
1621 TTTAGCTAGTCAAACAGTTAAAACAGCTTATACGAGCAATTAGAGGGAATCCAATAAATT 1680
AAATCGATCAGTTTGTCAATTTTGTGCAATATGCTCGTTAATCTCCCTTAGGTTATTTAA


```

f      F S D R * A W E L V R L P A Y R * T * * -
                                     Hpy178III
                                     |
                                     Hpy188IX  CviRI
BplI      BspMI  |  AarI  |  Tsp509I  EarI
|          |    |    |    |    |    |
ACCAAAGAATGAACAAATCAGAAGCAGGTGCAAAATCTTGAACGAATTATCAAAACGAAG
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
TGGTTTCTTACTTGTTTTAGTCTTCGTCACGTTTAGAACTTGCTTAATAGTTTTGCTTC

a      T K E * T K S E A G A N L E R I I K T K -
b      P K N E Q N Q K Q V Q I L N E L S K R R -
c      Q R M N K I R S R C K S * T N Y Q N E E -
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
d      Y W L I F L I L L L H L D Q V F * * F S -
e      G F F S C F * F C T C I K F S N D F R L -
f      V L S H V F D S A P A F R S R I I L V F -

                                     Tsp509I Tsp509I
MboII  |  MseI  |  BsrDI  |  Tth111III  Bcefi
|    |  |    |  |    |  |    |  |
AGTAGTAGAGCATAATTCTTTAATTACCAGCATTGCCAAAATGGATAAAACGCCATTGAA
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
TCATCATCTCGTATTAAGAAATTAATGGTCGTAACGGTTTTACCTATTTGCGGTAAGT

a      S S R A * F F N Y Q H C Q N G * N A I E -
b      V V E H N S L I T S I A K M D K T P L R -
c      * * S I I L * L P A L P K W I K R H * K -
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
d      S Y Y L M I R * N G A N G F H I F R W Q -
e      T T S C L E K I V L M A L I S L V G N F -
f      L L L A Y N K L * W C Q W F P Y F A M S -

                                     DpnI
                                     Sau3AI |
Tsp509I CviJI  CviRI  |  DrdII  MboII  |  Bst4CI
|    |  |    |  |    |  |    |  |
AATGTTTGAATTAGCCGTATCGTGATTGATACCGAAGAACCACCAAAGATCATACGGT
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
TTACAAACTTAATCGGCATAGCACGTAAGTATGGCTTCTTGGTGGTTTTCTAGTATGCCA

a      N V * I S R I V H * Y R R T T K R S Y G -
b      M F E L A V S C I D T E E P P K D H T V -
c      C L N * P Y R A L I P K N H Q K I I R F -
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
d      F H K F * G Y R A N I G F F W W F I M R -
e      I N S N A T D H M S V S S G G F S * V T -
f      F T Q I L R I T C Q Y R L V V L L D Y P -

TaqI      Hpy188IX
BcgI  |  MboII  |  MseI  BcgI  |  Bst4CI
|    |  |    |  |    |  |
TTATTTATCGAAGAACGAACCTTTGCTTTTTTTAAGGTGTCTGATAATGACAAACACAG
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
AATAAATAGCTTCTTGCTTGAGAAACGAAAAAATTCCACAGACTATTACTGTTTGTGTC

a      L F I E E R T L C F F * G V * * * Q T Q -

```

b **Y L S K N E L F A F F K V S D N D K H S -**
 c I Y R R T N S L L F L R C L I M T N T V -
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 d N I * R L V F E K S K K L H R I I V F V -
 e * K D F F S S K A K K L T D S L S L C L -
 f K N I S S R V R Q K K * P T Q Y H C V C -

Tth111III CviRI
 DraII Hpy178III NlaIII DraI
 MseIII TaqII NspI CviJI MseII
 III II I I II
 TCGTTTTAAAAAGGCAGTCGAGAACATGCAAAAACAAGCCTTTTTTAAAATCAAAGAAAA
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 AGCAAAATTTTTCCGTCAGCTCTGTACGTTTTTGTTCGGAAAAATTTTAGTTTCTTTT

a S F * K G S R E H A K T S L F * N Q R K -
 b **R F K K A V E N M Q K Q A F F K I K E K -**
 c V L K R Q S R T C K N K P F L K S K K K -
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 d T T K F L C D L V H L F L G K K F D F F -
 e R K L F A T S F M C F C A K K L I L S F -
 f D N * F P L R S C A F V L R K * F * L F -

ApoI HaeIV
 Tsp509I Hinfi Hin4I
 NlaIII SspI TfiI MjaIV
 | | | | | |
 AAAAGAACATGGTTTTGAATTTGAAAATATTGTGCCGATTCCCTATGTAAAGTGGACGGA
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 TTTTCTTGTACCAAACTTAAACTTTTATAACACGGCTAAGGGATACATTTACCTGCCT

a K R T W F * I * K Y C A D S L C K V D G -
 b **K E H G F E F E N I V P I P Y V K W T D -**
 c K N M V L N L K I L C R F P M * S G R I -
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 d F F F M T K F K F I N H R N G I Y L P R -
 e F S C P K S N S F I T G I G * T F H V S -
 f F L V H N Q I Q F Y Q A S E R H L T S P -

MaeIII
 Tsp45I
 NlaIII Tsp509I
 Hpy178III Hpy178III
 RcaII Hpy188IX BceI MseI
 || | | | | | |
 TTATCATGATGAAGTCACTATCCGATTTAGTCCTGAAATTATGCCGTATTTAATCAACCT
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 AATAGTACTACTTCAGTGATAGGCTAAATCAGGACTTTAATACGGCATAAATTAGTTGGA

a L S * * S H Y P I * S * N Y A V F N Q P -
 b **Y H D E V T I R F S P E I M P Y L I N L -**
 c I M M K S L S D L V L K L C R I * S T * -
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 d I I M I F D S D S K T R F N H R I * D V -
 e * * S S T V I R N L G S I I G Y K I L R -
 f N D H H L * * G I * D Q F * A T N L * G -

