Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2131984 C 2005/01/11

(11)(21) 2 131 984

(12) BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT

(13) C

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1993/03/12
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1993/09/16
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2005/01/11
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1994/09/13
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1993/000248
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1993/018164
(30) Priorité/Priority: 1992/03/13 (92/03034) FR

(51) Cl.Int.^{5}/Int.Cl.^{5} C12N 15/74, C12N 1/21

(72) Inventeurs/Inventors:
GRUSS, ALEXANDRA, FR;
MAGUIN, EMMANUELLE, FR

(73) Propriétaire/Owner:
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA), FR

(74) Agent: OGILVY RENAULT

(54) Titre : PLASMIDE THERMOSENSIBLE
(54) Title: THERMOSENSITIVE PLASMIDE

(57) Abrégé/Abstract:
La présente invention concerne un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram positives, caractérisé en ce qui comporte au moins: un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne, un système de réplication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte, en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37 °C, ainsi qu'une bactérie le contenant et un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie.

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/74, 1/21

A1

(11) Numéro de publication internationale: **WO 93/18164**

(43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)

2131984

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00248

(22) Date de dépôt international: 12 mars 1993 (12.03.93)

(30) Données relatives à la priorité:
92/03034 13 mars 1992 (13.03.92) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US):* INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement) :* GRUSS, Alexandra [FR/FR]; 55, rue Charlot, F-75003 Paris (FR). MAGUIN, Emmanuelle [FR/FR]; 16, avenue du Fort, F-92120 Montrouge (FR).

(74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: THERMOSENSITIVE PLASMID

(54) Titre: PLASMIDE THERMOSENSIBLE

(57) Abstract

Bacterial vector plasmid of the type having an efficient replication origin in Gram-positive bacteria. Said plasmid is characterized by having at least one marber gene which expresses itself in a bacterial hast strain, an efficient replication system which is thermosensitive based on a temperature compatible with the viability of the hast strain, and in that the temperature of replication inhibition is below or equal to approximately 37 °C. The invention also concerns a bacteria containing said plasmid and a process for inactivating a gene in the chromosome of a bacteria.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram positives, caractérisé en ce qui comporte au moins: un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne, un système de réplication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte, en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37 °C, ainsi qu'une bactérie le contenant et un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie.

PLASMIDE THERMOSENSIBLE

La présente invention concerne un plasmide utilisable pour la modification génétique des bactéries à coloration gram positive, en particulier des bactéries lactiques présentant un intérêt industriel ou médical.

Elle concerne également des bactéries contenant un tel plasmide. Elle concerne enfin des procédés de modifications génétiques mettant en oeuvre un tel plasmide, soit pour inactiver un gène normalement présent dans le chromosome bactérien, soit pour introduire et exprimer un gène d'intérêt.

De nombreuses bactéries gram à coloration gram positive sont des sujets d'étude comme modèle biologique (par exemple les bactéries du genre Bacillus), comme souche de fermentation d'intérêt industriel (bactéries à acide lactique) ou comme pathogène (par exemple Clostridia, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus). Beaucoup de ces souches sont caractérisées d'un point de vue physiologique mais peu ont été étudiées ou modifiées génétiquement. L'étude ou la modification des souches peut être facilitée par l'utilisation de vecteurs permettant des insertions dirigées ou non-spécifiques dans le chromosome bactérien. Des systèmes de délivrance qui sont fondés sur des vecteurs non réplicatifs sont limités aux bactéries qui peuvent être transformées avec une haute fréquence et ceux utilisant des réplicons actifs uniquement sous certaines conditions sont souvent limités à leur spectre d'hôte. Aussi la construction de souches recombinantes requiert un effort important et ne peut être appliquée avec efficacité qu'à certains microorganismes spécifiques.

L'addition, la perte ou la modification de gènes peuvent transformer le rôle d'un organisme dans un processus industriel tel que la fermentation.

La biotechnologie cherche à faciliter l'usage industriel de microorganismes. Par exemple, les bactéries lactiques sont utilisées en agroalimentaire, majoritairement pour la fabrication de produits laitiers fermentés, mais aussi en dehors de la filière lait pour la fabrication de vin, cidre, charcuterie et ensilage.

2131984

Il est donc particulièrement souhaitable de disposer de moyens efficaces d'introduire ou de modifier spécifiquement et définitivement certains gènes dans ces organismes.

Actuellement, la modification du chromosome chez les bactéries lactiques est effectuée par l'intermédiaire d'un système par transformation d'un plasmide non réplicatif. Dans une seule étape, il est nécessaire d'avoir deux évènements de basse fréquence, la transformation par un plasmide, et une recombinaison dans le chromosome. La probabilité d'obtenir ces deux évènements dans une seule étape est le produit des probabilités de chacun ; donc une chance très faible d'obtenir la modification.

Le plasmide pWV01 est un plasmide cryptique initialement isolé chez Lactococcus lactis subsp. cremoris ; il s'agit d'un plasmide à large spécificité d'hôte, réplicatif à la fois dans des bactéries gram positif et gram négatif, notament chez E. coli, Bacillus subtilis, Lactococcus lactis, Streptococcus et Lactobacillus. Il a été caractérisé et sa séquence nucléotidique a été publiée par Leenhouts et al (1991).

Dans la demande WO 85/03495, de larges fragments de ce plasmide sont utilisés pour construire un plasmide recombinant pGK12, marqué par le gène de résistance à l'érythromycine, et/ou le gène de résistance au chloramphénicol (la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT)). Ce plasmide pGK12 n'est pas utilisable pour faire des intégrations dans le chromosome bactérien.

Les plasmides non réplicatifs utilisés jusqu'à présent permettent de pallier ce problème, mais ce système requiert des taux de transformation élevés pour permettre la détection d'évènements de basse fréquence tels que la transposition ou la recombinaison dans le chromosome ; or la plupart des bactéries lactiques sont faiblement transformables.

L'ensemble de ces difficultés pourrait être surmonté grâce à l'obtention d'un réplicon thermosensible, utilisable comme vecteur de livraison dans les bactéries, lactiques ou autres.

Les plasmides pE194 et PSH71 ont été décrits comme naturellement thermosensibles, au-dessus d'une température de 51° C (J. Bacteriol., 1990, 172, 4543-4548)

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram+, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne,
- un système de réplication efficace qui est thermosensible (Ts) à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte,

et en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37° C.

Le fait que le plasmide selon l'invention soit non réplicatif à 37° C le rend particulièrement approprié dans le cas où les bactéries ont une température de croissance relativement basse, ou lorsqu'un choc thermique important n'est pas souhaitable. Le plasmide selon l'invention est utilisable seul, il n'a pas à être associé à un autre plasmide. L'inhibition de la réplication par des températures supérieures à environ 37° C, n'est pas souche dépendante. Il possède un large spectre d'hôtes et peut s'établir notamment chez les souches classiques appartenant au groupe comprenant : Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Listeria, Pediococcus, Staphylococcus, Clostridia, Leuconostoc, E. coli. Parmi celles-ci, on peut citer à titre d'exemple les espèces suivantes : B. subtilis, E. faecalis, L. fermentum, L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis, S. pyogenes, S. thermophilus, S. sanguis, L. monocytogenes.

Le plasmide selon l'invention porte au moins un gène codant pour un marqueur de sélection, ainsi que les éléments nécessaires à son expression tels que promoteur, site de fixation des ribosomes, terminateur, etc. Des gènes de sélection sont par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques (Erythromycine, chloramphénicol), ou permettant la croissance sur un milieu dépourvu de certains éléments, etc.

Le gène marqueur est intégré dans le chromosome en cas de recombinaison.

Par système de réplication, on entend un système comprenant une origine de réplication ainsi que la protéine induisant son fonctionnement ; ladite protéine est inactivée au-dessus d'une température inhibant le système de réplication.

Un tel plasmide se réplique normalement à 28° C, chez un grand nombre de bactéries. A une température supérieure à environ 35° C, la réplication de ce plasmide est inhibée ; cette température inhibitrice de la réplication du plasmide est relativement basse et permet la multiplication et la croissance normale de la plupart des bactéries, en particulier des bactéries lactiques. La température recommandée pour l'inactivation efficace de ce plasmide est de 37° C.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un plasmide vecteur, caractérisé en ce qu'il contient le plus grand fragment Cla I du plasmide pWV01, présentant au moins une mutation dans la région TthI-RsaI.

Plus particulièrement, un plasmide vecteur à réplication thermosensible selon l'invention présente au moins une mutation dans la région correspondant à RepA du plasmide pWV01. La protéine RepA est codée par l'un des 4 cadres ouverts de lecture (ORF) identifiés sur pWV01, l'ORF A. et est nécessaire pour la réplication.

Des mutations préférées de ce plasmide se trouvent dans les positions 972, 977, 980 et 987 de la séquence nucléotidique de pWV01.

La protéine RepA codée par le plasmide selon l'invention présente, par rapport au type sauvage, les modifications représentées à la figure 3, à savoir le remplacement de :

- Ser par Asn,
- Asp par Asn,
- Val par Ile,
- Arg par Gln.

Un tel plasmide constitue un vecteur suicide à large spécificité d'hôte, d'un type unique jusqu'à nos jours dans le domaine des bactéries lactiques.

En effet, il permet de dissocier en deux étapes, l'intégration dans le chromosome. Dans la première étape de transformation, le plasmide est établi dans la cellule. Dans la deuxième étape, l'évènement d'intégration dans le chromosome est sélectionné par élévation de la température. On peut ainsi modifier génétiquement des bactéries reputées peu transformables.

Plus particulièrement, des plasmides selon l'invention comportent une des séquences représentées sur une des figures 9, 10 ou 11, ou une séquence représentant au moins 80% d'homologie avec ces séquences.

Les outils génétiques ainsi développés permettent d'introduire et de stabiliser des gènes dans le chromosome bactérien.

On choisit par exemple d'appliquer un procédé par recombinaison homologue.

Pour cela, on utilise un réplicon thermosensible selon l'invention, qui comporte en outre au moins un fragment d'ADN homologue à l'ADN chromosomique de la bactérie que l'on veut modifier.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie, caractérisé en ce que :

a) on introduit dans la bactérie, par transformation, le plasmide selon l'invention,

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur plasmidique.

Le fragment chromosomique cloné dans le plasmide peut correspondre à un gène précis, qui est spécifiquement inactivé par intégration du plasmide au niveau de la copie chromosomique du gène. Dans la population bactérienne, seul ce site d'intégration sera trouvé.

Dans un autre mode de réalisation, l'ADN bactérien présent dans le plasmide pourra être choisi dans une banque de fragments chromosomiques pour le clonage, et il y aura intégration au hasard ; le site d'intégration du plasmide est différent d'une bactérie à l'autre et on réalise ainsi de la mutagénèse.

Le procédé peut également s'appliquer à un réplicon thermosensible porteur d'un transposon. On dispose de différents transposons pour mutagéniser le chromosome.

Le plasmide Ts est employé comme porteur d'un de ces transposons éventuellement modifié pour être actif chez L. lactis. Chaque transposon porte un gène marqueur (ex: gène de résistance). En appliquant le protocole précédemment décrit (a à c), on obtient, des cellules ayant intégré le transposon dans leurs chromosomes. On sélectionne ces cellules au moyen du marqueur du transposon. Dans le cas de la transposition, le plasmide n'est pas intégré dans le chromosome.

En variante, le plasmide vecteur selon l'invention comporte également un locus de mobilisation permettant la conjugaison. De préférence, ce locus de mobilisation est le locus ori T, extrait d'un plasmide de bactérie à gram positif, préférentiellement pouvant être extrait d'un plasmide de Streptococcus. Le plasmide vecteur portant ce locus peut être mobilisé et transféré par conjugaison chez des espèces bactériennes non transformables.

Le procédé d'inactivation d'un gène dans une bactérie fait alors intervenir les étapes suivantes :

a) on introduit dans la bactérie, par conjugaison, un plasmide selon l'invention, portant un locus de mobilisation et un fragment homologue au chromosome et/ou un transposon.

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

Les bactéries obtenues à l'issue de l'étape d) ont subi un évènement de recombinaison ou de transposition et portent le marqueur du transposon ou du plasmide.

En variante, le plasmide vecteur selon l'invention, comporte également un réplicon actif chez E. coli. Le plasmide vecteur portant ce locus, et ces dérivés, peut être propagé chez E. Coli. Les constructions préparées et propagées chez E. coli à 37° C (grâce au deuxième réplicon) peuvent être ensuite transférées dans les bactéries lactiques dans lesquelles seul le réplicon Ts sera actif.

Dans les procédés décrits ci-dessus, après introduction du plasmide vecteur dans la bactérie par transformation ou conjugaison à l'étape a), on laisse le plasmide s'établir dans la population bactérienne, par réplication, à 28-30° C.

Le caractère de sélection est exprimé dans l'ensemble des bactéries. Quand la température s'élève au-dessus de 35° C, le plasmide sous forme libre devient incapable de se répliquer et se trouve donc perdu lors des divisions cellulaires. Seules les bactéries pour lesquelles ce plasmide s'est intégré par recombinaison dans le chromosome ou pour lesquelles le transposon s'est intégré dans le chromosome, conservent et transmettent l'information génétique portée par le plasmide ou le transposon et leur permettant de pousser sur milieu sélectif. On sélectionne ainsi les évènements d'intégration, de basse fréquence, en récupérant les bactéries se multipliant à 35-37° C sur milieu sélectif.

Lorsque le plasmide est intégré dans le chromosome, il présente une excellente stabilité, qui peut être de l'ordre de 99% après 75 générations à 37,5° C.

Le schéma suivi pour l'intégration du plasmide par recombinaison homologue est illustré à la figure 6.

La souche L. lactis VE 6002 contenant le plasmide pVE6002 selon l'invention a été déposée à la collection nationale de l'Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, Paris sous le numéro 1-1179, le 13 mars 1992.

Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet un procédé permettant l'introduction d'un gène hétérologue dans une bactérie. Pour sa mise en oeuvre, on utilise un plasmide vecteur thermosensible tel qu'il a pu être défini précédemment, et comportant en outre un gène codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression, et qui sont connus de l'homme du métier. Le cas échéant, ce gène pourra être porté par le transposon. On suit alors les étapes indiquées ci-après.

a) on introduit dans la bactérie, par transformation ou conjugaison un plasmide selon l'invention,

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur du plasmide ou du transposon.

L'invention a également pour objet des bactéries contenant un plasmide selon l'invention, sous forme libre ou intégrée dans le chromosome.

De telles bactéries trouveront notamment des applications dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, en particulier laitière, ou fromagère.

Dans certains des cas décrits précédemment, on souhaite pouvoir éliminer tout ou une partie du matériel génétique introduit dans le chromosome bactérien par le procédé selon l'invention.

Le procédé de recombinaison homologue permet deux étapes : la première consiste à sélectionner l'évènement d'intégration du plasmide, la seconde étape - qui est facultative - consiste à exciser du chromosome le réplicon et les marqueurs qui ne correspondent pas aux normes alimentaires.

Excision du réplicon : l'intégration par recombinaison homologue crée des duplications de chaque côté du plasmide Ts (Fig. 7a). Il a été montré qu'un plasmide rolling-circle, réplicatif intégré dans le chromosome stimule fortement la recombinaison homologue entre les séquences avoisinantes. Lorsque le fragment chromosomique porté par le plasmide Ts contient un marqueur, les duplications créées par l'intégration permettent d'exciser le réplicon en laissant un gène chromosomique inactif (Fig. 7a). Expérimentalement, il s'agit de cultiver à 28° C la souche contenant le plasmide intégré (préalablement sélectionée à 37° C). A température permissive, la réplication reprend et stimule la recombinaison entre les séquences répétées aboutissant à la délétion du réplicon (Fig. 7a).

La présente invention a également pour objet un plasmide vecteur à réplication thermosensible présentant une ou plusieurs des caractéristiques déjà exposées, et dans lequel une région interne est dupliquée. Les deux séquences identiques sont placées de manière à encadrer la région que l'on souhaite éliminer. Un tel plasmide est alors utilisé dans un procédé d'inactivation d'un gène ou d'introduction d'un gène hétérologue par recombinaison dans le chromosome bactérien, tels que décrits ci-dessus.

A l'issue de l'étape d), les bactéries survivantes sont à nouveau mises en culture à une température inférieure à la température d'inhibition, par exemple à 28-30° C, sur milieu non sélectif. En effet, un plasmide réplicatif stimule fortement la recombinaison homologue entre les

2131984

séquences avoisinantes. La souche contenant le plasmide intégré préalablement sélectionnée à 35-37° C est cultivée à température permissive : la réplication plasmidique reprend, stimulant la recombinaison entre les séquences répétées. Le réplicon et les marqueurs incompatibles avec, par exemple, une utilisation agroalimentaire de ce système, sont excisés, avec rétention éventuelle du gène modifié. La sélection des bactéries ayant excisé les marqueurs indésirables se fait après étalement à température non-permissive. Ce mécanisme est illustré sur la figure 7b.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

On se réfèrera aux figures suivantes :

FIGURE 1 : cinétique de perte et analyse du nombre de copies de pVE6002 selon l'invention et de pVE6001 non Ts. L. lactis subsp. lactis IL 1403 portant le plasmide pGK12, pVE6001 ou pVE6002 sont cultivés à 28° C ou 37,5° C. Après différents temps de culture, des échantillons sont prélevés pour être cultivés à 28° C sur des milieux sélectifs et non-sélectifs. 100 colonies sont repiquées à partir du milieu non-sélectif sur le milieu sélectif (Em 5 µg/ml) pour évaluer la proportion de cellules contenant un plasmide dans la population. Les extractions d'ADN total sont faites sur les cultures à 28° C ou 37,5° C, sans sélection, pendant 5h 30.

FIGURE 2 : Plasmide hybride de pGK12 et pVE6002. pVE6043 est constitué du fragment SacI-ThaI, de 994 pb, de pGK12, lié au fragment ThaI-SacI de 3384 pb de pVE6002.
pVE6044 contient la paire réciproque, le fragment SacI-ThaI de 994 pb de pVE6002, lié au fragment ThaI-SacI de 3384 pb de pGK12. Les traits fins correspondent à l'ADN de pGK12 ; les traits épais pointillés, à l'ADN de pVE6002.

FIGURE 3 : Localisation de la mutation Ts dans le gène RepA de pVE6002. Le fragment Tha1-Rsa1 de pVE6002, contenant le gène RepA a été séquencé sur les deux brins. La séquence montre quatre mutations aux positions 972, 977, 980, 987 alors que le reste de la séquence ne diffère pas de la séquence publiée pour le réplicon parental pWV01.

FIGURE 4 : Description des dérivés thermosensibles. pVE6006 est construit par insertion du fragment PvuII de 445 pb de pBluescript SK+ dans le site Cla1 de pVE6002.
pVE.6007 provient d'une délétion Sac1 de pVE6006, conduisant à la perte du gène de résistance à l'érythromycine.
pVE.6004 est construit par insertion du fragment PvuII de 445 pb de pBluescript SK+ dans le fragment Cla1-HpaII de pVE6002 dépourvu de gène de résistance au chloramphénicol.

FIGURE 5 : Comparaison des protéines analogues à Rep de PE.194.

FIGURE 6 : Schéma du procédé d'inactivation d'un gène.

FIGURE 7a : Schéma d'un exemple d'excision du réplicon Ts en deux étapes.

7b : Schéma de l'excision du réplicon au moyen de duplications plasmidiques.

FIGURE 8 : Construction des plasmides pG^+host5 et pG^+host6 à partir du plasmide pG^+host4 (ou pVE6004) : le plasmide pG^+host5 est construit par insertion du fragment Ava I - Alw N I de pBR 322 (qui contient l'origine de réplication de pBR 322) dans le pG^+host4 linéarisé par Nsi I.
pG^+host6 est construit par insertion du fragment Ava I - Eco R I de pBR 322 (qui contient l'origine de réplication de pBR 322 et le gène de résistance à l'ampicilline) dans le pG^+host4 linéarisé par Nsi I.

FIGURE 9 : Séquence nucléotidique de pG^+host4.

FIGURE 10 : Séquence nucléotidique de pG^+host5.

FIGURE 11 : Séquence nucléotidique de pG^+host6.

Exemple 1 : Préparation et caractérisation d'un plasmide vecteur thermosensible

MATERIELS ET METHODES

Les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Génétique Microbienne, Institut de Biotechnologie, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex France.

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.

Les plasmides et les souches bactériennes utilisées sont indiqués dans le tableau 1. Les constructions de pVE6043 et pVE6044 sont décrites dans la figure 2 ; les plasmides pVE6004, pEV6006 et pVE6007 sont présentés à la figure 4. pVE6004 (ou pG$^+$host4) est construit par insertion d'un fragment d'ADN PvuII de 445 pb dans le fragment ClaI-HpaII de 3340 pb à extrémité franche de l'isolat Ts original, dépourvu du gène de résistance Cm. Le fragment PvuII de 445 pb contient un site de multiclonage, les promoteurs T7 et T3, et les sites pour M13 - 20, T7, T3 et des amorces inverses qui permettent le séquençage direct à partir du vecteur. Ce plasmide est thermosensible dans tous les hôtes testés, y compris chez E. coli et doit être maintenu à 28° C.

E. coli et Bacillus subtilis ont été cultivés en milieu LB. L. lactis subsp. lactis (L. lactis) est cultivé sur milieu M17, dans lequel on a remplacé le lactose par du glucose. On a utilisé respectivement du chloramphénicol (Cm) à 5 µg/ml pour L. lactis et B. subtilis et de l'érythromycine (Em) à 5 µg/ml et 0,5 µg/ml respectivement. Le Cm, l'azaerythromycine et l'érythromycine ont été utilisés à des concentrations finales respectives de 15 µg/ml, 100 µg/ml et 150 µg/ml pour E. coli.

Clonage moléculaire, compétence et procédure de transformation.

Des enzymes du commerce ont été utilisées comme indiqué par les fournisseurs. Des mini-lysats de cellules entières et du DNA plasmidique ont été préparés ainsi qu'il est décrit dans la littérature. L'induction de compétence et la transformation d'E. coli et de B. subtilis ont été effectuées par des procédures standards (Hanahan, 1985, ou Niaudet et al, 1979). Les souches de L. lactis ont été électrotransformées comme décrit par Langella et Chopin, 1989a et modifié selon la procédure de Holo et Nes, 1989.

TABLEAU I : LISTE DES SOUCHES ET DES PLASMIDES

Souches ou plasmide	Marqueurs génétiques ou description	Origines ou référence
	SOUCHES BACTERIENNES	
L. lactis :		
IL1403	Dépourvu de plasmide, R^- M^-, 2 prophages bI285 et bI286	Chopin et al, 1984
MG1363	Dépourvu de plasmide	Gasson, M.J. 1983
B. subtilis :		
SB202	trpC2, tyrA1, aroB2, hisH2, thyA	Laboratoire INRA
E. coli :		
DH5	F^-endA1 recA1 hsdR17 (r_k^- m_k^+) supE44 thil $^-$ gyrA96 relA1	Hanahan, D. 1985

TABLEAU I : SUITE

	PLASMIDES	
pBluescript	Ap^r M13-ori pBR322-ori	Stratagene
pGK12	Em^r Cm^r	Kok et al, 1984
pVE6004	frgt de 445bp de pBluescript et Frgt de 3340 bp ClaI-HpaII de pVE6002 Em^r	Présente invention
pVE6006	frgt de 445bp de pBluescript inséré dans le site ClaI de pVE6002 Em^r Cm^r	Fig. 4
pVE6007	délétion ScaI de 1175bp de pVE6006 Cm^r	Présente invention
pVE6043	frgt SstI-ThaI (ori +) de pGK12 frgt ThaI-SstI (ORF A) de pVE6002 Em^r Cm^r	"
pVE6044	frgt SstI-ThaI (ori +) de pVE6002 frgt ThaI-SstI (ORF A) de pGK12 Em^r Cm^r	Fig. 2

2131984

Mutagénèse des plasmides.

La mutagénèse par hydroxylamine a été effectuée sur l'ADN du plasmide pGK12 dans les conditions décrites par Thomas, 1987. Après 110 et 120 minutes de traitement à 70° C, l'hydroxylamine est éliminé par précipitation du DNA à l'isopropanol.

Séquençage du DNA.

Pour le séquençage du DNA, on a cloné le fragment ThaI (756pb)-RsaI (1620 pb) de pVE6002, dans le plasmide pBluescript. On génère une série de clones se recouvrant, par utilisation d'exonucléase III et de nucléase de haricots mung (Stratagène). Le fragment ThaI (756pb)-NdeI (1140pb) de la préparation du plasmide pGK12 utilisé pour la mutagénèse est également séquencé par la même procédure.

On réalise le séquençage du DNA par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy sur des ADN doubles brins avec le Kit de séquençage Taq Dye Primer Cycle (Applied Biosystem) en utilisant un appareil PCR Perkin Elmer. Les réactions de séquençage sont initiées avec des oligonucléotides fluorescents (Applied Biosystem) et sont analysées sur un séquenceur automatique (séquenceur 370 A DNA, Applied Biosystem). Les séquences obtenues ont été déterminées sur les deux brins.

RESULTATS

Isolement du mutant.

Le plasmide utilisé dans ces expériences, pGK12, est un dérivé de pWV01 contenant deux marqueurs de résistance aux antibiotiques (KoK et al, 1984). 10 µg d'ADN plasmidique sont mutagénisés in vitro par de l'hydroxylamine et introduits par électroporation dans la souche de lactococcus IL1403, après élimination de l'agent mutagène. L'efficacité de la mutagénèse est évaluée par la diminution de viabilité du plasmide et par l'apparition de mutants sensibles à l'érythromycine ou au chloramphénicol.

Après 110 à 120 minutes de traitement, la viabilité du plasmide chute à moins de 0,1 % et environ 10 % des transformants contiennent des plasmides sensibles à l'un des antibiotiques. Ces conditions de mutagénèse sont choisies pour rechercher des plasmides thermosensibles, identifiés par réplique des transformants obtenus à 28° C sur un milieu contenant de l'érythromycine incubés à 37,5° C. Deux candidats thermosensibles, dénommés pVE6001 et pVE6002, sont obtenus par criblage d'environ 5000 clones. Leurs nombres de copies plasmidiques sont comparés, et la perte à 37,5° C est déterminée.

Caractérisation du mutant : pVE6001 est un mutant non Ts.

Le plasmide pVE6001 est plus instable que pGK12 à 28° C, et cette déficience devient plus prononcée à 37,5° C. Cependant, 7 % des bactéries contiennent encore le plasmide après 8 heures de croissance non sélective à 37,5° C, ce qui suggère qu'une réplication a lieu dans les conditions restrictives (figure 1A, gauche).

Par rapport à pGK12, le nombre de copies de pVE6001 apparaît diminué à 28° C et 37,5° C, avec ou sans sélection (figure 1A), ce qui pourrait expliquer sa stabilité inférieure. Il est possible que la perte du plasmide à des températures élevées, soit due à des changements physiologiques chez l'hôte à des températures supérieures, et non à la thermosensibilité du plasmide.

Caractérisation du mutant : pVE6002 est un mutant thermosensible au dessus de 35° C.

Les mesures de la stabilité du plasmide pendant la croissance sans antibiotique, révèlent que pVE6002 est aussi stable que pGK12 à 28° C, mais est perdu de façon drastique à 37,5° C (figure 1B). La perte rapide de pVE6002 à 37,5° C suggère que la réplication est bloquée immédiatement après le changement de température. Après 8 heures de croissance, il ne reste qu'environ 0,1 % de cellules résistantes à l'érythromycine. Les

2131984

nombres de copies de pGK12 et de pVE6002 sont similaires à 28° C, avec et sans sélection ; cependant, après 5 heures à 37,5° C, pVE6002 est indétectable alors que le nombre de copies de pGK12 est à peu près le même (figure 1B). On peut conclure de ces expériences que la mutation sur pVE6002 constitue réellement une déficience thermosensible de réplication.

La température minimum permettant la perte de pVE6002 a été déterminée. La souche IL1403 contenant pVE6002 a été testée pour la perte plasmidique pendant 8 heures de croissance non sélective à 28° C, 30° C. 33° C, 35° C et 37,5° C (tableau 2).

TABLEAU 2 : Pourcentage de cellules Em^r dans la population

Temps (Heures)	Température de croissance				
	28° C	30° C	33° C	35° C	37,5° C
0	100	100	100	100	100
2	100	100	99	97	98
4	100	100	48	47	38
6	100	100	9	3	4
8	100	99	5	1	1

Une culture d'une nuit en M17 avec Em, de IL1403 portant pVE6002 est diluée dans du milieu sélectif neuf et mise à pousser 3 heures à 28° C. La culture est alors diluée 10.000 fois dans un milieu non-sélectif et incubée à différentes températures. A des intervalles de temps variés, des échantillons sont prélevés et placés sur M17 à 28° C. Pour chaque point de température et de temps, la perte du plasmide est évaluée en repiquant une centaine de colonies sur des boîtes de milieu sélectif (Em) à 28° C.

On a trouvé que la perte plasmidique est équivalente à 37,5° C et 35° C. Une perte partielle du plasmide est déjà observée à 33° C, alors que le plasmide était stable à 28° C et 30° C. Ainsi, les cellules contenant pVE6002 peuvent perdre ce plasmide par élévation de la température à 35° C ou plus.

On a aussi introduit pVE6002 dans une autre souche de Lactococcus, MG1363 (Gasson, 1983), qui est distincte de IL1403 par comparaison des profils d'électrophorèse en champ pulsé. L'analyse des séquences indique que MG1363 est probablement une souche L. lactis subsp. cremoris (Godon et al, 1992). pVE6002 montre la même thermosensibilité dans cet environnement, démontrant que le phénotype du mutant plasmidique n'est pas lié à la souche.

Large spécificité d'hôte et phénotype Ts de pVE6002.

Un plasmide Ts peut être un véhicule de clonage utile dans d'autres organismes. Ainsi le comportement thermosensible de pVE6002 a été examiné chez B. subtilis et E. coli. Ces souches ont été choisies comme représentatives du large spectre d'hôte du réplicon original pWV01. L'ADN plasmidique a été introduit dans les deux espèces par transformation et sélection à 28° C. Etant donné que B. subtilis et E. coli ont des températures de croissance maximales supérieures à celles de L. lactis subsp., la réplication de pVE6002 a été testée à 28° C, 37° C et 42° C. Les résultats montrent que pVE6002 est thermosensible chez les deux hôtes. Il est probable que pVE6002 conserve ses propriétés de thermosensibilité chez le large spectre d'hôtes chez lequel il peut être établi.

Cartographie de la mutation Ts.

La séquence d'ADN de pWV01 montre la présence d'une origine-plus et de quatre ORF. Leenhouts déduit de sa similarité avec des ADN plasmidiques mieux caractérisés, que l'ORF A code pour la protéine de réplication (RepA) responsable de la coupure d'un brin d'ADN à

2131984

l'origine-plus. Des homologies supplémentaires suggèrent que l'ORF C pourrait réguler l'expression de RepA. Des fonctions n'ont pas encore été clairement attribuées à ORF B et ORF D, bien que l'on sache que cette dernière n'est pas nécessaire à la réplication.

Afin de localiser la mutation qui confère la thermosensibilité à pVE6002, on a construit des plasmides hybrides associant des parties du réplicon thermosensible et des parties non mutées. pVE6043 est constitué d'un fragment de pGK12 contenant l'origine-plus, ORF B et ORF C, et d'un fragment pVE6002 (Ts) contenant l'ORF A (RepA) dépourvu de son promoteur, l'ORF D et les marqueurs de résistance à Em et Cm (on utilise les sites de restriction SacI et ThaI, figure 2). Cet hybride est perdu à 37,5° C, au même taux que pVE6002, alors que l'hybride réciproque (pVE6044) est maintenu avec la même stabilité que pGK12 (figure 2). Ainsi, la mutation conférant la thermosensibilité à pVE6002 se trouve dans le fragment d'ADN codant pour RepA, ORF D et les marqueurs aux antibiotiques. Etant donné que l'ORF D n'est pas indispensable et que les marqueurs aux antibiotiques ne sont pas candidats, on peut conclure que la fonction thermosensible est la protéine RepA.

Données de séquençage.

Afin de localiser la mutation Ts, on a séquencé le fragment de 864 pb codant pour la protéine RepA de pVE6002. On a identifié quatre mutations, aux positions 972, 977, 980 et 987 (figure 3). On a confirmé que la région correspondante du plasmide parental pGK12 qui a été utilisé pour la mutagénèse est identique à la séquence publiée pour pWV01 (Leenhouts et al, 1991). Les quatre mutations sont des transitions de G à A, correspondant à l'effet mutagène connu de l'hydroxylamine. Chaque changement de base a pour résultat une altération d'un acide aminé (figure 3) dont l'une, Val en Ile est conservative. La contribution d'une ou plusieurs de ces altérations peut être impliquée dans le phénotype Ts.

Dérivés du plasmide Ts.

Dans un but de clonage, des dérivés du plasmide Ts initial pVE6002 ont été développés (figure 4). Ces dérivés sont modifiés pour contenir soit les deux résistances aux antibiotiques (Em et Cm) soit seulement l'une (Em ou Cm) et tous ont une séquence multisite dérivée du plasmide pBluescript* SK+.

Excision du réplicon

Des évènements de double échange réciproque ont pu être obtenus à partir d'un plasmide dérivé de pVE6002 portant une région d'homologie avec le chromosome bactérien interrompue par un gène de résistance à un antibiotique (Ab^r) comme illustré sur la figure 7a. Après introduction du plasmide dans la bactérie à 28° C, une première étape consiste à sélectionner les intégrants dans le chromosome par culture à 37° C sur milieu contenant l'antibiotique. La région d'homologie est dupliquée à la suite de l'intégration (Figure 7a). Lors d'une seconde étape, on obtient l'excision du réplicon par incubation à 28° C pour permettre à la réplication plasmidique de reprendre et stimuler un second évènement de recombinaison. Les évènements d'excision sont sélectionnés par culture à 37° C ; le gène chromosomique est inactivé par le gène Ab^r.