ATCAAGAAATGAAGCTGACTTATTAACAGGCAATGGAAAGCAAGTACACACGATTATT
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 TAGTTCCTTTACTTCGACTGAATAATTTTGTCGGTTACCTTTCGTTTCATGTGTGCTAATAA
 a I K K * S * L I K T G N G K Q V H T I I -
 b **S R N E A D L L K Q A M E S K Y T R L L** -
 c Q E M K L T Y * N R Q W K A S T H D Y * -
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 d F * S I F S V * * F L C H F A L V C S * -
 e D L F S A S K N F C A I S L L Y V R N N -
 f I L F H L Q S I L V P L P F C T C V I I -
 XmnI Hpy178III MnlI BspMI MwoI BceII
 | | | | | | |
 GATTGAAAACCTTCTCTTATCCCCTCTTGAATGACGGACACGGCACTTATGGCAGGTTT
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 CTAACTTTTGAAGAGAATAGGGGAGAACCTTACTGCCTGTGCCGTGAATACCGTCCAAA
 a D * K L S L I P S * N D G H G T Y G R F -
 b **I E N F L L S P L E M T D T A L M A G L** -
 c L K T F S Y P L L K * R T R H L W Q V C -
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 d Q N F V K E * G R K F H R V R C K H C T -
 e I S F K R K D G R S I V S V A S I A P K -
 f S Q F S E R I G E Q F S P C P V * P L N -
 MseI
 MnlI |
 Tsp509I |
 CviRI MaeII MseI | | SimI
 | | | | | |
 GCAAAGAACGTCTATCCGTTGTATGACGAGTTAAAGGAATTAAGAGGATTGAATGGGGT
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 CGTTTCTTGCAGATAGGCAACATACTGCTCAATTCCTTAATTCTCCTAACTTACCCCA
 a A K E R L S V V * R V K G I K R I E W G -
 b **Q K N V Y P L Y D E L K E L R G L N G V** -
 c K R T S I R C M T S * R N * E D * M G S -
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 d Q L L V D I R Q I V L * L F * S S Q I P -
 e C F F T * G N Y S S N F S N L P N F P T -
 f A F S R R D T T H R T L P I L L I S H P -
 Tth1111I
 AluI |
 CviJI Cac8I CviJI | CviJI
 MseI | CviJI | HindIII | BsrDI |
 | | | | | | |
 CAAAGACCATTTAAGCTATGTAGCCAGCAAACAAGAAGCTTATTCAAACGCAATGTAGC
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 GTTTCTGGTAAATTCGATACATCGGTCGTTTGTCTTCTCGAATAAGTTTTCGCTTACATCG
 a Q R P F K L C S Q Q T R S L F K T Q C S -
 b **K D H L S Y V A S K Q E A Y S K R N V A** -
 c K T I * A M * P A N K K L I Q N A M * P -
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 d D F V M * A I Y G A F L F S I * F A I Y -


```

e       L S W K L * T A L L C S A * E F R L T A -
f       * L G N L S H L W C V L L K N L V C H L -

                MboII                Tsp509I
                CviJI |                Bst4CI |
                | |                | |
3181 CAAGTATTTGAAGAAAGCCATTGAACAATACCTACCAACTGTAAAATTACAAGACCTTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
GTTTCATAAACTTCTTTTCGGTAACTTGTATGGATGGTTGACATTTTAATGTTCTGGAACT

a       Q V F E E S H * T I P T N C K I T R P * -
b       K Y L R K A I E Q Y L P T V K L Q D L E -
c       S I * R K P L N N T Y Q L * N Y K T L N -
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
d       G L I Q L F G N F L V * W S Y F * L V K -
e       L Y K F F A M S C Y R G V T F N C S R S -
f       W T N S S L W Q V I G V L Q L I V L G Q -

                                ApoI
                                Tsp509I
                                MnlI                NlaIII |
                                CviRI |                Hpy178III | | DraI
                                MaeII | | TaqI                CviRI RcaII | | MseII
                                | | | |                | || | | | | |
3241 ACAACCAGAACGTGCAAAGGTTTCGAGGTAAAGGTGCAAGTCATGAGTGAGAATTTAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TGTGGTCTTGCACGTTTCCAAGCTCCATTTCCACGTTTCAGTACTCACTCTTAAATTTT

a       T T R T C K G S R * R C K S * V R I * K -
b       Q P E R A K V R G K G A S H E * E F K N - orf1
c       N Q N V Q R F E V K V Q V M S E N L K T - orf2
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
d       F L W F T C L N S T F T C T M L S F K F -
e       C G S R A F T R P L P A L * S H S N L F -
f       V V L V H L P E L Y L H L D H T L I * F -

                                EciI                AluI
                                FokI                CviJI
                                MseI                AciI
                                | |                | |
3301 CGATTAAGAGTTGGCGGATGAGTTAGGTGTTTCTAAACAAGCTATTCAATATCATATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
GCTAATTTCTCAACCGCCTACTCAATCCACAAAGATTGTTTCGATAAGTTATAGTATATT

a       R L K S W R M S * V F L N K L F N I I * -
b       D * R V G G * V R C F * T S Y S I S Y K -
c       I K E L A D E L G V S K Q A I Q Y H I K -
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
d       V I L S N A S S N P T E L C A I * Y * I -
e       S * L T P P H T L H K * V L * E I D Y L -
f       R N F L Q R I L * T N R F L S N L I M Y -

                                MaeIII
                                Tth111III                Tth111III|Bst4CI
                                |                || |
3361 AATCATTGACAAACAAAACCGACAAACGACAAAGGTGTAACGGTTTTGCTGCGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
TTAGTAACTGTTTGTGTTTTGGCTGTTTGTGTTGCTGTTTCCACATTGCCAAAACAGACGCT

```

```

a   N H * Q T K T D K Q T T K V * R F C L R -
b   I I D K Q K P T N K R Q R C N G F V C D -
c   S L T N K N R Q T N D K G V T V L S A I -
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
d   F D N V F L F R C V F S L P T V T K D A -
e   I M S L C F G V F L R C L H L P K T Q S -
f   F * Q C V F V S L C V V F T Y R N Q R R -

```

```

                                     HinfI
                                ApoI      MjaIV      Tth111III |
                                Tsp509I  PsiI      AccI      Tth111III |TfiI
                                |         |         |         |         |
TAGAACAAGAATTTATAAGGGGTAAAGTAGACAAACAGACAAACAAAACAAGACAAATG
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
ATCTTGTTCTTAAATATTCCCCATTTTCATCTGTTTGTCTGTTTGTTTTTGTTCTGTTTAC

```

```

a   * N K N L * G V K * T N R Q T K T R Q M -
b   R T R I Y K G * S R Q T D K Q K Q D K * -
c   E Q E F I R G K V D K Q T N K N K T N E -
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
d   I S C S N I L P L T S L C V F L F L V F -
e   L V L I * L P Y L L C V S L C F C S L H -
f   Y F L F K Y P T F Y V F L C V F V L C I -

```

```

                                     MseI
                                     VspI
                                     SspI |
                                     Tth111III ||
TaqI                                Tth111III | | | SspI MseI
|                                   |         | | | |         | |
AATCGACAAAAAAGCGACAAACAGACAAACAAAAAGAACCGAATATTAATCAATATTTGT
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
TTAGCTGTTTTTTTCGCTGTTTGTCTGTTTGTTTTTTCTTGGCTTATAATTAGTTATAACA

```

```

a   N R Q K S D K Q T N K K N R I L I N I C -
b   I D K K A T N R Q T K R T E Y * S I F V -
c   S T K K R Q T D K Q K E P N I N Q Y L L -
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
d   S D V F F R C V S L C F S G F I L * Y K -
e   I S L F A V F L C V F L V S Y * D I N T -
f   F R C F L S L C V F L F F R I N I L I Q -

```

```

                                MboII
Tsp509I      MseI      |         Tsp509I      MseI
|           |         |         |           |
TAAATGAAATTGAAGAAGTTAAGAAAAATAGGGATAAACAATTAGCAGTTAAAGACGAAC
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
ATTTACTTTAACTTCTTCAATTCTTTTATCCCTATTTGTTAATCGTCAATTTCTGCTTG

```

```

a   * M K L K K L R K I G I N N * Q L K T N -
b   K * N * R S * E K * G * T I S S * R R T -
c   N E I E E V K K N R D K Q L A V K D E Q -
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
d   N F S I S S T L F F L S L C N A T L S S -
e   L H F Q L L * S F Y P Y V I L L * L R V -
f   * I F N F F N L F I P I F L * C N F V F -

```



```

TAAAGTTGAGTTTGAGGATATTGTTTCAGGAGAAGGTCGCTTAAACAAAGATATTTTCATC
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
ATTTCAACTCAAACCTCTATAACAAAGTCCTCTCCAGCGAATTTGTTTCTATAAAGTAG

a   * S * V * G Y C F R R R S L K Q R Y F I -
b   K V E F E D I V S G E G R L N K D I S S -
c   K L S L R I L F Q E K V A * T K I F H Q -
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
d   R F N L K L I N N * S F T A * V F I N * -
e   L T S N S S I T E P S P R K F L S I E D -
f   * L Q T Q P Y Q K L L L D S L C L Y K M -

      ApoI          Tth1111I
Tsp509I          TaqI   | MaeII          SspI
      |              |   |   |           |
AAAATTTGATAGTCGAAAAGGCACGTTGTTTGAACCTGAAAATATTTTGTATGGGAAACT
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
TTTTAAACTATCAGCTTTTCCGTGCAACAAACTGGACTTTTATAAAACATACCCTTTGA

a   K I * * S K R H V V * T * K Y F V W E T -
b   K F D S R K G T L F E P E N I L Y G K L -
c   N L I V E K A R C L N L K I F C M G N F -
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
d   * F K I T S F A R Q K F R F I N Q I P F -
e   F N S L R F P V N N S G S F I K Y P F S -
f   L I Q Y D F L C T T Q V Q F Y K T H S V -

                                CviRI
                                BsbI |
      Tsp509I          Hpy188IX          |
      |              |   |           |   |
TCGTCCGTATTTGAAAATTGGTTATTCTCTGATTTTGAAGGTGTTGCATTAGGTGATTT
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
AGCAGGCATAAACTTTTAAACCAATAAGAGACTAAAACCTCCACAACGTAATCCACTAAA

a   S S V F E K L V I L * F * R C C I R * F -
b   R P Y L K N W L F S D F E G V A L G D F -
c   V R I * K I G Y S L I L K V L H * V I S -
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
d   K T R I Q F I P * E R I K F T N C * T I -
e   R G Y K F F Q N N E S K S P T A N P S K -
f   E D T N S F N T I R Q N Q L H Q M L H N -

      AluI
      HphI   CviJI          Tsp509I
      |       |           |
CTGGGTTTTTGAAGCTACTGATGTTAGCGTTCGTCCTTTGATTATTACCTAATTCAATC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
GACCCAAAACTTCGATGACTACAATCGCAAGGCAGGAACTAATAATGGATTAAGTTAG

a   L G F * S Y * C * R S V L * L L P N S I -
b   W V F E A T D V S V P S F D Y Y L I Q S -
c   G F L K L L M L A F R P L I I T * F N Q -
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
d   E P N K F S S I N A N R G K I I V * N L -
e   Q T K S A V S T L T G D K S * * R I * D -
f   R P K Q L * Q H * R E T R Q N N G L E I -

```


4441 -----+-----+-----+-----+-----+ 4500
 GTTCCTTGTCTTTTTTCCGATGAACGTTTTTTTACAAGGGATTTTTTACCACGGTTTCAAGG
 a Q G T E K R L L A K N V P * K W C Q S S -
 b **K E Q K K G Y L Q K M P P K N G A K V P** -
 c R N R K K A T C K K C S L K M V P K F L -
 4441 -----+-----+-----+-----+-----+ 4500
 d E L F L F F A V Q L F H E R F I T G F N -
 e L S C F F P * K C F I N G L F P A L T G -
 f * P V S F L S S A F F T G * F H H W L E -

FauI
 Sth132II
 Tsp509I || AciI MwoI MaeII MboII
 | || | | | | |
 TGAATTGCGATTTGCGGGGTTTGTCTGACGATTGGGAAGAACGTAAGTTCAAAGATATTCT
 4501 -----+-----+-----+-----+-----+ 4560
 ACTTAACGCTAAACGCCCAACGACTGCTAACCCCTTCTGCATTCAAGTTTCTATAAGA
 a * I A I C G V C * R L G R T * V Q R Y S -
 b **E L R P A G P A D D W E E R K P K D I L** -
 c N C D L R G L L T I G K N V S S K I F * -
 4501 -----+-----+-----+-----+-----+ 4560
 d R F Q S K R P K S V I P F F T L E F I N -
 e S N R N A P N A S S Q S S R L N L S I R -
 f Q I A I Q P T Q Q R N P L V Y T * L Y E -

AluI
 CviJI Hpy188IX
 DdeI | DrdII |
 RsaI | | BccI | | BccI RsaI XmnI
 | | | | | | | |
 AAAAACACATTCATTCCGTTCTGACTTAGCTGATGGTTCAGATGATGGTAAGTACGAAGT
 4561 -----+-----+-----+-----+-----+ 4620
 TTTTGTGTAAGTAAGGCAAGCATGAATCGACTACCAAGTCTACTACCATTCTGCTTCA
 a K N T F I P F V L S * W F R * W * V R S -
 b **K T H S P R S Y L A D G S D D G K Y E V** -
 c K H I H S V R T * L M V Q M M V S T K * -
 4561 -----+-----+-----+-----+-----+ 4620
 d * F C M * E T R V * S I T * I I T L V F -
 e F V C E N R E Y K A S P E S S P L Y S T -
 f L F V N M G N T S L Q H N L H H Y T R L -

BslI
 PflMI MjaIV
 HinfI MunI | BccI |
 TfiI MneI Tsp509I | Hpy188IX | | HphI
 | | | | | | | |
 GATTCAACAAGGTAATAATCCAATTGTTGGATATTCTGATGGTGAACCTTTTACTGATTA
 4621 -----+-----+-----+-----+-----+ 4680
 CTAAGTTGTTCCATTATTAGGTTAACAACCTATAAGACTACCACTTGGAAAATGACTAAT
 a D S T R * * S N C W I F * W * T F Y * L -
 b **I Q Q G N N P I V G Y S D G E P P T D Y** -
 c F N K V I I Q L L D I L M V N L L L I T -
 4621 -----+-----+-----+-----+-----+ 4680

```

d   H N L L T I I W N N S I R I T F R K S I -
e   I * C P L L G I T P Y E S P S G K V S * -
f   S E V L Y Y D L Q Q I N Q H H V K * Q N -

```

```

                CjePI
                BsaI |
CjeI          BsmAI |           CjeI           |           CjePI
|              ||             |             |             |
4681 CAAAGATATAACTCTATTTGGAGACCATACTGTTTCGTTATATAATCCACAAAGTCCATT 4740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTTCTATATTGAGATAAACCTCTGGTATGACAAAGCAATATATTAGGTGTTTCAGGTAA

```

```

a   Q R Y N S I W R P Y C F V I * S T K S I -
b   K D I T L F G D H T V S L Y N P Q S P F -
c   K I * L Y L E T I L F R Y I I H K V H S -
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740
d   V F I Y S * K S V M S N R * I I W L T W -
e   L S I V R N P S W V T E N Y L G C L G N -
f   C L Y L E I Q L G Y Q K T I Y D V F D M -

```

```

                                MnlI
                                ApoI           Tsp509I
                                BccI Tsp509I MseI CviRI |           BsgI
                                | | | | | | | | | |
4741 CTTTATTGCTACTGATGGAGTAAAAATTTTAAGTGCAGATAATTTTGAGGGTGATTACCT 4800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAATAACGATGACTACCTCATTTTTAAATTCACGTCTATTAAAACTCCCCTAATGGA

```

```

a   L Y C Y * W S K N F K C R * F * G * L P -
b   F I A T D G V K I L S A D N F E G D Y L -
c   L L L L M E * K F * V Q I I L R V I T F -
4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800
d   E K N S S I S Y F N * T C I I K L T I V -
e   K I A V S P T F I K L A S L K S P S * R -
f   R * Q * Q H L L F K L H L Y N Q P H N G -

```

```

                                MnlI
                                BseRI           AceIII |
                                PsiI           HgaI | |
                                Bce83I |       SmlI | | |
                                AclI AclI | | AluI | | | |
HphI MaeII MaeII | | CviJI | | | | Tsp509I
| | | | | | | | | | | | | | |
4801 TTATACAACGTTAGAACGTTATAAACCAGCTCCTCAAGGATATAAGCGTCATTTTACAAT 4860
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATATGTTGCAATCTTGCAATATTTGGTCGAGGAGTTCCTATATTCGCAGTAAAATGTTA

```

```

a   L Y N V R T L * T S S S R I * A S F Y N -
b   Y T T L E R Y K P A P Q G Y K R H F T I -
c   I Q R * N V I N Q L L K D I S V I L Q F -
4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4860
d   K I C R * F T I F W S R L S I L T M K C -
e   * V V N S R * L G A G * P Y L R * K V I -
f   K Y L T L V N Y V L E E L I Y A D N * L -

```

```

                                DrdII
                                MboII |

```


Tsp509I | |
MboIII | |
BstXI |

TTTGAAAAATAAGATTTATGTTTTACCAGAAATGTGGAAGAACAACAAAACAATTGGTTC
 4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920
 AAACTTTTTATTTCTAAATACAAAATGGTCTTTACACCTTCTGTTTTTGTTTAACCAAG

a F E K * R F M F Y Q K C G R T K T N W F -
 b **L K N K D L C P T R N V E E Q K Q I G S** -
 c * K I K I Y V L P E M W K N K N K L V H -
 4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920
 d N Q F I F I * T K G S I H F F L F L N T -
 e K F F L S K H K V L F T S S C F C I P E -
 f K S F Y L N I N * W F H P L V F V F Q N -

Tth11111
BsbI |
HphI | |
TaqI | | | MaeII
| | | |

ATTCTTCAAACAACACTCGACAACACTATCACCCCTTCATCAACGTAAGTTAGATTTATTGAA
 4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
 TAAGAAGTTTGTGAGCTGTTGTGATAGTGGGAAGTAGTTGCATTCAATCTAAATAACTT

a I L Q T T R Q H Y H P S S T * V R F I E -
 b **P F K Q L D N T I T L H Q R K L D L L K** -
 c S S N N S T T L S P F I N V S * I Y * K -
 4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
 d * E E F L E V V S D G K M L T L * I * Q -
 e N K L C S S L V I V R * * R L N S K N F -
 f M R * V V R C C * * G E D V Y T L N I S -