Exemple 2 : Intégration du plasmide thermosensible dans le chromosome de L. lactis

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés au tableau 3. Les souches d'Escherichia coli sont cultivées dans du bouillon LB. L. lactis est cultivé et étalé sur un bouillon $M17^-$glucose ou sur un milieu minimum quand il est testé pour le phénotype ilv. L'Erythromycine (Em) est ajouté à une concentration de 5 microgrammes/ml pour L. lactis subsp. lactis et 150 microgrammes/ml pour E. coli, la tétracycline est utilisée à une concentration de 12,5 microgrammes/ml pour

* Marque de commerce

L. lactis. L'électroporation de L. lactis subsp. lactis (Appl. Env. Microbiol. 55, 3119-3123, 1989) donne entre 10^5 et 10^6 transformants par microgramme d'ADN plasmidique pour IL1403 et environ 10^2 transformants par microgramme d'ADN plasmidique avec NCDO2118, la souche ilv^+ utilisée pour les expériences de remplacement du gène. E. coli est transformée par la méthode décrite par Hanahan (1985, DNA cloning: A practical approach Vol 1: 109-135, IRL Press Ed Glover).

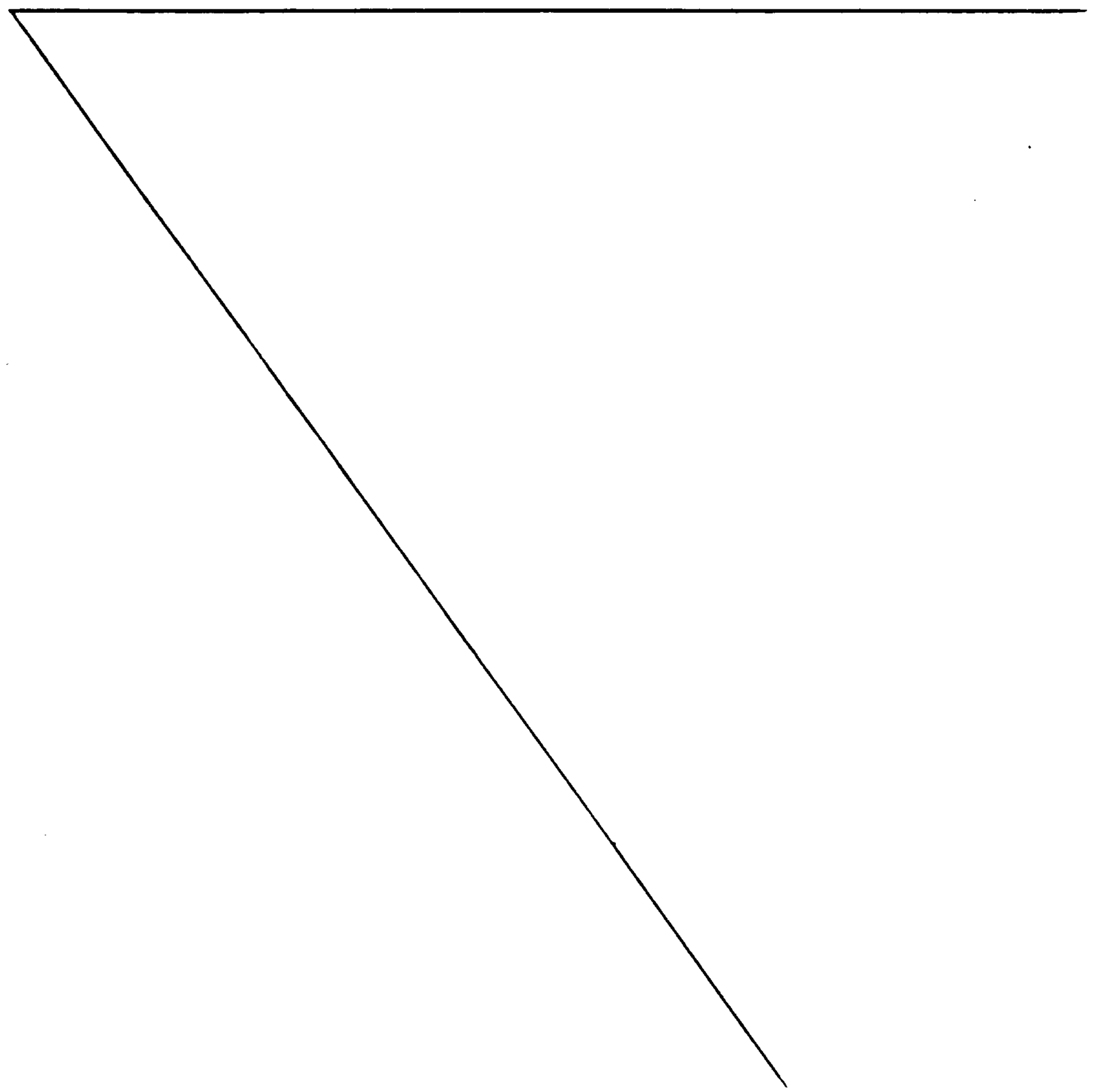


Tableau 3

SOUCHE	MARQUEURS GÉNÉTIQUES OU DESCRIPTION	SOURCE
L. lactis :		
NCD02118	isolat naturel	*
E. coli :		
TG1	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F [traD36proAB+ lacIq lacZΔM15]	Sambrook et.al
PLASMIDES		
pG+host4 ou pV6004	dérivé thermosensible de pGK12, Em^r	* *
pG+host5	frag. NsiI de pG+host4 lié au fragment 1,46 Kb AvaI-AlwNI de pBR322 Em^r	* *
pVE7021 à pVE7034	produit de restriction SmaI-HindIII de pG+host5 lié à un fragment EcoRV-HindIII aléatoire du chromosome de IL1403	* *
pIL515	frag. EcoRI, ilv de 3,9 Kbde IL1403 dans pBluescript, Amp^r	**
pVE7009	frag. EcoRI de de 3,9 Kb de pIL515 lié à pG+host5 coupé par EcoRI	* *

2131984

Tableau 3 (suite)

	pVE7009R	même construction que pVE7009, inséré dans l'orientation opposée	* *
	pVE7015	délétion SphI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 3362 pb	* *
	pVE7014	délétion StyI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 2904 pb	* *
	pVE7010	délétion ClaI de pVE7009R laissant un frag. ilv de 2552 bp	* *
	pVE7016	délétion XcmI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 1912 bp	* *
	pVE7013	délétion AatII-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 1206 bp	* *
	pVE7011	délétion HindIII de pVE7009R laissant un frag. ilv de 497 bp	* *
	pVE7012	délétion PstI de pVE7009R laissant un frag. ilv de 356 bp	* *
	pVE7017	délétion PflMI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 330 bp	* *
	pIL500	frag. 18,5 Kb XbaI ilv de NDCO2118 chromosome dans pIL253	Godon et al

Tableau 3 (suite)

pIL1202	frag. XbaI de pG+host4 contenant les extrémités XbaI-BglII de 1,1 Kb et EcoRI-XbaI de 2,5 Kb du frag. de 18,5 Kb de pIL500 lié au frag. BamHI de 4 Kb du gène Tet M
pIL1261	frag. 2,3 Kb XbaI-EcoRI de pIL500 interrompu par un gène Tet M, BamHI de 4 Kb inséré au site BglII et lié à XbaI-EcoRI pBluescript
pIL1263	XbaI-EcoRI pG+host4 lié au frag. XbaI-EcoRI de pIL1261 de 6,3 Kb

* : National Collection of Dairy Organisms

** : Présente invention

Construction des plasmides pour l'intégration

a) construction du vecteur

Le plasmide pG$^+$host4 (ou pVE6004) est un dérivé Ts de pWVO1 préparé selon l'exemple 1. Pour faciliter le clonage chez E. coli, le fragment de 1,4 Kb contenant l'origine de pBR322 est inséré dans pG$^+$host4. Le plasmide pG$^+$host5 est construit par insertion du fragment Ava I - Alw N I de pBR 322 (qui contient l'origine de réplication de pBR 322) dans le pG$^+$host4 linéarisé coupé parNsi I. Sa structure est représentée sur la figure 8. Le plasmide obtenu, appelé pG$^+$host5 (Appligène, Illkirch, France) est utilisé pour tous les clonages. L'activité de l'origine de pBR322 permet son maintien à 37° C chez E. coli et l'origine Ts maintient pG$^-$host5 à 28° C dans les bactéries gram positif.

b) clonage de fragments chromosomiques aléatoires dans pG$^+$host 5.

L'ADN chromosomique de la souche IL1403 est digéré par EcoRV et HindIII. Des fragments chromosomiques d'une taille comprise entre 0,9 Kb et 1,4 Kb, sont purifiés à partir de gels d'agarose et liés avec pG$^-$host5 traité par SmaI-HindIII. Les plasmides recombinants sont établis chez E. coli puis on les fait pénétrer par électroporation dans L. lactis. Cette dernière est utilisée pour vérifier les structures des plasmides et les tailles des inserts. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 suivant. On utilise les enzymes de restriction HpaI (site unique dans la partie du vecteur) et HindIII (site unique entre l'insert et le vecteur) pour analyser les intégrants.

Tableau 4 : Ipc à différentes localisations sur le chromosome de L. lactis

	Taille de l'insert plasmidique (Kb)	IPC moyenne ± SD
Groupe I :		
pVE7025	1,29	$3,0 \pm 0,3 \times 10^{-2}$
pVE7034	1,05	$3,8 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
pVE7021	1,29	$3,4 \pm 2,6 \times 10^{-3}$
pVE7024	0,96	$2,5 \pm 1,3 \times 10^{-3}$
pVE7030	1,42	$2,3 \pm 0,8 \times 10^{-3}$
pVE7028	1,46	$7,2 \pm 0,7 \times 10^{-4}$
pVE7023	1,29	$6,6 \pm 3,9 \times 10^{-4}$
pVE7022	1,08	$5,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$
pVE7027	1,05	$5,2 \pm 1,3 \times 10^{-4}$
pVE7026	0,96	$4,0 \pm 0,5 \times 10^{-4}$
Groupe II :		
pVE7029	1,02	$1,1 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
pVE7031	0,96	$9,9 \pm 3,9 \times 10^{-6}$
pVE7032	1,37	$8,6 \pm 5,0 \times 10^{-7}$
PVE7033	1,25	$3,9 \pm 0,9 \times 10^{-7}$

ipc : fréquence d'intégrations par cellule

2131984

c) clonage et délétion d'un fragment d'opéron ilv

Un fragment EcoR1 de 3949 bp de l'opéron ilv de IL1403 (J. Bacteriol **174**, 6580-6589 (1992) est cloné dans l'une ou l'autre orientation au site EcoR1 de pG$^+$host5 (pour donner pVE7009 et pVE7009R).

Intégration par simple crossing-over (sco) dans le chromosome de L. lactis

Des souches de Lactococcus contenant les plasmides testés sont cultivées une nuit à 28° C en présence d'érythromycine, puis diluées 100 fois dans le même milieu et cultivées à 28° C pendant 2 heures à 2 heures 1/2 (phase exponentielle). Les cultures sont placées à 37,5° C pendant 3 heures afin de diminuer le nombre de copies de plasmides par cellule. Les échantillons sont ensuite dilués et étalés à 37° C sur milieu M17 Em afin de détecter les évènement d'intégration, et à 28° C sur milieu non sélectif pour déterminer le nombre de cellules viables. La fréquence d'intégration par cellule (ipc) est estimée comme étant le rapport des cellules Em^r à 37° C, sur le nombre de cellules viables à 28° C. Les intégrants isolés à 37° C sont maintenus dans un milieu M17 contenant Em, à 37,5° C pour un usage ultérieur.

Intégration par double crossing-over (dco) dans le chromosome de L. lactis

Les plasmides pIL1263 et pIL1202, sont composés du vecteur Ts (pG$^+$host4, Em^r) et respectivement des régions chromosomiques de 2,3 Kb ou 3,6 Kb, interrompues par le gène Tet de Tn1545 (Nucl. Acids Res., 14, 7047-7058, 1986). Une souche portant pIL1202 ou pIL1263 est cultivée une nuit à 37,5° C dans M17 avec Tet ou Em pour obtenir une population d'intégrants. La culture est ensuite diluée à $1/10^5$ dans du milieu M17 sans antibiotique et portée à 28° C pour stimuler la recombinaison par réplication plasmidique. Une culture de 12 heures ou plus à 28° C donne des fréquences maximales de remplacement du gène. Une culture d'une nuit à 28° C est étalée à différentes concentrations cellulaires à 37° C avec ou sans sélection par Tet. Les colonies dans lesquelles le remplacement du gène s'est produit ont un phénotype Tet^r et Em sensible (Em^S).

L'ADN chromosomique est préparé selon des méthodes connues (Grüss et al, 1988)

L'ADN purifié est traité par des enzymes de restriction, séparé par électrophorèse en gel d'agarose et analysé par hybridation de Southern avec des sondes d'ADN pour détecter les recombinaisons homologues (Sambrook et al, 1989).

Résultats

1) Intégration par simple crossing-over

Le clonage des fragments chromosomiques de L. lactis dans pG$^+$host5 chez E. coli permet d'isoler 14 plasmides différents contenant chacun une insertion chromosomique distincte, de 0,9 Kb à 1,4 Kb. Ces plasmides établis dans IL1403 à 28° C, servent à mesurer les fréquences d'intégration dans le chromosome de L. lactis. La fréquence d'intégration par cellule est comprise entre 10^{-2} et 10^{-7}. L'ipc d'un vecteur pG$^+$host5 sans insert chromosomique est compris entre 10^{-6} et 10^{-7}. Les plasmides portant les inserts chromosomiques peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur fréquence d'intégration. Dans le groupe I, l'ipc varie entre 3.10^{-2} et 4.10^{-4}. Ces variations doivent être dues à la localisation ou à la nature de l'insert plutôt qu'à sa taille. Dans le groupe II, l'ipc du plasmide est comprise entre 10^{-5} et 3.10^{-7}. Ceci est probablement dû à l'interruption d'un gène chromosomique essentiel, qui ne permet d'observer que les intégrations non homologues. Seuls deux de ces plasmides (pVE7028 et pVE7034) produisent des molécules de hauts poids moléculaires (HMW). L'analyse de l'ADN chromosomique obtenu à partir des souches intégrantes maintenues à 37° C, par restriction enzymatique et hybridation de Southern en utilisant le plasmide pG$^+$host5 comme sonde, indique une intégration simple et multi-tandems dans le cas de huit plasmides et une intégration par copies multiples dans le cas de deux plasmides. La digestion par HindIII de l'ADN des intégrants confirme que l'intégration se produit par simple crossing-over. Chaque plasmide contient un seul site HindIII à la jonction vecteur-insert, et la digestion doit libérer une bande unique d'ADN de taille plasmidique.

2131984

L'hybridation de Southern de l'ADN total non digéré ne révèle pas de plasmide libre dans aucun des plasmides du groupe I, ce qui indique que la copie du plasmide est intégrée. Une analyse similaire des plasmides pVE7028 et pVE7034 confirme que ces plasmides sont également intégrés par simple crossing-over. L'utilisation d'HpaI, qui reconnaît un site unique à l'intérieur du vecteur, permet de déterminer que chaque plasmide est intégré à une position distincte.

Les quatre plasmides du groupe II (faible fréquence d'intégration) , paraissent être intégrés au hasard, car la digestion par HindIII ne libère pas une bande monomérique de plasmide, et la digestion par HpaI de trois intégrants du même plasmide ne donne pas le même profil sur le gel. La carte de restriction du chromosome de L. lactis développé pour SmaI et ApaI permet de localiser les sites d'intégration des plasmides par simple crossing-over sur la carte chromosomique. Chaque intégrant est présent sur un segment différent. L'ensemble de ces résultats indique que les insertions chromosomiques sont positionnées de façon aléatoire sur le chromosome, excluant ainsi tout biais dans la procédure.

La fréquence d'intégration dépend de la longueur de l'homologie.

Un segment de 3,9 Kb de l'opéron ilv de IL1493 séquencé, est cloné dans pG$^+$host5, et un ensemble de délétions du fragment est généré sur le même vecteur. Alors que des plasmides portant l'insert total de 3,9 Kb dans l'une des deux orientations (pVE7009 et pVE7009R) présentent une certaine instabilité structurelle dans L. lactis, les huit dérivés par délétion de pVE7009R sont stables. Ces clones sont utilisés pour étudier la relation entre la longueur de l'homologie et la fréquence d'intégration. Il existe une relation logarithmique entre la fréquence d'intégration et la longueur d'homologie pour des longueurs comprises entre 0,35 et 2,5 Kb. Pour des fragments de plus de 2,5 Kb, les fréquences de recombinaison paraissent atteindre un plateau, car les ipc des segments homologues de 2,5. 3.3 et 3.9 Kb ne sont pas significativement différents. Les facteurs autres que la longueur apparaissent aussi être importants. L'analyse par des enzymes de

rectriction qui reconnaissent un site unique soit dans le vecteur, soit dans l'insert, soit dans la jonction vecteur-insert, confirme que l'intégration se produit par recombinaison homologue par simple crossing-over. Pour chaque plasmide utilisé, des intégrations multicopies du plasmide se produisent. Ces résultats montrent que pG$^+$host fournit un moyen d'intégration efficace par simple crossing-over s' il porte des segments homologues aussi petits que 330 paires de bases.

2) intégration par double crossing-over

Dans le système par simple crossing-over (sco) décrit ci-dessus, le plasmide intégré est flanqué de séquences répétées. Aussi, quand les souches intégrantes, générées à 37° C, sont placées à 28° C, la réplication du plasmide stimule fortement un second évènement de recombinaison. Cet évènement à pour conséquence une haute fréquence d'exision du réplicon, conduisant soit à la structure parentale, soit à la structure chromosomique dco (double crossing-over).

Une souche faiblement transformable de L. lactis, NCDO2118, qui est prototrophe pour les aminos acides ramifiés (Ilv, Leu, Val) et dans laquelle aucune modification génétique n'était réalisable jusqu'à présent, est utilisée. Deux dérivés de pG$^+$host4 qui portent un segment chromosomique soit contigü, soit non contigü sont utilisés. pIL1263 contient un fragment chromosomique de 2,3 Kb, en amont de l'opéron ilv, interrompu par un segment d'ADN de 4 Kb contenant un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^r). La susbtitution du gène doit conduire à l'insertion du marqueur Tet^r dans le chromosome et laisser l'opéron ilv$^+$ intact. Le plasmide pIL1202 contient des segments non contigüs de 1,1 Kb et 2,5 Kb, correspondant aux extrémités d'une région de 18,5 Kb, incluant l'opéron ilv, relié par le marqueur Tet^r de 4 Kb. Le remplacement du gène doit conduire à une délétion du chromosome de 14,9 Kb incluant l'opéron ilv et donnant un phénotype ilv$^-$.

Sélection du gène de remplacement : une souche contenant soit pIL1202 soit pIL1263 est cultivée dans des conditions indiquées ci-dessus, en utilisant Tet comme marqueur de sélection. Dans des expériences indépendantes avec pIL1263, 69% et 98% des colonies Tet^r étaient Em^s ; avec pIL1202 50% et 91% des colonies Tet^r sont Em^s. Dans les cultures de contrôle maintenues à 37° C pendant la même période, toutes les colonies Tet^r sont également Em^r. Ce résultat indique que la réplication dans les plasmides rc (à réplication circulaire) stimule l'excision à partir du chromosome. Cinq colonies Em^s obtenues par intégration de pIL1202 sont cultivées sur milieu minimum dépourvu d'aminos acides ramifiés et sont ilv^-, ce qui confirme que la recombinaison a eu lieu. La structure de la région chromosomique correspondante des cinq isolats Tet^r Em^s est étudiée par hybridation de Southern, qui confirme le remplacement du gène dans tous les cas.

Pas de sélection : un protocole identique a été utilisé sans sélection par Tet, afin de se placer dans le cas où le fragment chromosomique porté par le plasmide n'a pas de marqueur de sélection. Dans trois expériences utilisant pIL1263 (insertion de gène), 10% à 40% des colonies obtenues à 37° C sans sélection sont Tet^r Em^s, ce qui indique qu'un évènement de remplacement du gène a eu lieu. Pour pIL1202 (délétion du chromosome) 1% à 7% des colonies sont Tet^r Em^s, ce qui indique un remplacement du gène ; parmi les quatre colonies Tet^r Em^s testées, toutes sont ilv^-. L'analyse de la structure chromosomique des quatre intégrants par dco de chaque type confirme que le remplacement se produit sans sélection d'un nouveau fragment inséré. Ces résultats démontrent la faisabilité du remplacement de gène sans laisser un marqueur antibiotique dans le chromosome. Ce protocole est donc adapté pour la modification chromosomique sans utilisation de marqueurs de sélection.

Utilisation du pG^+host dans d'autres bactéries gram positif

L'efficacité de recombinaison intermoléculaire dans douze localisations différentes du chromosome de B. subtilis a été déterminée en

transformant des cellules compétantes par un plasmide non réplicatif (J. Bacteriol. 174, 5593-5587, 1992). Dans ces expériences, le segment homologue est invariant (insertion d'un fragment de pBR322). Les efficacités varient d'environ trois fois en fonction de la position de l'intégration. En utilisant le système pG^+host sco plutôt que le vecteur non réplicatif, des expériences de recombinaison identique peuvent être effectuées sur les deux souches de B. subtilis avec les différences d'un ordre de trois dans les fréquences d'intégration. pG^+host5 portant le fragment de 1,4 Kb de pBR322 est introduit dans les souches de B. subtilis d'intérêt. En utilisant la procédure sco décrite ci-dessus, la fréquence d'intégration varie entre $1,8 \pm 0,6.10^{-3}$ et $6,1 \pm 0,9.10^{-4}$. Les mêmes variations de trois fois sont observées entre les deux différentes localisations que celles obtenues avec le système non réplicatif. Ce résultat démontre l'efficacité du système.

Exemple 3 : Modification génétique d'organismes non-transformables

Des organismes d'intérêt industriel tels que certains lactobacilles ne sont actuellement pas transformables, il est cependant possible d'y introduire des plasmides par conjugaison. Le locus de mobilisation oriT du plasmide pIP501 a été caractérisé. pIP501 est autotransférable dans certains de ces lactobacilles.

Ce fragment oriT a été cloné dans le plasmide Ts (plasmide Ts:oriT) ; sa capacité à être mobilisé en présence d'un plasmide "helper" (dérivé de pIP501) qui fournit les protéines de transfert en trans a été testée. Plusieurs croisements intra- ou inter-espèces ont été réalisés avec succès (Tableau 5) ; avec les exconjugants qui ne contiennent que le plasmide Ts:oriT, le procédé à venir d'intégration par recombinaison est applicable. On peut donc introduire des informations génétiques dans le chromosome de Lactobacillus bulgaricus espèce non-transformable de plus en plus utilisée par l'industrie laitière.

2131984

La finalité du procédé d'intégration par recombinaison est la modification des caractères génétiques de souches bactériennes, cela suppose que les propriétés à modififier soient caractérisés au niveau moléculaire. Le développement d'un système de transposition fonctionnel (combinaison du plasmide Ts d'un transposon) contituerait un apport appréciable en tant qu'outil génétique pour l'analyse de L. lactis.

Tabeau 5 : FREQUENCE DE CONJUGAISON AVEC LE PLASMIDE TS:oriT

Donneuse / Receveuse	L. lactis IL1403/pHelper/pTs:oriT
L. lactis IL1403 str^r	5.10^{-3} exc/don *
E. faecalis IL1885 str^r	10^{-5} exc/don
L. bulgaricus IL1687 str^r	3.10^{-5} exc/don
S. sanguis IL1474 str^r	3.10^{-7} exc/don

* exc/don : Nombre d'exconjugants contenant le Ts:oriT par cellule donneuse

2131984

Exemple 4 : utilisation d'un plasmide thermosensible comme vecteur d'un transposon

Une cassette de transposition Tn10 clonée dans un dérivé de pVE6004 est utilisée pour un test de transposition. Environ 1% des cellules sont Em^r à 37° C, ce qui indique que le transposon ou le plasmide est intégré dans le chromosome. L'intégration non spécifique du plasmide sans la cassette de transposition se produit à des fréquences inférieures à 10^{-7}. La transposition est estimée par analyse de l'ADN digéré par HindIII à partir de huit colonies. HindIII a deux sites de restriction dans le plasmide, mais aucun dans l'unité transposable. L'ADN chromosomique est extrait de huit clones thermorésistants Em^r et digéré avec HindIII ; l'ADN traité est ensuite séparé par électrophorèse en gel d'agarose et hybridé avec un fragment d'ADN contenant le transposon Em^r comme sonde. Dans ces conditions, l'intégration du vecteur entier (c'est-à-dire sans transposition) conduirait à une bande d'hybridation de 1,3 Kb, qui n'est pas observée ici. Chaque échantillon chromosomique donne un profil unique quand le fragment d'ADN contenant le transposon est utilisé comme sonde. Aucune des bandes hybridées n'a une taille de 1,3 Kb, qui serait attendue si le plasmide entier était intégré dans un site du vecteur. En outre, on n'observe pas d'hybridation quand le plasmide vecteur Ts est utilisé comme sonde. Ces résultats indiquent que la transposition a lieu à différents sites et que l'ADN plasmidique ne s'intègre pas dans le chromosome avec le transposon. Le plasmide thermosensible peut donc être utilisé comme vecteur de livraison.

LEGENDE DES FIGURES

FIGURE 4 :

Unique sites :

*Acc*I	*Kpn*I
*Bam*HI	*Not*I
*Bst*XI	*Pst*I
*Dra*III	*Sal*I
*Eag*I	*Sac*II
*Eco*RI	*Sma*I
*Eco*RV	*Spe*I
*Hind*III	*Xba*I

*Xho*I

FIGURE 6 :

symboles :

: gène chromosomique actif

: région d'homologie entre le plasmide et le chromosome

Ab^r : résistance à un antibiotique

: événement de recombinaison

FIGURE 7A :

symboles

: gène chromosomique actif

: régions d'homologie entre le plasmide et le chromosome

Tet^r : résistance à la tétracycline

Em^r : résistance à l'érythromycine

(d'autres marqueurs peuvent être utilisés)

: événement de recombinaison

2131984

LEGENDE DES FIGURES

FIGURE 7B :

symboles :

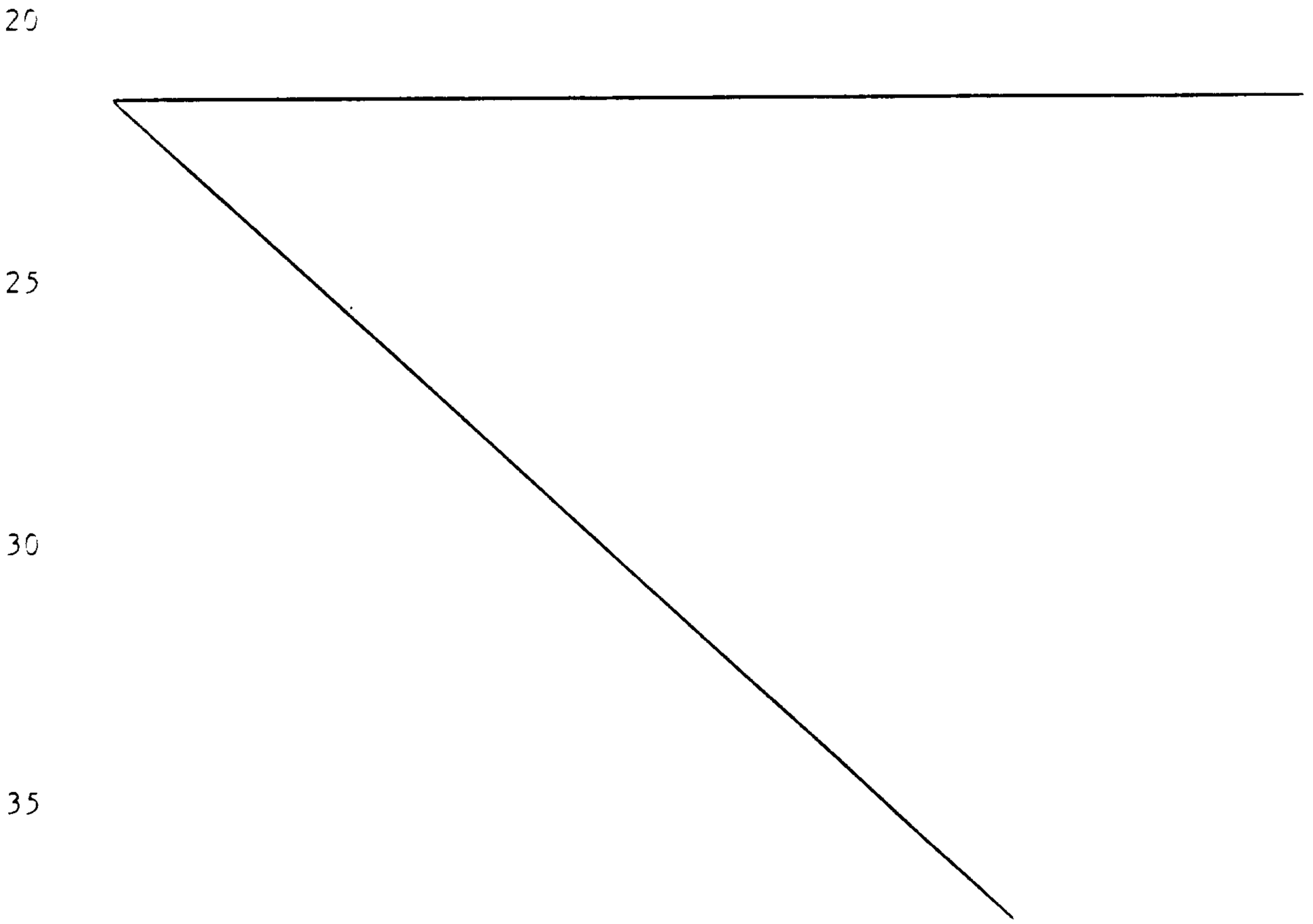
: gène chromosomique actif

: région d'homologie entre le plasmide et le chromosome

: duplication plasmidique

Ab^r : résistance à un antibiotique

: événement de recombinaison



REFERENCES

Chopin, A., MC. Chopin, A. Moillo-Batt, and P. Langella. 1984. Plasmid 11: 260-263.

Gasson, M.J. 1983. J. Bacteriol. 154: 1-9.

Godon, J-J., C., Delorme, P., Renault and S. D. Ehrlich. 1992. Appl. Env. Microbiol. submitted.

Godon, JJ., MC. Chopin and S.D. Ehrlich. 1992. J. Bacteriol. 174 : 6580-6589.

Grüss, A., and S.D. Ehrlich. 1988. J. Bacteriol, 170 : 1183-1190

Hanahan, D. 1985. In DNA cloning: A practical approach Vol 1: 109-135. IRL Press Ed Glover.

Holo, H, and Nes, I, F. 1989. Appl. Env. Microbiol. 55: 3119-3123.

Kok. J., J.M.B. van der Vossen and G. Venema. 1984. Appl. Env. Microbiol. 48: 726-731.

Langella, P., and Chopin, A. 1989. FEMS Microbiol. Lett. 89: 301-306.

Leenhouts, K., J., B., Tolner, S., Bron, J., Kok, G., Venema and J., F.M.L. Seegers. 1991. Plasmid. 26: 55-66.

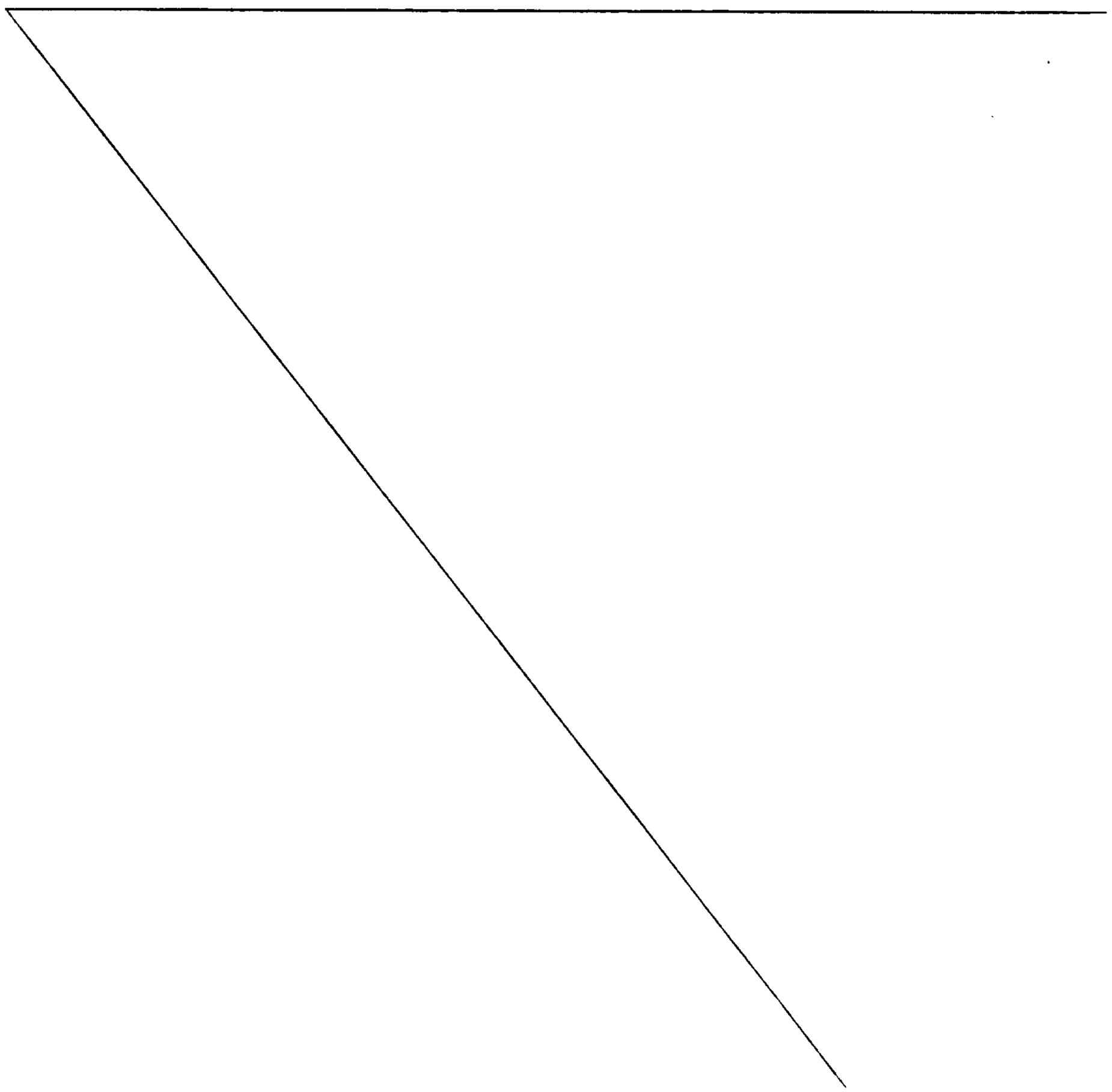
Niaudet, B; Ehrlich, S. D. 1979. Plasmid. 2: 48-58.