Tth11111
CviJI | SimI | SimI
| | |

AGAACAGAAAAAAGGCTTTTTACAAAAGATGTTTGTTTAGGGTCTATAATTAGATAATGA
 4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
 TCTTGTCTTTTTCCGAAAAATGTTTTCTACAAACAATCCCAGATATTAATCTATTACT

a R T E K R L F T K D V C L G S I I R * * -
 b **E Q K K G F L Q K H F V * G L * L D N D** - **orf3**
 c N R K K A F Y K R C L F R V Y N * I M T -
 4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
 d F F L F F A K * L L H K N L T * L * I I -
 e S C F F P K K C F I N T * P R Y N S L S -
 f L V S F L S K V F S T Q K P D I I L Y H -

CviJI
CjePI |
MseI | |
MnlI | | | CviJI
| | | | CjePI |
| | | |

CCCCTCAAAAAGACTATTAACAGCCCCCATTATCTATCGGTTAGATAATGGGGGCTGT
 5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
 GGGGAGTTTTTCTGATAATTTTGTCTGGGGTAATAGATAGCCAATCTATTACCCCGACA

a P L K K T I K T A P I I Y R L D N G G C -

f R L L N D * G D F V G V D * L H Y L I C -

ApoI
Tsp509I
NlaIII |

TaqI RsaI Hpy178III | |

Hpy178III | TatI | MboII RcaI | |

| | | | | | | |

5281 TTCTCGATAGTTTCTGTACTTCTTGGCATTTTAGAAAGGAAATCTTCTCATGAAAATTCT 5340
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGAGCTATCAAAGACATGAAGAACCGTAAAATCTTTCCTTTAGAAGAGTACTTTTAAGA

a F S I V S V L L G I L E R K S S H E N S -
b S R * F L Y F L A F * K G N L L M K I L - orf4
c L D S F C T S W H F R K E I F S * K F L -
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
d S R S L K Q V E Q C K L F S I K E H F N -
e E R Y N R Y K K A N * F P F R R M F I R -
f K E I T E T S R P M K S L F D E * S F E -

DpnI
Sau3AI |

AlwI | | BceFI

MspI | | | MseI |

BsaWI | | | VspI CviJI

MaeIII | | | | | Tsp509I | | MwoI |

| | | | | | | | | |

5341 TGTTACCGGATTGATCCCTTTGGCGACGATAAAATTAATCCTGCGATTGAAGCCGTAATA 5400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAATGGCCTAAACTAGGGAACCGCTGCTATTTTAATTAGGACGCTAACTTCGGCATT

a C Y R I * S L W R R * N * S C D * S R K -
b V T G F D P F G D D K I N P A I E A V K -
c L P D L I P L A T I K L I L R L K P * N -
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
d K N G S K I G K A V I F N I R R N F G Y -
e T V P N S G K P S S L I L G A I S A T F -
f Q * R I Q D R Q R R Y F * D Q S Q L R L -

BseSI
Bsp1286I Hpy188IX

AclI Tsp509I BmgI | Tsp509I ApoI |

MaeII MspI | FokI | | MseI | Tsp509I | MseI

| | | | | | | | | |

5401 ACGTTTGCCGGATGAAATTGCTGGGGCACAAATCGTTAAATTGGAAATTCCGACAAAGTT 5460
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAAACGGCCTACTTTAACGACCCCGTGTTTAGCAATTTAACCTTTAAGGCTGTTTCAA

a T F A G * N C W G T N R * I G N S D K V -
b R L P D E I A G A Q I V R L E I P T K F -
c V C R M K L L G H K S L N W K F R Q S L -
5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
d F T Q R I F N S P C L D N F Q F N R C L -
e R K G S S I A P A C I T L N S I G V F N -
f V N A P H F Q Q P V F R * I P F E S L T -

SfaNI


```

CviJI |
Sth132I | |
CviJI | | |
HaeI | | |
HaeIII | | |
MscI | | |
NlaIII | | |
EaeI | | |
BsaJI | | | |
BstDSI | | | |
NcoI | | | |
StyI | | | |
CviJI | | | |
HaeI | | | |
HaeIII | | | |
CjePI | | | |
MseI | | | | |
Tsp509I | | | | |
MaeIII | | | | |
BsmI | | | | |
BmrI | | | | |
BccI | | | | |
CjeI | | | | |
| | | | |
CGATGGCGAGAATGCCTACTTTACCCAGTTACCAATTAAGGCCATGGCCAAAGCCATTCCG
5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
GCTACCGCTCTTACGGATGAAATGGGTCAATGGTTAATTCCGGTACCGGTTTTCGGTAAGC

```

```

a R W R E C L L Y P V T N * G H G Q S H S -
b D G E N A Y F T Q L P I K A M A K A I R -
c M A R M P T L P S Y Q L R P W P K P F G -
5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
d A I A L I G V K G L * W N L G H G F G N -
e S P S F A * K V W N G I L A M A L A M R -
f R H R S H R S * G T V L * P W P W L W E -

```

```

AluI BsbI CviRI
CviJI CjePI BsmAI Cac8I MaeII MmeI
| | | | |
GGAAGCTGGTGTTCGGTCAGCAGTCTCCAACACAGCAGGCACTTACGTCTGCAACCACAT
5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
CCTTCGACCACAAGGCAGTCGTCAGAGGTTGTGTCTCGTCCGTGAATGCAGACGTTGGTGTA

```

```

a G S W C S V S S L Q H S R H L R L Q P H -
b E A G V P S A V S N T A G T Y V C N H I -
c K L V F R Q Q S P T Q Q A L T S A T T F -
5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
d P F S T N R * C D G V C C A S V D A V V -
e S A P T G D A T E L V A P V * T Q L W M -
f P L Q H E T L L R W C L L C K R R C G C -

```

```

CviJI
Cac8I |
MspI | |
BsrFI | | |
CviJI | | |
HaeIII | | | |
NgaIIV | | | |
Bst4CI
FauI MseI | | | |

```



```

a   R I M Y N F M I R R M I I N K G G A F E -
b   E * C T I L * * E E * * S T K V G P S K -
c   N N V Q P Y D K K N D N Q Q R W G L R K -
6541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6600
d   F F L T C N * S L F F S L * C L H P R R -
e   S Y H V I K H Y S S H Y D V F T P G E F -
f   L I I Y L K I I L L I I I L L P P A K S -

```

```

                CviJI
          Tth111III   TspRI
    Hpy188IX | Bst4CI |           Sth132I MseI |           BscGI
            | |           | |           | |           | |
6601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6660
    AAACAAGTTTTCGGATTGGCTTCACTGTTGCTTGAACATCTTTTGTTTTATTTAACGGGG
    TTTGTTCAAAGCCTAACCGAAGTGACAACGAACCTTGTAGAAAACAAAATAAATTGCCCC

```

```

a   K Q V S D W L H C C L E H L L F Y L T G -
b   N K F R I G F T V A W N I F C F I * R G -
c   T S F G L A S L L L G T S F V L F N G A -
6601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6660
d   F V L K P N A E S N S P V D K T K N L P -
e   F L N R I P K V T A Q F M K Q K I * R P -
f   F C T E S Q S * Q Q K S C R K N * K V P -

```

```

                                MaeIII
                                Tsp45I
                                CviRI
          MjaIV           BfaI CjeI           BsrI   CjeII   BsrDI   |
                |           | |           |           ||           | |
6661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6720
    CAGTTGTCACGCCGATACGCCTAGTAATGATAAACCAGTAGTTGTGACAACCATTGCAA
    GTCAACAGGTGCGGCTATGCGGATCATTACTATTTGGTCATCAACACTGTTGGTAACGTT

```

```

a   Q L S T P I R L V M I N Q * L * Q P L Q -
b   S C P R R Y A * * * * T S S C D N H C K -
c   V V H A D T P S N D K P V V V T T I A S -
6661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6720
d   A T T W A S V G L L S L G T T T V V M A -
e   L Q G R R Y A * Y H Y V L L Q S L W Q L -
f   C N D V G I R R T I I F W Y N H C G N C -

```

```

                CjeI
                CviJII
          TspRI ||
          MwoI ||           BsgI
          CjeIII ||           BsrI
          BtsI ||| ||           CviJII
          TspRI ||| ||           HaeIII
          CviRI | ||| ||           EaeI ||
          MnlII | ||| ||           GdiII ||
CjeI   BtsI || | ||| ||           MwoI ||           BcefI BtsI | | ||| |
        | | | | ||| ||           || ||           | | | | ||| |
6721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6780
    GTAATAGCAGTGCAGTGGAGGCTGAAACGGCCAGTTCAAGTAGTAGCAGTGCAGTGAAGG
    CATTATCGTACGTCACCTCCGACTTTGCCGGTCAAGTTCATCATCGTACGTCACGTTCC

```

```

a   V I A V Q W R L K R P V Q V V A V Q * R -
b   * * Q C S G G * N G Q F K * * Q C S E G -

```


TCAACTCAGGAAGCTTATCTCTTTCCAAGCTCAGATAGGTTATGGAGAAAACGCTACAGTTA
 7621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7680
 AGTTGAGTCCTTGAATAGAGAAAAGGTTGAGTCTATCCAATACCTCTTTTGCATGTCAAT

a S T Q E L I S F Q L R * V M E K T L Q L -
 b Q L R N L S L S N S D R L W R K R Y S * -
 c **N S G T Y L P P T Q I G Y G E N A T V N** -
 7621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7680
 d K L E P V * R K G V * I P * P S F A V T -
 e * S L F K D R E L E S L N H L F R * L * -
 f E V * S S I E K W S L Y T I S F V S C N -

ScrFI
 BsaJI |
 EcoRII |
 HincII ||
 MjaIV ||
 SimI ||
 MseI |

ACGACTATATGTTGACCCCAGGTAATGATTTTATTATTCCAAGCTCGGTTTAATACAATAA
 7681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7740
 TGCTGATATACAAGCTGGGGTCCATTACTAAAATAATAAGGTTGAGCCAAATTATGTTATT

a T T I C * P Q V M I L L F Q L G L I Q * -
 b R L Y V D P R * * F Y Y S N S V * Y N K -
 c **D Y M L T P G N D F I I P T R F N T I R** -
 7681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7740
 d L S * I N V G P L S K I I G V R N L V I -
 e R S Y T S G L Y H N * * E L E T * Y L L -
 f V V I H Q G W T I I K N N W S P K I C Y -

CviJI
 HaeIII
 EcoO109I |
 MmeI BsaBI Sau96I | Bce83I AluI CviJI
 | | | | | | | |
 GGAATGATGTATATCTCACAATGAGAAGTAGGGCCTATTTTGGAGCAGGATTACAGGGAG

7741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7800
 CCTTACTACATATAGAGTGTACTCTTCATCCCGGATAAAAACCTCGTCCTAATGTCCCTC

a G M M Y I S Q * E V G P I L E Q D Y R E -
 b E * C I S H N E K * G L F W S R I T G S -
 c **N D V Y L T M R S R A Y F G A G L Q G A** -
 7741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7800
 d L F S T Y R V I L L L A * K P A P N C P -
 e S H H I D * L S F Y P R N Q L L I V P L -
 f P I I Y I E C H S T P G I K S C S * L S -

Bsp24I
 AluI |
 CviJI |
 HindIII | |
 BanII | | |
 BsiHKAI | | |
 Bsp1286I | | |
 SacI | | CjeI
 SmlII | | CjePI
 ApoI
 Tsp509I
 Hpy188IX |
 DrdII | |
 CjeI | |
 CjePI | | |
 Bsp24I | | | |
 BslI | | | | |
 MjaIV MboII | | | | | |

d S A K F F V S T L K * I Y V F P F V S V -
 e H K L F Y L H * S K Y T C L P S C L F L -
 f I S * F I C I D V K I H V C L P V C F C -

ApoI
 Tsp509I
 Hpy188IX|

Sth132I

MaeIII Bpu10I |
 Tsp45I DdeI | BscGI AclI ||
 | | | | ||

ATGTGACTACACCCTTAGCACCAAACGGGTATCATCTTTATTCTCCAAACGTTTCAGAAT
 8221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8280
 TACTACTGATGTGGAATCGTGGTTTGCCCATAGTAGAAATAAGAGGTTTGCAAAGTCTTA

a M * L H P * H Q T G I I F I L Q T F Q N -
 b C D Y T L S T K R V S S L F S K R F R I -
 c **V T T P L A P N G Y H L Y S P N V S E P** -
 8221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8280
 d F T V V G K A G F P Y * R * E G F T E S -
 e H S * V R L V L R T D D K N E L R K L I -
 f I H S C G * C W V P I M K I R W V N * F -

BscGI

BspGI |

AluI | |

CviJI | |

Sth132I | | |

XcmI | | |

HphI

ApoI
 Tsp509I
 DraI |
 MseI | | BfaI XcmI | | | HphI

TTAAAATTCAAACCACTAGACCATATTTTAGCTGGACGGGTGATATATCTAATGCTATAA
 8281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8340
 AATTTTAAGTTTGGTGATCTGGTATAAAATCGACCTGCCCACTATATAGATTACGATATT

a L K F K P L D H I L A G R V I Y L M L * -
 b * N S N H * T I F * L D G * Y I * C Y K -
 c **K I Q T T R P Y P S W T G D I S N A I K** -
 8281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8340
 d N L I * V V L G Y K L Q V P S I D L A I -
 e * F E F W * V M N * S S P H Y I * H * L -
 f K F N L G S S W I K A P R T I Y R I S Y -

BbsI

MboII MaeIII

Hpy188IX AclI TaqI SimI | CjeI |

 | | | | | | |

AAATATCGGAAGCAAATGCGGATTTTCGATGACTTATTAGGGTCTAATAGTCTTCAAGTTA
 8341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8400
 TTTATAGCCTTCGTTTACGCCTAAAGCTACTGAATAATCCCAGATTATCAGAAGTTCAAT

a K Y R K Q M R I S M T Y * G L I V F K L -
 b N I G S K C G F R * L I R V * * S S S Y -
 c **I S E A N A D P D D L L G S N S L Q V T** -
 8341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8400
 d F I D S A F A S K S S K N P D L L R * T -
 e F I P L L H P N R H S I L T * Y D E L * -
 f F Y R F C I R I E I V * * P R I T K L N -

TfiI | |
| | |

9001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9060

GCCTAAACAAAAGACGATTCCAGGTTATACCTTCAAGGAAGTTCAAGGTTCTGTTTCAG
CGTGATTTGTTTTCTGCTAAGGTCCAATATGGAAGTTCCTTCAAGTTCCAAGACAAAAGTC

a A L N K R R F Q V I P S R K F K V L F Q -
b H * T K D D S R L Y L Q G S S R F C F R -
c **T K Q K T I P G Y T F K E V Q G S V S G** -
9001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9060

d L V L C F V I G P * V K L S T * P E T E -
e C * V F S S E L N Y R * P L E L N Q K L -
f A S F L L R N W T I G E L F N L T R N * -

DpnI
BstYI |
Sau3AI | |
AlwI | | | BslI |

Tsp509I | Bst4CI | MaeIII |

9061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9120

GTCAATTCACAAACCAAGAACAACCGTTACCTATGTTTATACGAAAGATCCTGTTGCTG
CAGTTAAGTGTTTGGTTCTTGTGGCAATGGATACAAATATGCTTTCTAGGACAACGAC

a V N S Q T K N K P L P M F I R K I L L L -
b S I H K P R T N R Y L C L Y E R S C C W -
c **Q F T N Q E Q T V T Y V Y T K D P V A G** -
9061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9120

d P * N V F W S C V T V * T * V F S G T A -
e D I * L G L V F R * R H K Y S L D Q Q Q -
f T L E C V L F L G N G I N I R F I R N S -