2131984

Petit, MA., Mesas, M., J., Noirot, P., and Ehrlich, S., D. 1992. Inducible Amplification in the Bacterial Chromosome. submitted.

Sambrook J., F Fritsh, and T., E. Maniatis.1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Thomas C.M. 1987. In Plasmids. A practical approach. IRL Press EDS Hardy.



1. Plasmide vecteur bactérien ayant une origine de réplication efficace dans E.coli et dans les bactéries gram positives choisies dans le groupe comprenant: Bacillus, Enteroccocus, Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Listeria, Pediococcus, Staphylococcus, Clostridia, Leuconostoc,
comportant au moins:

- un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne,
- un système de réplication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte,

dont la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37°C, et dont le système de réplication cercle roulant est celui porté par le plus grand fragment Cla1 du plasmide pWV01, présentant au moins une mutation dans la région Tha1-Rsa1.

2. Plasmide vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en outre au moins une séquence d'ADN homologue avec une séquence d'ADN chromosomique, afin de permettre une recombinaison.

3. Plasmide vecteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que le gène marqueur est situé de façon à être intégré dans le chromosome en cas de recombinaison.

4. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le gène marqueur assure une résistance à un composé chimique ou est un gène permettant la complémentation d'une auxotrophie.

5. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le système de réplication thermosensible est inhibé au-dessus de 35°C.

6. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le plasmide comporte un locus de mobilisation permettant la conjugaison.

7. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte deux séquences identiques répétées, encadrant une séquence du plasmide.

8. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il présente au moins une mutation dans la région correspondant à Rep A du plasmide pWV01.

9. Plasmide selon la revendication 8, caractérisé en ce que, par rapport à la séquence de pWV01, il présente au moins une mutation dans l'une des positions suivantes: 972, 977, 980, 987.

10. Plasmide selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que le fragment correspondant au système de réplication code pour une protéine présentant les mutations représentées sur la figure 3.

11. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comporte une des séquences représentées sur la figure 9, 10 ou 11, ou une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec ces séquences.

12. Plasmide selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il est réplicatif à 28°C, et non-réplicatif à une température supérieure à environ 35°C.

13. Plasmide selon l'une des revendications 6 à 12, caractérisé en ce que le locus de mobilisation est le locus ori T, extrait d'un plasmide de bactérie à gram positif.

14. Plasmide selon l'une des revendications 6 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un réplicon actif chez E.coli, qui en fait un plasmide navette gram-négatif, gram-positif.

15. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il porte un transposon.

16. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un gène codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

17. Bactérie caractérisée en ce qu'elle contient un plasmide selon l'une des revendications 1 à 16, sous forme libre ou intégré dans son chromosome.

18. Procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie, caractérisé en ce que:

a) on introduit dans la bactérie, par transformation, le plasmide selon l'une des revendications 1 à 5, 7 à 12, 14, 15 ou 16,

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

19. Procédé d'inactivation d'un gène dans une bactérie, caractérisé en ce que:

a) on introduit dans la bactérie, par conjugaison, un plasmide selon l'une des revendications 6 à 16,

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

20. Procédé d'introduction d'un gène hétérologue dans une bactérie, caractérisé en ce que:

a) on introduit dans la bactérie par transformation ou conjugaison un plasmide selon la revendication 16,

b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,

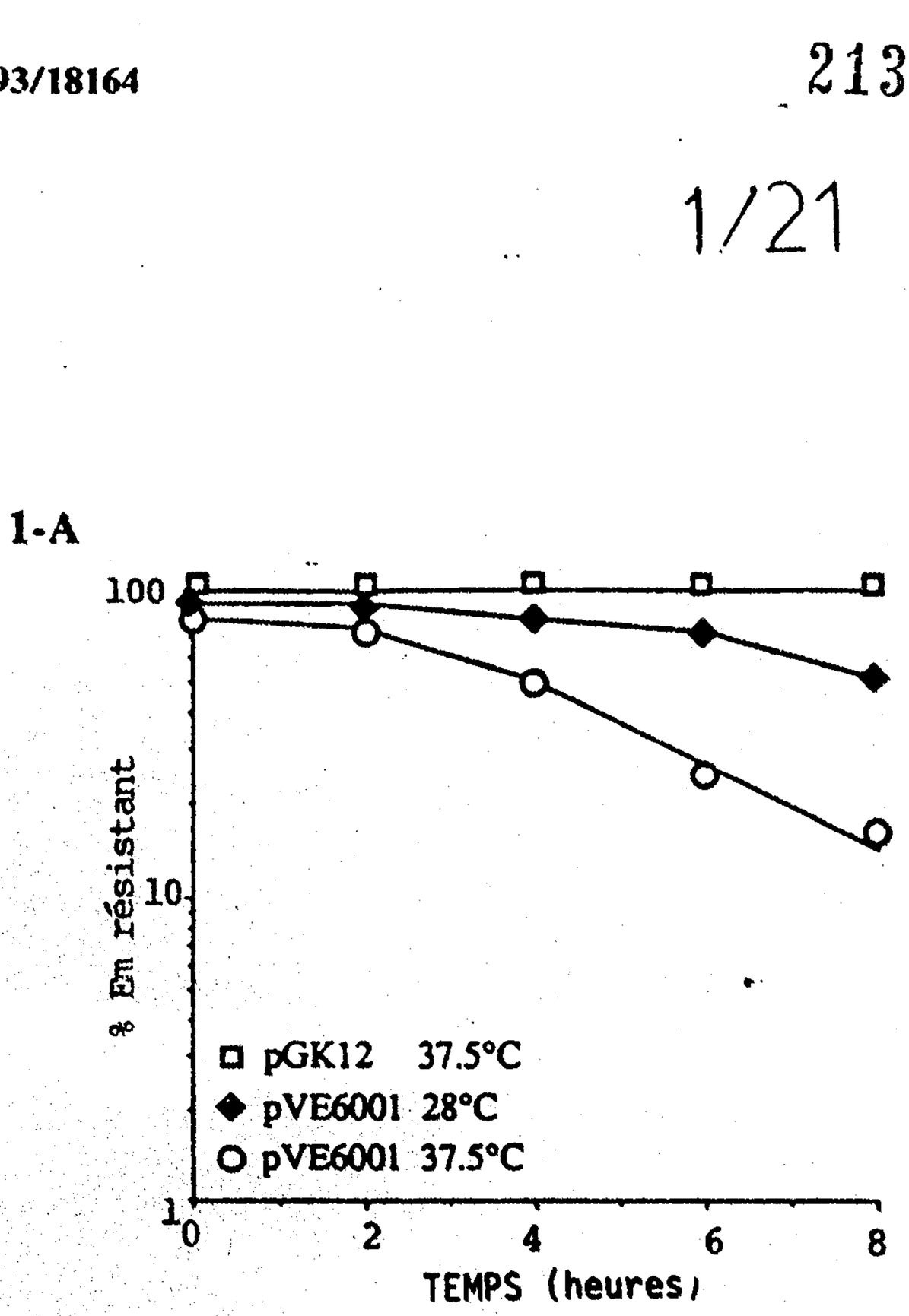
c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,

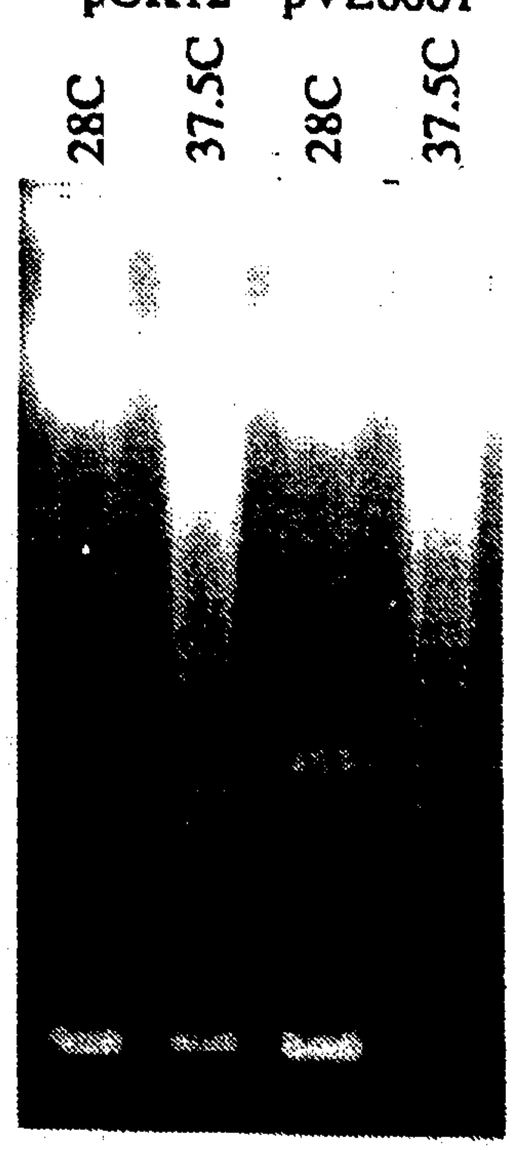
d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

21. Procédé selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce que les bactéries survivantes obtenues à l'issue de l'étape d), sont à nouveau mises en culture à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication, sur milieu non sélectif.

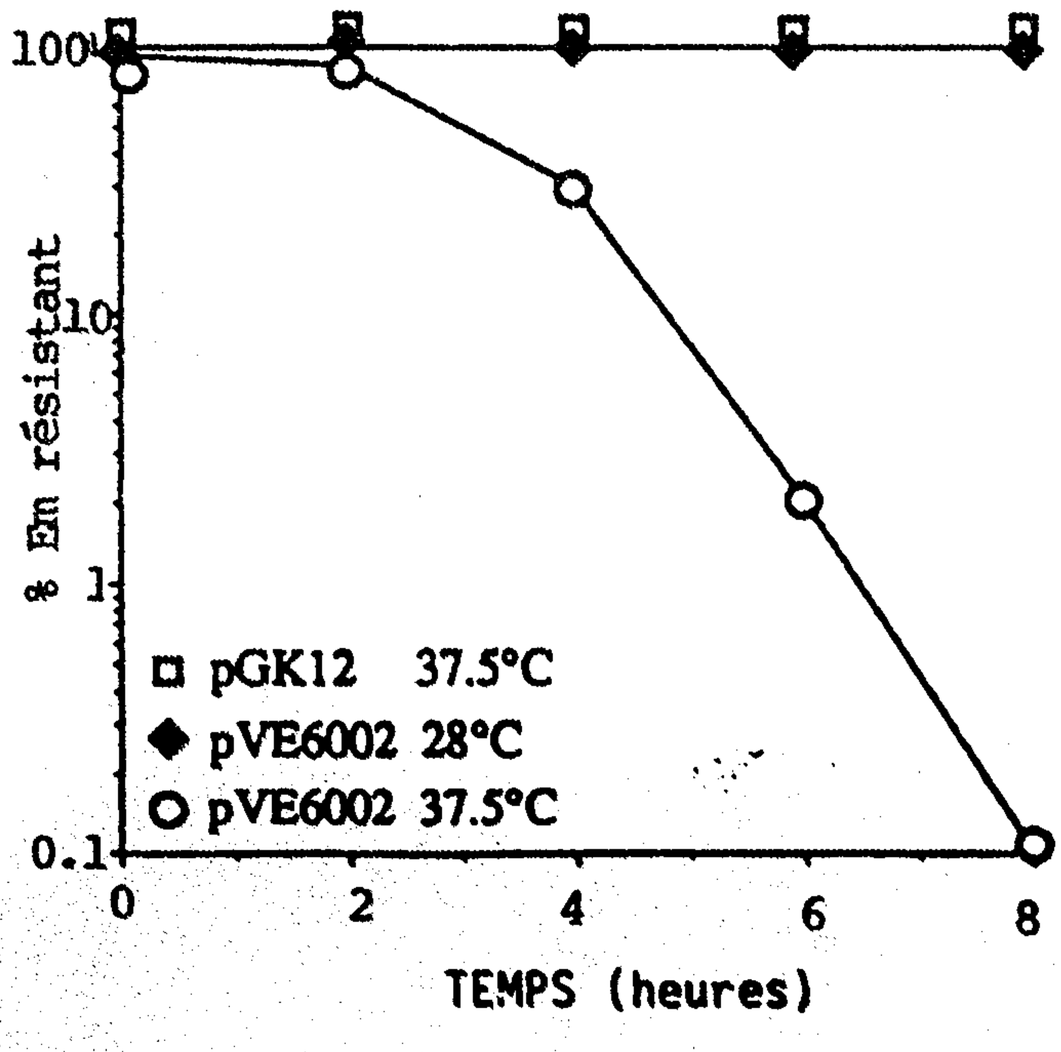
22. Procédé selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée à une température d'environ 28°C.

1-A





1-B



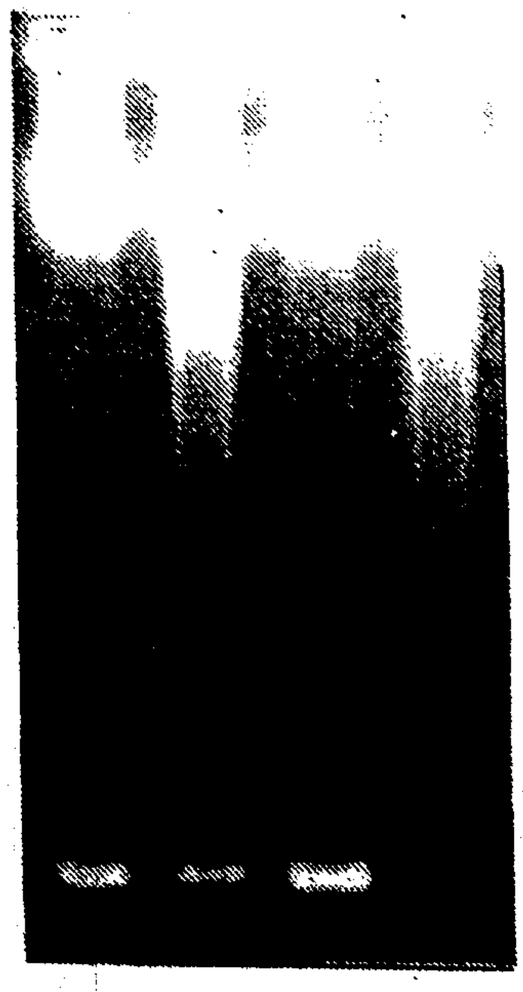


FIGURE 1

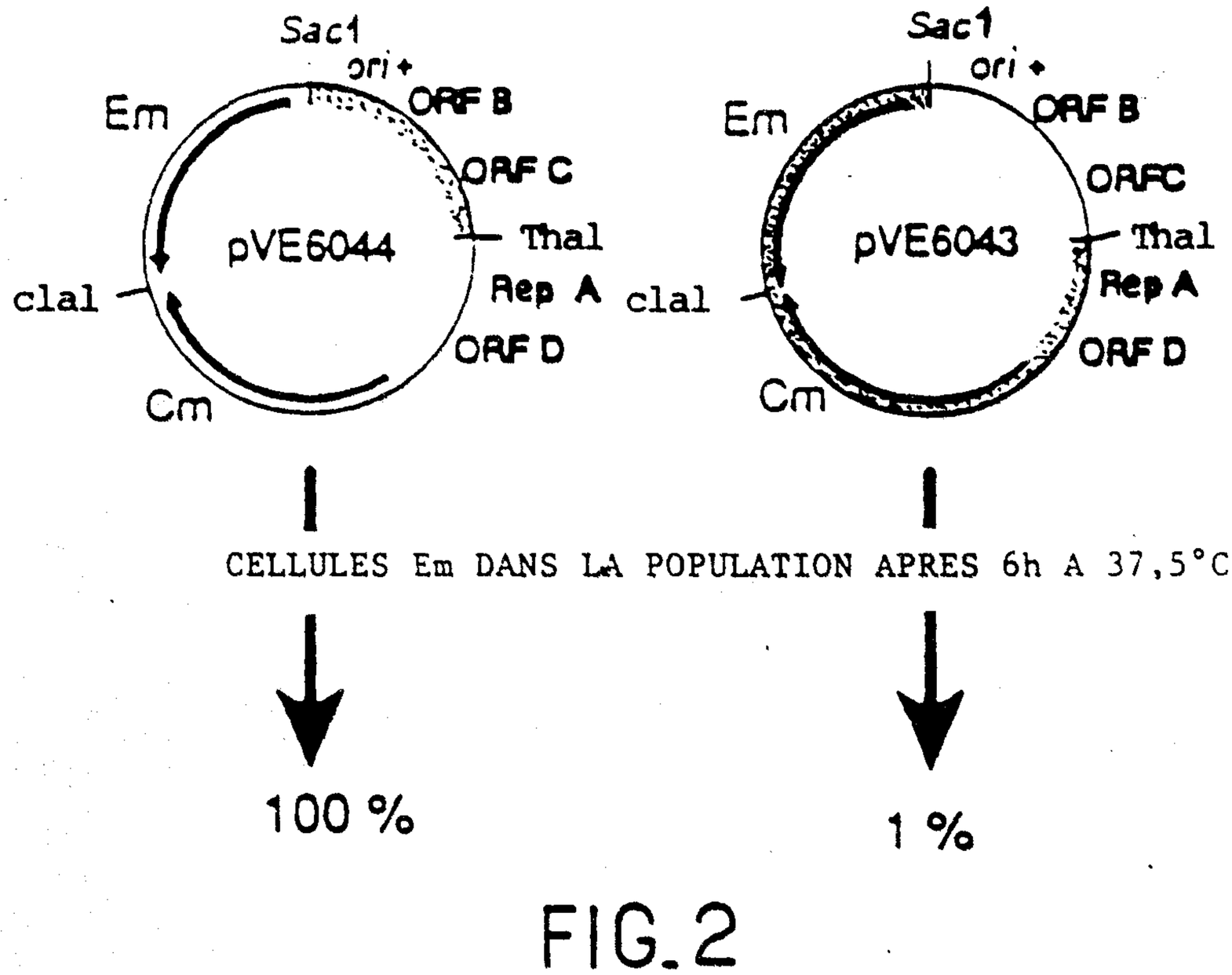
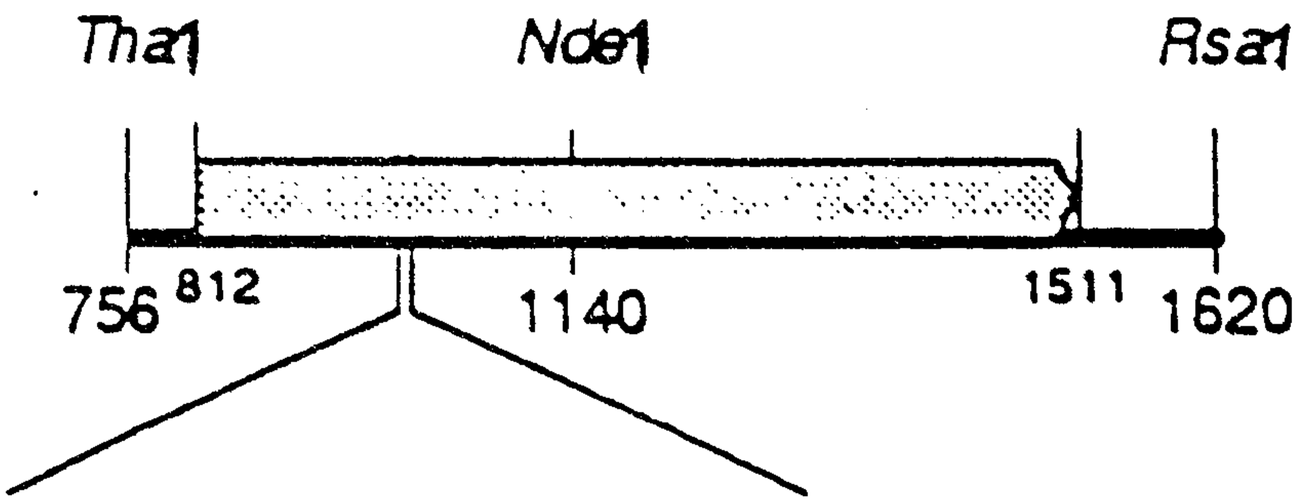


FIG.2



	Ser	Ser	Asp	Val	Ile	Arg
WT :	TAG	TAG	TGA	TGT	TAT	ACG
Ts :	TAA	TAG	TAA	TAT	TAT	ACA
	Asn	Ser	Asn	Ile	Ile	Gln

FIG.3

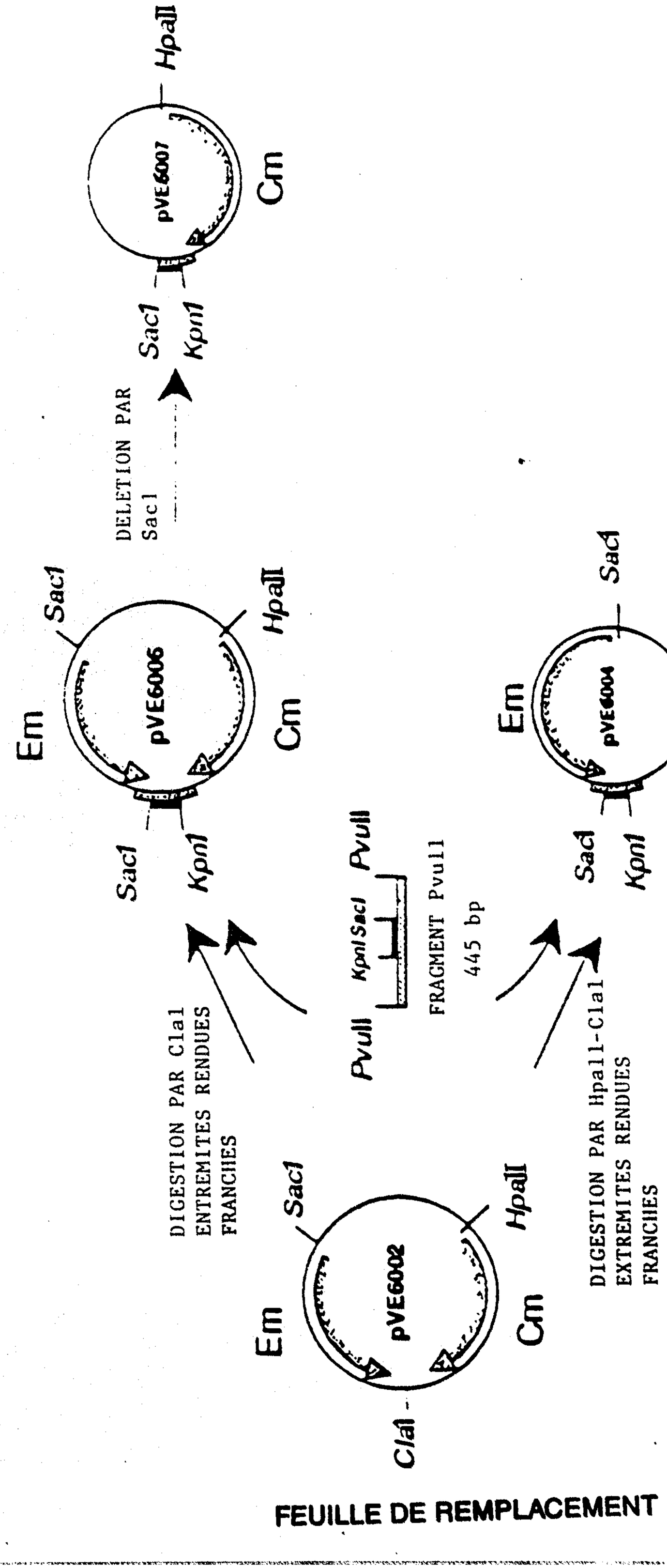

HpaII
pVE6007
Cm
DELETION PAR
Sac1
Sac1
Kpn1
Sac1
HpaII
Em
pVE6006
Cm
Sac1
Kpn1
PvuII
KpnISacI
PvuII
FRAGMENT PvuII
445 bp
Sac1
Em
pVE6004
Sac1
Kpn1
DIGESTION PAR ClaI
ENTREMITES RENDUES
FRANCHES
Sac1
HpaII
Em
pVE6002
Cm
ClaI
DIGESTION PAR HpaII-ClaI
EXTREMITES RENDUES
FRANCHIES

FIG. 4

```
                50                                  60          70          80
PE.194    LHDRDTDTEGRM.............KKEHYHILVMYEGNKSYEQI
          *** *   *                 ** *** *  **** *** *
PLB.4     LHDKDVNPDGEK.............KKSHYHLVLNYKGNKSFEQI
          ***** * **                ** * *
PHPK.255  LHDKDLNEDGSH.............KKPHFHAITVFDKKQRPAAV
          ***** * **                **** *            *
PADB.201  LHDKDVNPDGTI.............KKPHYHIVLAYSGPTTFNNV
          *****                     ** *** *  *  *
PLS.1     LHDKDKSSIKGQKY...........KKAHYHVLYIAKNPVTADSV
          *** *   *                 ** ****,* * ****  **
PWV.01    LHDMDEKLDKDTWNSSDVIRNGKH.YKKPHYHVIYLARNPVTIESV
          ******* ****************** ********** **********
PHS.71    LHDMDEKKDKDTWNSSDVIRNGKH.YKKPHYHVIYIARNPVTIESV
          ******** *                *  * *****  ********
PFX.2     LHDMDEKKIKIHGIVVMLYEMEMHVIKNPHYHVYILHGNPVTIESV
                  50          60          70          80

consens   LHD D    D                    KKPHYH          P T E V
                  70          80          90          100
```

FIG.5

2131984

PCT/FR93/00248

FIGURE 6

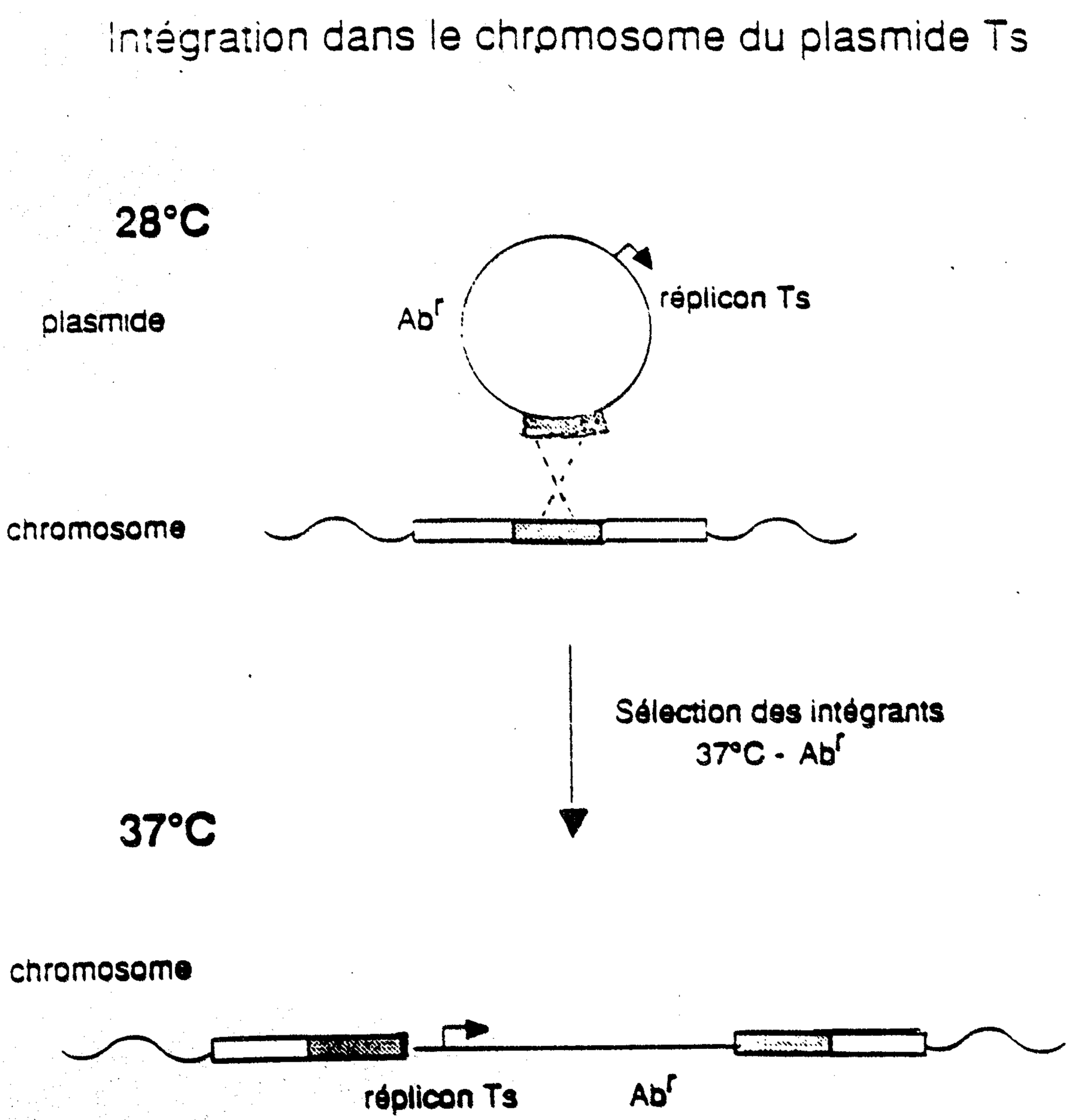

Intégration dans le chromosome du plasmide Ts
28°C
plasmide
Ab^r
réplicon Ts
chromosome
Sélection des intégrants
37°C - Ab^r
37°C
chromosome
réplicon Ts
Ab^r
Le gène est inactivé par le plasmide intégré