HhaI
FspI | BsrDI | Hpy188IX |

9121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9180

GTGCGCATATCATTGCGAAATATGTTGATGAAAACGGAAATACTATTTTCAGACAATGTTG
CACGCGTATAGTAACGCTTTATACAACACTTTTTGCCTTTATGATAAAGTCTGTTACAAC

a V R I S L R N M L M K T E I L F Q T M L -
b C A Y H C E I C * * K R K Y Y F R Q C C -
c **A H I I A R Y V D E N G N T I S D N V V** -
9121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9180

d P A C I M A F Y T S S F P F V I E S L T -
e H A Y * Q S I H Q H F R F Y * K L C H Q -
f T R M D N R F I N I F V S I S N * V I N -

ScrFI
EcoRII |
BciVI | |
HinfI | | |
TfiI | | |

Hpy178III | BsmAI | Hpy188IX | AluI | CviJI |

9181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9240

TGAAATCTGGAAATATCGGAGACAGCTATAACAACCTGAACAAAAGCGATTTCCTGGATACA
ACTTTAGACCTTTATAGCCTCTGTCGATATGTTGACTTGTTTTTTCGCTAAGGACCTATGT

a * N L E I S E T A I Q L N K K R F L D T -


```

e      * L * S F N * * C W I R L Y M V L F P L -
f      S Y S R F T R S V G Y G * T C * W F R S -

                                         NlaIV
                                         AluI   |
Bst4CI   RsaI   Hpy188IX           AceIII   CviJI   |
|         |         |                 |         |
ACAGTCAAGTAAGTACGCTGTTCCGGAATGGTAGTTGGTTTCTTTATCTTTGGAGCTGGAA
9421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9480
TGTCAGTTCATTCATGCGACAAGCCTTACCATCAACCAAAGAAATAGAAACCTCGACCTT

a      T V K * V R C S E W * L V S L S L E L E -
b      Q S S K Y A V R N G S W F L Y L W S W N -
c      S Q V S T L F G M V V G P P I P G A G T -
9421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9480
d      S L * T L V S N P I T T P K K I K P A P -
e      C D L L Y A T R F P L Q N R * R Q L Q F -
f      V T L Y T R Q E S H Y N T E K D K S S S -

                                         Tsp509I
                                         MseII
PpiI     EarIII
MboII|   MnlI  |||           TaqI           DrdII   CviRI
||       | |||           |                 |         |
CCCTCTCTCTCTTTCTTTAATTCAAAAAGAAAAGAAAATCGAAATAAGTGGTTCTGTTCG
9481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9540
GGGAGAGAGAGAAGAAATTAAGTTTTCTTTTTCTTTTAGCTTTATTCACCAAGACAAG Tn1546

a      P S L S S L I Q K E K E N R N K W F C C -
b      P L S L L * F K K K K K I E I S G S V A -
c      L S L F P N S K R K R K S K * V V L L Q - orf5
9481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9540
d      V R E R K K L E F L F L F D F Y T T R N -
e      G R E R R * N L F F F F I S I L P E T A -
f      G E R E E K I * F S F S F R F L H N Q Q -

                                         AluI
                                         CviJI
DraI     MseI   |HinfI
MseII    Bst4CI Tsp509I | | TfiI
||       |         | | | | |
AAAGTTTAAATAAAGAATAAAATCCCTTACGGTATCTATAATTTAAGCTGGGATTCCCA
9541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9600
TTTCAAATTTATTCTTATTTTAGGGAATGCCATAGATATTAATTCGACCCTAAGGT

a      K V L N K E * N P L R Y L * F K L G F P -
b      K F * I K N K I P Y G I Y N L S W D S Q -
c      S F K * R I K S L T V S I I * A G I P N -
9541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9600
d      C L K L Y L I F D R V T D I I * A P I G -
e      F N * I F F L I G * P I * L K L Q S E W -
f      L T K F L S Y F G K R Y R Y N L S P N G -

                                         MboII
                                         Sth132I |
RsaI     Sth132I | |
TatI |BcgI   EarI   TaqII | |           BcgI

```

```

          | | | | | | | |
ATAATACCTTGATTTTCAGTACAGACCGAAAACCCGAAGAGAGTGCCTTCTTTTCGGGTTT
9601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9660
TATTATGGAACTAAAGTCATGCTGGCTTTTGGGCTTCTCTCACGGAAGAAAAGCCCAA

a   I I P * F Q Y R P K T R R E C L L F G F -
b   * Y L D F S T D R K P E E S A F F S G F -
c   N T L I S V Q T E N P K R V P S F R V F -
9601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9660
d   L L V K I E T C V S F G F L T G E K R T -
e   Y Y R S K L V S R F G S S L A K K E P K -
f   I I G Q N * Y L G F V R L S H R R K P N -

          AvaII                      AluI
          Sau96I                      CviJI                      SspI
          | | | | | | | |
TCTTATATAATGGACCACTATCAAATAATTAGACATAAAATGAGCTATATTTTTCAATA
9661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9720
AGAATATATTACCTGGTGATAGTTTATTAATCTGIATTTTACTCGATATAAAAAAGTTAT

a   S Y I M D H Y Q I I R H K M S Y I F S I -
b   L I * W T T I K * L D I K * A I F F Q Y -
c   L Y N G P L S N N * T * N E L Y F F N I -
9661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9720
d   K K Y L P G S D F L * V Y F S S Y K K L -
Tn1546
e   R I Y H V V I L Y N S M F H A I N K * Y -
f   E * I I S W * * I I L C L I L * I K E I -

          BspGI                      ApoI
          Tsp509I Hpy178III |          Tsp509I
          Hpy188IX | MboII |          EarI MseI | MseI
          | | | | | | | |
TTTGAGTGTTTCAGAAAATTGTCATTTTCTGGACACTCTTCTTTTCTTATTAAAATTCTTA
9721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9780
AAACTCACAAGTCTTTTAACAGTAAAAGACCTGTGAGAAGAAAAGAATAATTTTAAGAAT

a   F E C S E N C H F L D T L L F L L K F L -
b   L S V Q K I V I F W T L F F S Y * N S * -
c   * V F R K L S F S G H S S F L I K I L K -
9721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9780
d   I Q T N L F N D N E P C E E K R I L I R -
e   K L T * F I T M K Q V S K K E * * F E * -
f   N S H E S F Q * K R S V R R K K N F N K -

          sth132I
          Tsp509I |
          BscGI | |
          | | |
AAATCATTFACTTTTATTGTTTCATAAACCCGTAATTTATTCTATGTTTCATTTATATACAC
9781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9840
TTTAGTAAATGAAAATAACAAGTATTTGGGCATTAATAAGATACAAGTAAATATATGTG

a   K S F T F I V H K P V I Y S M F I Y I H -
b   N H L L L L F I N P * F I L C S F I Y T -
c   I I Y F Y C S * T R N L F Y V H L Y T H -
9781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9840

```

```

d   L I M * K * Q E Y V R L K N * T * K Y V -
e   F * K S K N N M F G Y N I R H E N I Y V -
f   F D N V K I T * L G T I * E I N M * I C -

                               MseI
DdeI      Tsp509I |                               BssSI
|          | |          |                               | |
ATTTCTAAGTTATGATACAATAAAATGAAAGGAAAAAATGAATATCGGATATGCA
9841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9900
TAAAGATTCAATACTATGTTATTTAATTTTACTTCCTTTTTTTTACTTATAGCCTATACGT

a   I S K L * Y N K L K * R K K M N I G Y A - orf6
b   F L S Y D T I N * N E G K K * I S D M H -
c   F * V M I Q * I K M K E K N E Y R I C T -
9841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9900
d   C K * T I I C Y I L I F S F F S Y R I H -
e   N R L * S V I F * F S P F F H I D S I C -
f   M E L N H Y L L N F H L F F I F I P Y A -

                               Tsp509I
                               BsrI |
BspGI | |          MseI          DraI
| |          |          |          MseI |          |          |          |          |          |
CGAGTTTCAACTGGACTTCAAAATGCGTTAAAAACAAAAATCTATTTAAAAACAAGGGGAGT
9901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9960
GCTCAAAGTTGACCTGAAGTTTAAACGCAATTTTGTTTTTAGATAAAATTTTGTCCCTCA

a   R V S T G L Q I A L K Q K S I * N K G S -
b   E F Q L D F K L R * N K N L F K T R G V -
c   S F N W T S N C V K T K I Y L K Q G E C -
9901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9960
d   V L K L Q V E F Q T L V F I * K F C P S -
e   S N * S S K L N R * F L F R N L V L P T -
f   R T E V P S * I A N F C F D I * F L P L -

RsaI      Tsp509I      HaeII
MjaIV|    Bst4CI |    HhaI|
||        | |        ||
GTACTGAACTTATTGTTTATGAAAACGGTTGAATTAGAAAAGCGCCTTTCAAAAAGGTGCT
9961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10020
CATGACTTGAATAACAAATACTTTTGCCAACTTAATCTTTTCGCGGAAAGTTTCCACGA

a   V L N L L F M K T V E L E K R L S K G A -
b   Y * T Y C L * K R L N * K S A F Q K V L -
c   T E L I V Y E N G * I R K A P F K R C F -
9961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10020
d   H V S S I T * S F P Q I L F A G K L L H -
e   Y Q V * Q K H F R N F * F L A K * F T S -
f   T S F K N N I F V T S N S F R R E F P A -

BfaI      MboII      MaeIII
|          |          |
TTTTGTCTTTCTAGTTGAAAAATATAGTCTATTTTATTCTTCGTAAGTCAATTATAT
10021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10080
AAAACAGAAAGATCAAACCTTTTATATATCAGATAAAAAAATAAGAAGCATTGAGTAATATA

a   F C L S S L K N I V Y P F I L R N S L Y -

```



```

CviRI          BsgI          Tsp509I          BccI  XcmI
|              |              |              |      |
GTGCAGGATACACTACTTGTAGTTTTCGTGCTGGTCGCGCAATTACACCATCTTTCAA
10681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10740
CACGTCCTATGTGATGAACTATCAAAGCAGCAGCAGCAGCGTTAATGTGGTAGAAAGTT

a      V Q D T L L D S F R A G R R N Y T I F Q -
b      C R I H Y L I V F V L V V A I T P S F K -
c      A G Y T T * * F S C W S S Q L H H L S S -
10681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10740
d      P A P Y V V Q Y N E H Q D D C N C W R E -
e      H L I C * K I T K T S T T A I V G D K L -
f      T C S V S S S L K R A P R R L * V M K * -

MseI          NlaIII
AflIII|      Hpy178III |
CviJI  SmlII|      RcaII| | MseI  Hpy188IX
|          ||      || | |      |
GTGGGGAAAGCCACTCTCTTAAGGTAAGTGATGTCATGAAACTTAAAAAATCAGATGTC
10741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10800
CACCCCTTTCGGTGAGAGAATTCCATTCACTACAGTACTTTGAATTTTTTTAGTCTACAG

a      V G K A T L L R V S D V M K L K K S D V -
b      W G K P L S * G * V M S * N L K N Q M S -
c      G E S H S L K G K * C H E T * K I R C L -
10741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10800
d      L P S L W E R L P L H H * S V * F I L H -
e      H P F G S E * P Y T I D H F K F F * I D -
f      T P F A V R K L T L S T M F S L F D S T -

DpnI
NlaIII|
BclIII
MseI          Sau3AI||
Hpy178III|  Bst4CI |      Hpy178III |||
MseI  | BccI  | |      AcI  RcaII |||
! | | | | |      | || |||
TTTAATCCTGATGGAACGGTTAAACAACCGCTTTTATTCATGATCAAAAAACAGGAAAG
10801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10860
AAATTAGGACTACCTTGCCAATTTGTTTGCGAAAATAAGTACTAGTTTTTTTGTCTTTC

a      F N P D G T V K Q T A F I H D Q K T G K -
b      L I L M E R L N K P L L F M I K K Q E R -
c      * S * W N G * T N R F Y S * S K N R K G -
10801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10860
d      R * D Q H F P * V F R K * E H D F F L F -
e      K I R I S R N F L G S K N M I L F C S L -
f      K L G S P V T L C V A K I * S * F V P F -

BfaI
DpnI |
RsaI  BglII | |      NlaIII  AvaII
TatI | BstYI | |      Hpy178III | Sau96I
MaeII          BsrI | | Sau3AI | |      RcaII | CviJI |
|          | | | | | |      | | | | |
CGGAATACGTTATATTTGAAACCGTACAACAAGATCTAGTGGTCTATCATGATTGGCTG
10861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10920

```


MnlI
PsiI |

SfcI |

11101 TTTCTGTAGTGATTGATATAGAGTGTGGAGATACAACAAAATAAAGAATGGGATTATAAG 11160
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGACATCACTAACTATATCTCACACCTCTATGTTGTTTTATTCTTACCCTAATATTC

a F L * * L I * S V E I Q Q N K E W D Y K -
b F C S D * Y R V W R Y N K I K N G I I R -
c S V V I D I E C G D T T K * R M G L * E -
11101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11160

d T E T T I S I S H P S V V F Y L I P N Y -
e K Q L S Q Y L T H L Y L L I F F P I I L -
f N R Y H N I Y L T S I C C F L S H S * L -

BsmFI | BciVI | BsaBI |

11161 AAACGGAGGGACATTATGGAAAATAATCATCATAACAACAAAAGAAAAGGATACTAATCAC 11220
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGCCCTCCCTGTAATACCTTTTATTAGTAGTATTGTTGTTTCTTTTCCCTATGATTAGTG

a K R R D I **M E N N H H N N K E K D T N H** - orf7
b N G G T L W K I I I I T T K K R I L I T -
c T E G H Y G K * S S * Q Q R K G Y * S L -
11161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11220

d S V S P C * P F Y D D Y C C L F P Y * D -
e F P P V N H F I I M M V V F F L I S I V -
f F R L S M I S F L * * L L L S F S V L * -

ApoI
Tsp509I
BsrI |
Hpy178III | BmrI | | Tsp509I |

11221 TCTGTTAGTGTTTCAGGAAATGCTACTGGGGTTCAAATTCAACAGAATGTATCTAATTCT 11280
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACAATCACAAAGTCCTTTACGATGACCCCAAGTTTAAGTTGTCTTACATAGATTAAGA

a **S V S V S G N A T G V Q I Q Q N V S N S** -
b L L V F Q E M L L G F K F N R M Y L I L -
c C * C F R K C Y W G S N S T E C I * F Y -
11221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11280

d S Q * H K L F H * Q P E F E V S H I * N -
e R N T N * S I S S P N L N L L I Y R I R -
f E T L T E P F A V P T * I * C F T D L E -

Tth111III
|

11281 ACGCAAACACAGGCAGTAAATGAAGTTTTTGAATACGAAAAGTATTAGAAGTTTTACAC 11340
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCGTTTGTGTCCGTCATTTACTTCAAAAACCTTATGCTTTTTTCATAATCTTCAAAATGTG

a **T Q T Q A V N E V F E Y E K V L E V L H** -
b R K H R Q * M K F L N T K K Y * K F Y T -
c A N T G S K * S F * I R K S I R S F T R -
11281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11340

d * A F V P L L H L K Q I R F L I L L K V -
e R L C L C Y I F N K F V F F Y * F N * V -
f V C V C A T F S T K S Y S F T N S T K C -

ApoI
Tsp509I
NspV |
TaqI |
CjeI || |
ApoI || |
Tsp509I || |
| || |
DraI
MseII ||
||
CjeI |
AciI |
| |
11341 GAAATTTTCGAATTTCCAGCAGATGTTTAAAGATACTTACGGAAATGAAGCGGAACAAGTA 11400
-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTAAAGCTTAAAGGTCGTCTACAAATTTCTATGAATGCCTTTACTTCGCCTTGTTTCAT

a **E I S N F Q Q M F K D T Y G N E A E Q V -**
b K F R I S S R C L K I L T E M K R N K Y -
c N F E F P A D V * R Y L R K * S G T S I -
11341 -----+-----+-----+-----+-----+ 11400
d R F K S N G A S T * L Y K R F H L P V L -
e F N R I E L L H K F I S V S I F R F L Y -
f S I E F K W C I N L S V * P F S A S C T -