FIGURE 7A

EXEMPLE D'EXCISION DU REPLICON TS

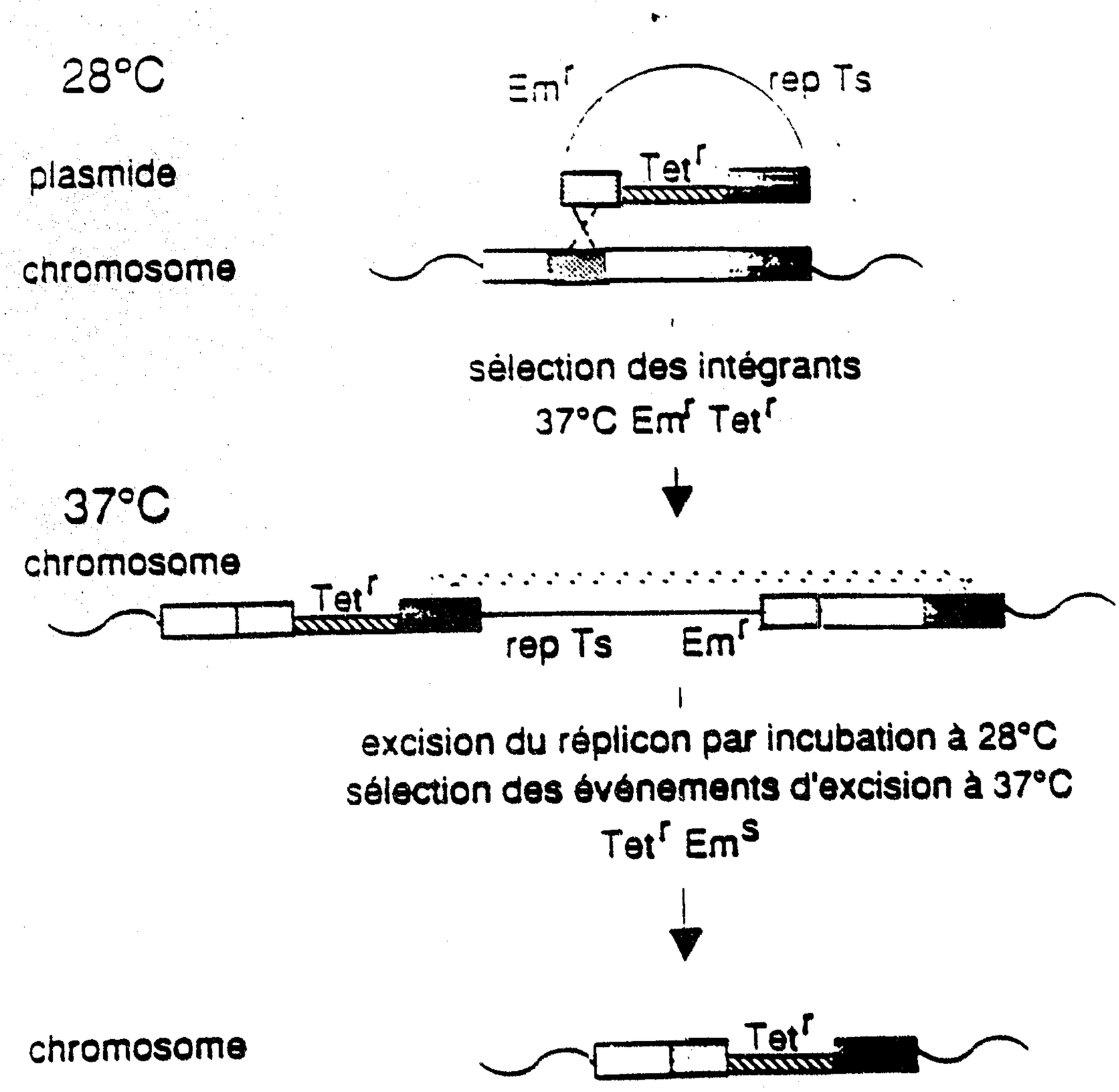
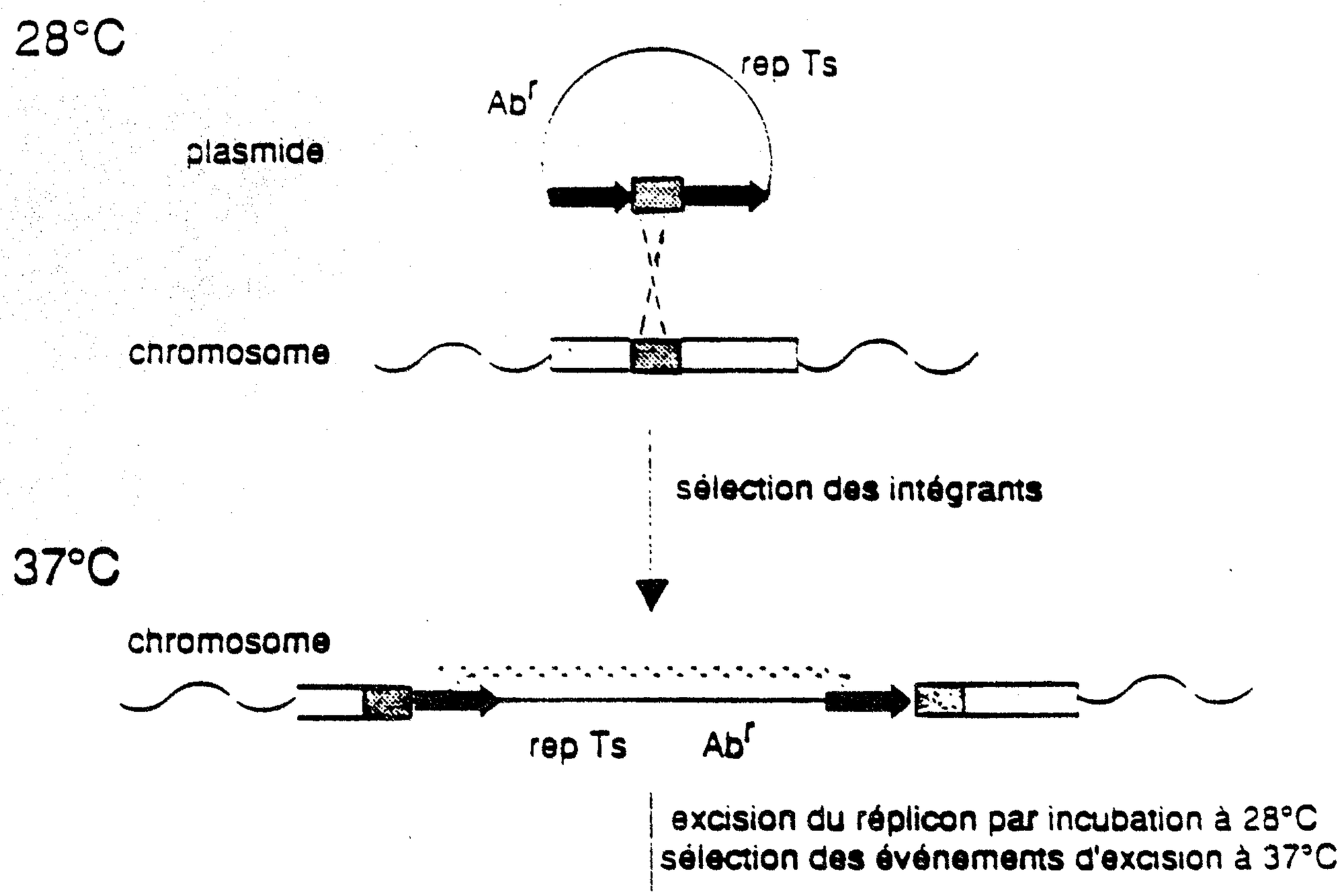


FIGURE 7B

EXCISION DU REPLICON AU MOYEN DE DUPLICATIONS PLASMIDIQUES



Le gène est inactivé par une des duplications plasmidiques

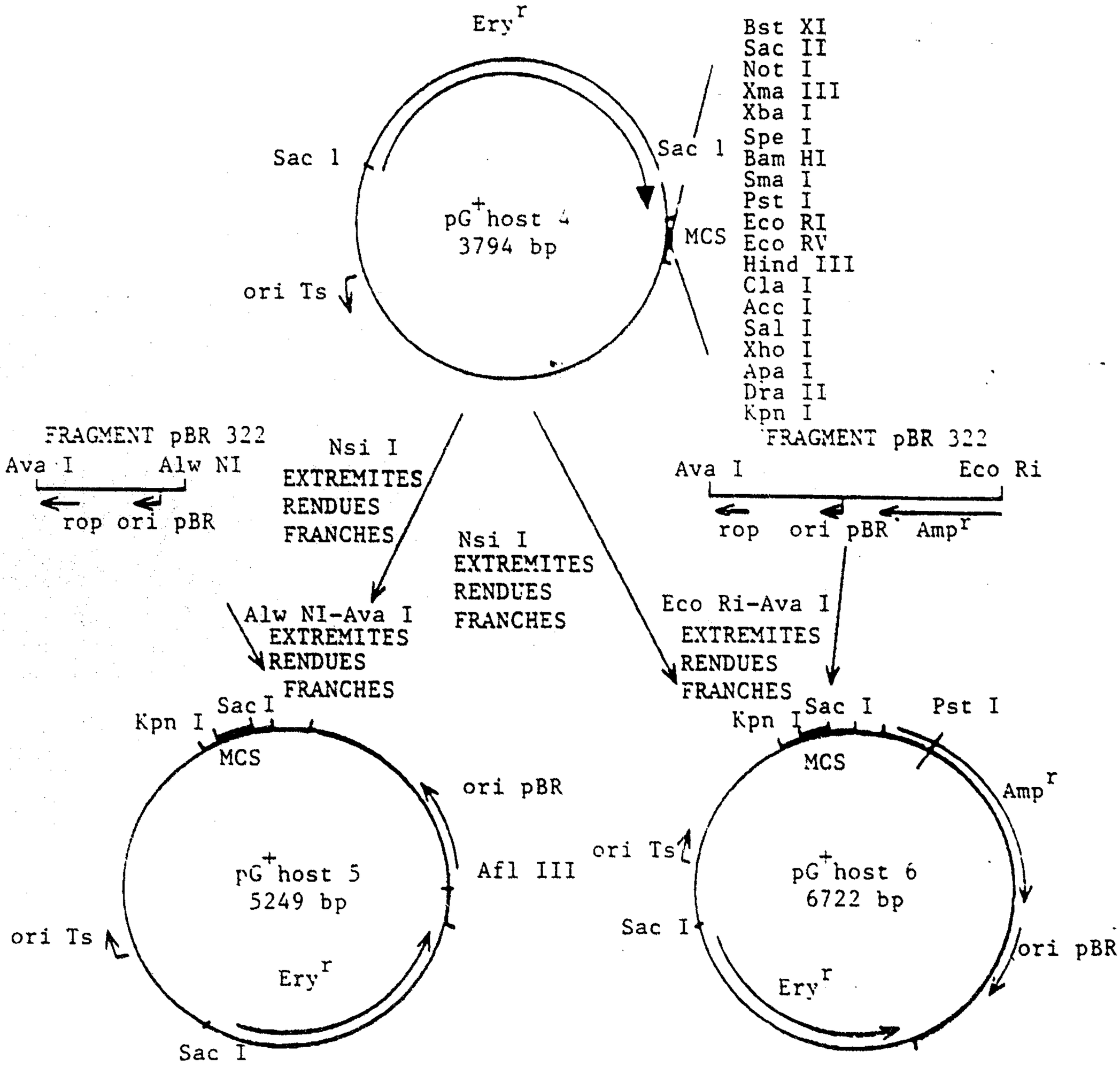

Ery r
Sac I
Sac I
Bst XI
Sac II
Not I
Xma III
Xba I
Spe I
Bam HI
Sma I
Pst I
Eco RI
Eco RV
Hind III
Cla I
Acc I
Sal I
Xho I
Apa I
Dra II
Kpn I
MCS
pG+ host 4
3794 bp
ori Ts
FRAGMENT pBR 322
Ava I
Alw NI
rop ori pBR
Nsi I
EXTREMITES
RENDUES
FRANCHES
FRAGMENT pBR 322
Ava I
Eco Ri
rop ori pBR Amp r
Alw NI-Ava I
EXTREMITES
RENDUES
FRANCHES
Nsi I
EXTREMITES
RENDUES
FRANCHES
Eco Ri-Ava I
EXTREMITES
RENDUES
FRANCHES
Kpn I
Sac I
MCS
ori pBR
Afl III
pG+ host 5
5249 bp
ori Ts
Ery r
Sac I
Kpn I
Sac I
Pst I
MCS
Amp r
ori Ts
pG+ host 6
6722 bp
Sac I
ori pBR
Ery r

Fig. 8

pghost4.seq longueur : 3792

```
   1  CGATTCACAA AAAATAGGCA CACGAAAAAC AAGTTAAGGG ATGCAGTTTA
  51  TGCATCCCTT AACTTACTTA TTAAATAATT TATAGCTATT GAAAAGAGAT
 101  AAGAATTGTT CAAAGCTAAT ATTGTTTAAA TCGTCAATTC CTGCATGTTT
 151  TAAGGAATTG TTAAATTGAT TTTTTGTAAA TATTTTCTTG TATTCTTTGT
 201  TAACCCATTT CATAACGAAA TAATTATACT TTTGTTTATC TTTGTGTGAT
 251  ATTCTTGATT TTTTTCTACT TAATCTGATA AGTGAGCTAT TCACTTTAGG
 301  TTTAGGATGA AAATATTCTC TTGGAACCAT ACTTAATATA GAAATATCAA
 351  CTTCTGCCAT TAAAAGTAAT GCCAATGAGC GTTTTGTATT TAATAATCTT
 401  TTAGCAAACC CGTATTCCAC GATTAAATAA ATCTCATTAG CTATACTATC
 451  AAAAACAATT TTGCGTATTA TATCCGTACT TATGTTATAA GGTATATTAC
 501  CATATATTTT ATAGGATTGG TTTTTAGGAA ATTTAAACTG CAATATATCC
 551  TTGTTTAAAA CTTGGAAATT ATCGTGATCA ACAAGTTTAT TTTCTGTAGT
 601  TTTGCATAAT TTATGGTCTA TTTCAATGGC AGTTACGAAA TTACACCTCT
 651  TTACTAATTC AAGGGTAAAA TGGCCTTTTC CTGAGCCGAT TTCAAAGATA
 701  TTATCATGTT CATTTAATCT TATATTTGTC ATTATTTTAT CTATATTATG
 751  TTTTGAAGTA ATAAAGTTTT GACTGTGTTT TATATTTTTC TCGTTCATTA
 801  TAACCCTCTT TAATTTGGTT ATATGAATTT TGCTTATTAA CGATTCATTA
 851  TAACCACTTA TTTTTTGTTT GGTTGATAAT GAACTGTGCT GATTACAAAA
 901  ATACTAAAAA TGCCCATATT TTTTCCTCCT TATAAAATTA GTATAATTAT
 951  AGCACGAGCT CTGATAAATA TGAACATGAT GAGTGATCGT TAAATTTATA
1001  CTGCAATCGG ATGCGATTAT TGAATAAAAG ATATGAGAGA TTTATCTAAT
1051  TTCTTTTTTC TTGTAAAAAA AGAAAGTTCT TAAAGGTTTT ATAGTTTTGG
1101  TCGTAGAGCA CACGGTTTAA CGACTTAATT ACGAAGTAAA TAAGTCTAGT
1151  GTGTTAGACT TTATGAAATC TATATACGTT TATATATATT TATTATCGCA
1201  TTTTTTATTA AAACGTCTCA AAATCGTTTC TGAGACGTTT TAGCGTTTAT
1251  TTCGTTTAGT TATCGGCATA ATCGTTAAAA CAGGCGTTAT CGTAGCGTAA
1301  AAGCCCTTGA GCGTAGCGTG GCTTTGCAGC GAAGATGTTG TCTGTTAGAT
1351  TATGAAAGCC GATGACTGAA TGAAATAATA AGCGCAGCGC CCTTCTATTT
```

1401 CGGTTGGAGG AGGCTCAAGG GAGTATGAGG GAATGAAATT CCCTCATGGG

1451 TTTGATTTTA AAAATTGCTT GCAATTTTGC CGAGCGGTAG CGCTGGAAAA

1501 TTTTTGAAAA AAATTTGGAA TTTGGAAAAA AATGGGGGGA AAGGAAGCGA

1551 ATTTTGCTTC CGTACTACGA CCCCCCATTA AGTGCCGAGT GCCAATTTTT

1601 GTGCCAAAAA CGCTCTATCC CAACTGGCTC AAGGGTTTAA GGGGTTTTTC

1651 AATCGCCAAC GAATCGCCAA CGTTTTCGCC AACGTTTTTT ATAAATCTAT

1701 ATTTAAGTAG CTTTATTGTT GTTTTTATGA TTACAAAGTG ATACACTAAC

1751 TTTATAAAAT TATTTGATTG GAGTTTTTTA AATGGTGATT TCAGAATCGA

1801 AAAAAAGAGT TATGATTTCT CTGACAAAAG AGCAAGATAA AAAATTAACA

1851 GATATGGCGA AACAAAAAGG, TTTTTCAAAA TCTGCGGTTG CGGCGTTAGC

1901 TATAGAAGAA TATGCAAGAA AGGAATCAGA ACAAAAAAAA TAAGCGAAAG

1951 CTCGCGTTTT TAGAAGGATA CGAGTTTTCG CTACTTGTTT TTGATAAGGT

2001 AATTATATCA TGGCTATTAA AATTACTAAA GCTAGAAATT TTGGATTTTT

2051 ATTATATCCT GACTCAATTC CTAATGATTG GAAAGAAAAA TTAGAGAGTT

2101 TGGGCGTATC TATGGCTGTC AGTCCTTTAC ACGATATGGA CGAAAAAAAA

2151 GATAAAGATA CATGGAATAA TAGTAATATT ATACAAAATG GAAAGCACTA

2201 TAAAAAACCA CACTATCACG TTATATATAT TGCACGAAAT CCTGTAACAA

2251 TAGAAAGCGT TAGGAACAAG ATTAAGCGAA AATTGGGGAA TAGTTCAGTT

2301 GCTCATGTTG AGATACTTGA TTATATCAAA GGTTCATATG AATATTTGAC

2351 TCATGAATCA AAGGACGCTA TTGCTAAGAA TAAACATATA TACGACAAAA

2401 AAGATATTTT GAACATTAAT GATTTTGATA TTGACCGCTA TATAACACTT

2451 GATGAAAGCC AAAAAAGAGA ATTGAAGAAT TTACTTTTAG ATATAGTGGA

2501 TGACTATAAT TTGGTAAATA CAAAAGATTT AATGGCTTTT ATTCGCCTTA

2551 GGGGAGCGGA GTTTGGAATT TTAAATACGA ATGATGTAAA AGATATTGTT

2601 TCAACAAACT CTAGCGCCTT TAGATTATGG TTTGAGGGCA ATTATCAGTG

2651 TGGATATAGA GCAAGTTATG CAAAGGTTCT TGATGCTGAA ACGGGGGAAA

2701 TAAAATGACA AACAAAGAAA AAGAGTTATT TGCTGAAAAT GAGGAATTAA

2751 AAAAAGAAAT TAAGGACTTA AAAGAGCGTA TTGAAAGATA CAGAGAAATG

2801 GAAGTTGAAT TAAGTACAAC AATAGATTTA TTGAGAGGAG GGATTATTGA

Fig. 9(suite)