FokI
MaeIII |
AluI Tsp45I | Tth111III Tth111III
CviJI MwoI | |FokI | BccII
| | | | | |
11401 TTAGATTTACTAAATCAAGCTAAACAAGCAGTCACAAACAGGGAACATCCATCCAAGATA 11460
-----+-----+-----+-----+-----+
AATCTAAATGATTTAGTTCGATTTGTTTCGTTCAGTGTTCCTTGTAGGTAGGTTCTAT

a **L D L L N Q A K Q A V T N R E H P S K I -**
b * I Y * I K L N K Q S Q T G N I H P R * -
c R F T K S S * T S S H K Q G T S I Q D K -
11401 -----+-----+-----+-----+-----+ 11460
d I L N V L D L * V L L * L C P V D M W S -
e * I * * I L S F L C D C V P F M W G L Y -
f N S K S F * A L C A T V F L S C G D L I -

DdeI
MaeIII
AluI |
MseI MseI | CviJI |
| | |
11461 AAAGGATTTCTCAATGTCATTAAAGACATATCATTAAAGAGTTACAAGTAGCTTAGTGGCA 11520
-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCCTAAAGAGTTACAGTAATTTCTGTATAGTAATTCTCAATGTTTCATCGAATCACCGT

a **K G F L N V I K D I S L R V T S S L V A -**
b K D F S M S L K T Y H * E L Q V A * W Q -
c R I S Q C H * R H I I K S Y K * L S G N -
11461 -----+-----+-----+-----+-----+ 11520
d L L I E * H * * L C I M L L * L Y S L P -
e F S K E I D N F V Y * * S N C T A * H C -
f F P N R L T M L S M D N L T V L L K T A -

DdeI ApoI
 MjaIV | MnlI
 MmeI AccI | Tsp509I RsaI
 | || | | | |
 ACAGGAATACTTGGTCTACTTAGTCAAGTTGGAATTTAGAGGTAGTACAATGGGAAAAAT
 11521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11580
 TGTCTTATGAACCAGATGAATCAGTTCAACCTTAAATCTCCATCATGTTACCCTTTTAA

a **T G I L G L L S Q V G I * R * Y N G K N - orf7**
 b Q E Y L V Y L V K L E F R G S T **M G K I - orf8**
 c R N T W S T * S S W N L E V V Q W E K * -
 11521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11580
 d L L F V Q D V * D L Q F K S T T C H S F -
 e C S Y K T * K T L N S N L P L V I P F I -
 f V P I S P R S L * T P I * L Y Y L P F F -

ApoI
 BfaI DdeI Tsp509I MseI
 | | | |
 AGTTTTGGATTTACAACCTAGAAGCACTTAGTAAAGATAGCGATGTTTTGAATTTATTAAG
 11581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11640
 TCAAAACCTAAATGTTGATCTTCGTGAATCATTTCTATCGCTACAAAACCTTAAATAATTC

a S F G F T T R S T * * R * R C F E F I K -
 b **V L D L Q L E A L S K D S D V L N L L R -**
 c F W I Y N * K H L V K I A M F * I Y * G -
 11581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11640
 d Y N Q I * L * F C K T F I A I N Q I * * -
 e T K S K C S S A S L L S L S T K F K N L -
 f L K P N V V L L V * Y L Y R H K S N I L -

AluI
 CviJI MseI ApoI MboII
 HindIII | MmeI Tsp509I | Tsp509I FokI SimI | |
 | | | | | | | | | |
 GAAAGCTTATGTAGTAGCAAGAAAATTAAGTTGGATGAATTTGAAGAATGGGTCAATAG
 11641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11700
 CTTTCGAATACATCATCGTTCTTTTAATTTCAACCTACTTAACTTCTTACCCAGTTATC

a E S L C S S K K I K V G * I * R M G Q * -
 b **K A Y V V A R K L K L D E F E W V N S -**
 c K L M * * Q E N * S W M N L K N G S I V -
 11641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11700
 d P F S I Y Y C S F * L Q I F K F F P D I -
 e F A * T T A L F N F N S S N S S H T L L -
 f S L K H L L L F I L T P H I Q L I P * Y -

Hpy178III
 BceI HinfI |
 CviJI BccI | TfiI | MseI
 | | | | | |
 TGAGTTGAACGGCTATAAAGATGGCAATAAGATTCCTGAATATAGAAAAGTTAAGGGCGA
 11701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11760
 ACTCAACTGCCGATATTTCTACCGTTATTCTAAGGACTTATATCTTTTCAATTCCCGCT

a * V E R L * R W Q * D S * I * K S * G R -
 b **E L N G Y K D G N K I P E Y R K V K G E -**


```

d   R * S N I I V R I I E I T I N S F R L Y -
e   E V I L L * V F L K * P S T R S V C I C -
f   K L * * Y N C S Y N R H H H E L F A F V -

```

```

                HinfI
                TfiI
                Hpy188IXI
                ||
                MseI
                |
GCAAGACACATCAGAATCTACGCAAAAATAGAGTAATACGATTTTAAGGAGT
12181 -----+-----+-----+-----+-----+----- 12232
CGTTCTGTGTAGTCTTAGATGCGTTTTTATCTCATTATGCTAAAATTCCTCA

```

```

a   A R H I R I Y A K I E * Y D F K E -
b   Q D T S E S T Q K * S N T I L R S - orf8
c   K T H Q N L R K N R V I R F * G -
12181 -----+-----+-----+-----+-----+----- 12232
d   L L V C * F R R L F L T I R N * P T -
e   C S V D S D V C F Y L L V I K L L -
f   A L C M L I * A F I S Y Y S K L S -

```

Enzymes that do cut:

AarI	AccI	AceIII	Acii	AcII	AflIII	AflIII	AluI
AlwI	AlwNI	ApoI	AvaII	BanI	BanII	BbsI	BbvI
BbvCI	BccI	Bce83I	BceFI	BcgI	BciVI	BclI	BfaI
BglII	BmgI	BmrI	BplI	BpmI	Bpu10I	BsaI	BsaAI
BsaBI	BsaJI	BsaWI	BsaXI	BsbI	BscGI	BseMII	BseRI
BseSI	BsgI	BsiEI	BsiHKAi	BslI	BsmI	BsmAI	BsmBI
BsmFI	Bsp24I	Bsp1286I	BspGI	BspMI	BsrI	BsrBI	BsrDI
BsrFI	BsrGI	BsssI	BstAPI	Bst4CI	BstDSI	BstXI	BstYI
BstZ17I	BtrI	BtsI	Cac8I	CjeI	CjePI	CviJI	CviRI
DdeI	DpnI	DraI	DrdI	DrdII	EaeI	EarI	EciI
Eco47III	Eco57I	EcoO109I	EcoRI	EcoRII	EcoRV	FauI	Fnu4HI
FokI	FspI	GdiII	HaeI	HaeII	HaeIII	HaeIV	HgaI
HhaI	Hin4I	HincII	HindIII	HinfI	HpaI	HphI	Hpy178III
Hpy188IX	Kpn2I	MaeII	MaeIII	MboII	MjaIV	MmeI	MnlI
MscI	MseI	MslI	MspI	MspAI	MunI	MwoI	NciI
NcoI	NgoAIV	NlaIII	NlaIV	NsiI	NspI	NspV	PacI
PciI	Pfl1108I	PflMI	PleI	PmlI	PpiI	PsiI	Psp5II
PvuII	RcaI	RsaI	SacI	Sau96I	Sau3AI	ScrFI	SfaNI
SfcI	SimI	SmlI	SnaBI	Sse8647I	SspI	sth132I	StyI
TaqI	TaqII	TatI	TauI	TfiI	ThaI	TseI	Tsp45I
Tsp509I	TspRI	Tth111III	VspI	XbaI	XcmI	XmnI	

ScaI coupe au site 0

Enzymes that do not cut:

AatII	AhdI	AloI	ApaI	ApaLI	AscI	AvaI	AvrII
BaeI	BamHI	BglI	Bpu1102I	BsaHI	BssHII	BstEII	Bsu36I
ClaI	DraIII	EagI	EcoNI	FseI	HgiEII	KpnI	MluI
NarI	NdeI	NheI	NotI	NruI	PinAI	PmeI	PshAI
PstI	PvuI	RleAI	RsrII	SacII	SalI	SanDI	SapI
SbfI	ScaI	SexAI	SfiI	SgfI	SgrAI	SmaI	SpeI
SphI	SrfI	Sse232I	StuI	SunI	SwaI	Tth111I	XhoI