2851 ATAAATAAAA GCCCCCTGAC GAAAGTCGAA GGGGGTTTTT ATTTTGGTTT

2901 GATGTTGCGA TTAATAGCAA TACAATTGCA ATAAACAAAA TGATCTTCCT

2951 TCAGGTTATG ACCATCTGTG CCAGTTCGTA ATGTCTGGTC AACTTTCCGA

3001 CTCTGAGAAA CTTCTGGAAT CGCTAGAGAA TTTCTGGAAT GGGATTCAGG

3051 AGTGGACAGA ACGACACGGA TATATAGTGG ATGTGTCAAA ACGCATACCA

3101 TTTTGAACGA TGACCTCTAA TAATTGTTAA TCATGTTGGT TACGTATTTA

3151 TTAACTTCTC CTAGTATTAG TAATTATCAT GGCTGTCATG GCGCATTAAC

3201 GGAATAAAGG GTGTGCTTAA ATCGGGCCAT TTTGCGTAAT AAGAAAAAGG

3251 ATTAATTATG AGCGAATTGA ATTAATAATA AGGTAATAGA TTTACATTAG

3301 AAAATGAAAG GGGATTTTAT GCGTGAGAAT GTTACAGTCT ATCCCTGGCG

3351 AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTC

3401 CCAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGAGCGCGCG TAATACGACT

3451 CACTATAGGG CGAATTGGGT ACCGGGCCCC CCCTCGAGGT CGACGGTATC

3501 GATAAGCTTG ATATCGAATT CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGTTCTAG

3551 AGCGGCCGCC ACCGCGGTGG AGCTCCAGCT TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG

3601 TTAATTGCGC GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA

3651 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT

3701 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG

3751 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AG

Fig. 9 (suite)

pghost5.seq longueur : 5284
Length: 5234

```
   1  AGGCACACGA AAAACAAGTT AAGGGATGCA GTTTA
                                                >seqed
      (inclus) de :  pbr322.seq check: 5483 à partir de:1426 à
      2886>
                                                TCGGG CAGCGTTGGG
  51  TCCTGGCCAC GGGTGCGCAT GATCGTGCTC CTGTCGTTGA GGACCCGGCT
 101  AGGCTGGCGG GGTTGCCTTA CTGGTTAGCA GAATGAATCA CCGATACGCG
 151  AGCGAACGTG AAGCGACTGC TGCTGCAAAA CGTCTGCGAC CTGAGCAACA
 201  ACATGAATGG TCTTCGGTTT CCGTGTTTCG TAAAGTCTGG AAACGCGGAA
 251  GTCAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCCGGAT CTGCATCGCA GGATGCTGCT
 301  GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTGGCATTGA
 351  CCCTGAGTGA TTTTTCTCTG GTCCCGCCGC ATCCATACCG CCAGTTGTTT
 401  ACCCTCACAA CGTTCCAGTA ACCGGGCATG TTCATCATCA GTAACCCGTA
 451  TCGTGAGCAT CCTCTCTCGT TTCATCGGTA TCATTACCCC CATGAACAGA
 501  AATCCCCCTT ACACGGAGGC ATCAGTGACC AAACAGGAAA AAACCGCCCT
 551  TAACATGGCC CGCTTTATCA GAAGCCAGAC ATTAACGCTT CTGGAGAAAC
 601  TCAACGAGCT GGACGCGGAT GAACAGGCAG ACATCTGTGA ATCGCTTCAC
 651  GACCACGCTG ATGAGCTTTA CCGCAGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA
 701  CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC
 751  TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT
 801  GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC CAGTCACGTA GCGATAGCGG
 851  AGTGTATACT GGCTTAACTA TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT
 901  GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC
 951  GCATCAGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC
1001  GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT
1051  ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC
1101  AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT
1151  AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG
1201  GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA
```

Fig. 10

```
1251  GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG
1301  TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCACGCTG
1351  TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
1401  ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT
1451  CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAG
                                                        <seq
      ed (inclus) de : pbr322.seq check: 5483 à partir de: 1426
      à : 2886<
                                                        TCCC
1501  TTAACTTACT TATTAAATAA TTTATAGCTA TTGAAAAGAG ATAAGAATTG
1551  TTCAAAGCTA ATATTGTTTA AATCGTCAAT TCCTGCATGT TTTAAGGAAT
1601  TGTTAAATTG ATTTTTTGTA AATATTTTCT TGTATTCTTT GTTAACCCAT
1651  TTCATAACGA AATAATTATA CTTTTGTTTA TCTTTGTGTG ATATTCTTGA
1701  TTTTTTTCTA CTTAATCTGA TAAGTGAGCT ATTCACTTTA GGTTTAGGAT
1751  GAAAATATTC TCTTGGAACC ATACTTAATA TAGAAATATC AACTTCTGCC
1801  ATTAAAAGTA ATGCCAATGA GCGTTTTGTA TTTAATAATC TTTTAGCAAA
1851  CCCGTATTCC ACGATTAAAT AAATCTCATT AGCTATACTA TCAAAAACAA
1901  TTTTGCGTAT TATATCCGTA CTTATGTTAT AAGGTATATT ACCATATATT
1951  TTATTAGGATT GGTTTTTAGG AAATTTAAAC TGCAATATAT CCTTGTTTAA
2001  AACTTGGAAA TTATCGTGAT CAACAAGTTT ATTTTCTGTA GTTTTGCATA
2051  ATTTATGGTC TATTTCAATG GCAGTTACGA AATTACACCT CTTTACTAAT
2101  TCAAGGGTAA AATGGCCTTT TCCTGAGCCG ATTTCAAAGA TATTATCATG
2151  TTCATTTAAT CTTATATTTG TCATTATTTT ATCTATATTA TGTTTTGAAG
2201  TAATAAAGTT TTGACTGTGT TTTATATTTT TCTCGTTCAT TATAACCCTC
2251  TTTAATTTGG TTATATGAAT TTTGCTTATT AACGATTCAT TATAACCACT
2301  TATTTTTTGT TTGGTTGATA ATGAACTGTG CTGATTACAA AAATACTAAA
2351  AATGCCCATA TTTTTTCCTC CTTATAAAAT TAGTATAATT ATAGCACGAG
2401  CTCTGATAAA TATGAACATG ATGAGTGATC GTTAAATTTA TACTGCAATC
2451  GGATGCGATT ATTGAATAAA AGATATGAGA GATTTATCTA ATTTCTTTTT
2501  TCTTGTAAAA AAAGAAAGTT CTTAAAGGTT TTATAGTTTT GGTCGTAGAG
2551  CACACGGTTT AACGACTTAA TTACGAAGTA AATAAGTCTA GTGTGTTAGA
```

Fig. 10 (suite)

```
2601  CTTTATGAAA TCTATATACG TTTATATATA TTTATTATC
                                                >SEQED
      (inclus) de : pwv01. check:7166 à partir de : 1 à: 1744>
                                                C GATTTTTTAT

2651  TAAAACGTCT CAAAATCGTT TCTGAGACGT TTTAGCGTTT ATTTCGTTTA

2701  GTTATCGGCA TAATCGTTAA AACAGGCGTT ATCGTAGCGT AAAAGCCCTT

2751  GAGCGTAGCG TGGCTTTGCA GCGAAGATGT TGTCTGTTAG ATTATGAAAG

2801  CCGATGACTG AATGAAATAA TAAGCGCAGC GCCCTTCTAT TTCGGTTGGA

2851  GGAGGCTCAA GGGAGTATGA GGGAATGAAA TTCCCTCATG GGTTTGATTT

2901  TAAAAATTGC TTGCAATTTT GCCGAGCGGT AGCGCTGGAA AATTTTTGAA

2951  AAAAATTTGG AATTTGGAAA AAAATGGGGG GAAAGGAAGC GAATTTTGCT

3001  TCCGTACTAC GACCCCCCAT TAAGTGCCGA GTGCCAATTT TTGTGCCAAA

3051  AACGCTCTAT CCCAACTGGC TCAAGGGTTT AAGGGGTTTT TCAATCGCCA

3101  ACGAATCGCC AACGTTTTCG CCAACGTTTT TTATAAATCT ATATTTAAGT

3151  AGCTTTATTG TTGTTTTTAT GATTACAAAG TGATACACTA ACTTTATAAA

3201  ATTATTTGAT TGGAGTTTTT TAAATGGTGA TTTCAGAATC GAAAAAAAGA

3251  GTTATGATTT CTCTGACAAA AGAGCAAGAT AAAAAATTAA CAGATATGGC

3301  GAAACAAAAA GGTTTTTCAA AATCTGCGGT TGCGGCGTTA GCTATAGAAG

3351  AATATGCAAG AAAGGAATCA GAACAAAAAA AATAAGCGAA AGCTCGCGTT

3401  TTTAGAAGGA TACGAGTTTT CGCTACTTGT TTTTGATAAG GTAATTATAT

3451  CATGGCTATT AAAAATACTA AAGCTAGAAA TTTTGGATTT TTATTATATC

3501  CTGACTCAAT TCCTAATGAT TGGAAAGAAA AATTAGAGAG TTTGGGCGTA

3551  TCTATGGCTG TCAGTCCTTT ACACGATATG GACGAAAAAA AAGATAAAGA

3601  TACATGGAAT AATAGTAATA TTATACAAAA TGGAAAGCAC TATAAAAAAC

3651  CACACTATCA CGTTATATAT ATTGCACGAA ATCCTGTAAC AATAGAAAGC

3701  GTTAGGAACA AGATTAAGCG AAAATTGGGG AATAGTTCAG TTGCTCATGT

3751  TGAGATACTT GATTATATCA AAGGTTCATA TGAATATTTG ACTCATGAAT

3801  CAAAGGACGC TATTGCTAAG AATAAACATA TATACGACAA AAAAGATATT

3851  TTGAACATTA ATGATTTTGA TATTGACCGC TATATAACAC TTGATGAAAG

3901  CCAAAAAAGA GAATTGAAGA ATTTACTTTT AGATATAGTG GATGACTATA

3951  ATTTGGTAAA TACAAAAGAT TTAATGGCTT TTATTCGCCT TAGGGGAGCG
```

Fig. 10 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4001 GAGTTTGGAA TTTTAAATAC GAATGATGTA AAAGATATTG TTTCAACAAA

4051 CTCTAGCGCC TTTAGATTAT GGTTTGAGGG CAATTATCAG TGTGGATATA

4101 GAGCAAGTTA TGCAAAGGTT CTTGATGCTG AAACGGGGGA AATAAAATGA

4151 CAAACAAAGA AAAAGAGTTA TTTGCTGAAA ATGAGGAATT AAAAAAAGAA

4201 ATTAAGGACT TAAAAGAGCG TATTGAAAGA TACAGAGAAA TGGAAGTTGA

4251 ATTAAGTACA ACAATAGATT TATTGAGAGG AGGGATTATT GAATAAATAA

4301 AAGCCCCCTG ACGAAAGTCG AAGGGGGTTT TTATTTTGGT TTGATGTTGC

4351 GATTAATAGC AATACAATTG CAATAAACAA AAT

<SEQED (inclus)
de: pwv01. check: 7166 à partir de : 1 à: 1744<
>SEQED (inclus)
reverse de: pub110.seq check: 5091 à partir de : 1964 à: 2366>

GATCTTC CTTCAGGTTA

4401 TGACCATCTG TGCCAGTTCG TAATGTCTGG TCAACTTTCC GACTCTGAGA

4451 AACTTCTGGA ATCGCTAGAG AATTTCTGGA ATGGGATTCA GGAGTGGACA

4501 GAACGACACG GATATATAGT GGATGTGTCA AAACGCATAC CATTTTGAAC

4551 GATGACCTCT AATAATTGTT AATCATGTTG GTTACGTATT TATTAACTTC

4601 TCCTAGTATT AGTAATTATC ATGGCTGTCA TGGCGCATTA ACGGAATAAA

4651 GGGTGTGCTT AAATCGGGCC ATTTTGCGTA ATAAGAAAAA GGATTAATTA

4701 TGAGCGAATT GAATTAATAA TAAGGTAATA GATTTACATT AGAAAATGAA

4751 AGGGGATTTT ATGCGTGAGA ATGTTACAGT CTATCC

<SEQED (inclus) reverse de: pub110.seq check: 5091 à partir de: 1964 à: 2366<
>seqed (inclus) de: psk.seq check: 8495 à partir de:530 à: 977>

CTGG CGAAAGGGGG

4801 ATGTGCTGCA AGGCGATTAA GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC

4851 GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAGCGCG CGTAATACGA CTCACTATAG

4901 GGCGAATTGG GTACCGGGCC CCCCCTCGAG GTCGACGGTA TCGATAAGCT

4951 TGATATCGAA TTCCTGCAGC CCGGGGGATC CACTAGTTCT AGAGCGGCCG

5001 CCACCGCGGT GGAGCTCCAG CTTTTGTTCC CTTTAGTGAG GGTTAATTGC

5051 GCGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC

5101 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC

Fig. 10 (suite)

```
5151  TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT
5201  GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAG
```

```
                                                  <seqed (inclus)
de: psk.seq check: 8495 à partir de:530 à:977<
                                                  >SEQED (inclus)
de: pc1.ba check: 2015 à partir de: 974 à: 2004>
```

Fig. 10 (suite)

pghost6.seq longueur 6722 Type: N

```
   1  CGATTCACAA AAAATAGGCA CACGAAAAAC AAGTTAAGGG ATGCAGTTTA
  51  AATTCTTGAA GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA
 101  TGTCATGATA ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA
 151  ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG
 201  TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA
 251  AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
 301  TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA
 351  GTAAAAGATG CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT
 401  GGATCTCAAC AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT
 451  TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC
 501  CGTGTTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA
 551  GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
 601  GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC
 651  ACTGCGGCCA ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC
 701  CGCTTTTTTG CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG
 751  AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG
 801  CCTGCAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG GCGAACTACT
 851  TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
 901  TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT
 951  GATAAATCTG GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT
1001  GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA
1051  GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC
1101  TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT
1151  TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1201  TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTC
1251  CACTGAGCGT CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC
1301  TTTTTTTCTG CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC
1351  CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG
```

FIG. 11

2401 GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA

1451 GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC

1501 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG

1551 TGTCTTACCG GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG

1601 GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA

1651 CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG

1701 CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG

1751 AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT

1801 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA

1851 TGCTCGTCAG GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT

1901 TTTACGGTTC CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG

1951 CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT

2001 GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT CAGTGAGCGA

2051 GGAAGCGGAA GAGCGCCTGA TGCGGTATTT TCTCCTTACG CATCTGTGCG

2101 GTATTTCACA CCGCATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC

2151 GCATAGTTAA GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG

2201 GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG

2251 TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT

2301 GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG

2351 CGGTAAAGCT CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG

2401 TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC

2451 TTCTGATAAA GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT

2501 GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT

2551 GAAACGAGAG AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC

2601 GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG

2651 GACCAGAGAA AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA

2701 TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA

2751 ACATAATGGT GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA

2801 CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA

Fig. 11 (suite)

2851 GCAGCAGTCG CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC

2901 CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG

2951 ATCATGCGCA CCCGTGGCCA GGACCCAACG CTGCTCCCTT AACTTACTTA

3001 TTAAATAATT TATAGCTATT GAAAAGAGAT AAGAATTGTT CAAAGCTAAT

3051 ATTGTTTAAA TCGTCAATTC CTGCATGTTT TAAGGAATTG TTAAATTGAT

3101 TTTTTGTAAA TATTTTCTTG TATTCTTTGT TAACCCATTT CATAACGAAA

3151 TAATTATACT TTTGTTTATC TTTGTGTGAT ATTCTTGATT TTTTTCTACT

3201 TAATCTGATA AGTGAGCTAT TCACTTTAGG TTTAGGATGA AAATATTCTC

3251 TTGGAACCAT ACTTAATATA GAAATATCAA CTTCTGCCAT TAAAAGTAAT

3301 GCCAATGAGC GTTTTGTATT TAATAATCTT TTAGCAAACC CGTATTCCAC

3351 GATTAAATAA ATCTCATTAG CTATACTATC AAAAACAATT TTGCGTATTA

3401 TATCCGTACT TATGTTATAA GGTATATTAC CATATATTTT ATAGGATTGG

3451 TTTTTAGGAA ATTTAAACTG CAATATATCC TTGTTTAAAA CTTGGAAATT

3501 ATCGTGATCA ACAAGTTTAT TTTCTGTAGT TTTGCATAAT TTATGGTCTA

3551 TTTCAATGGC AGTTACGAAA TTACACCTCT TTACTAATTC AAGGGTAAAA

3601 TGGCCTTTTC CTGAGCCGAT TTCAAAGATA TTATCATGTT CATTTAATCT

3651 TATATTTGTC ATTATTTTAT CTATATTATG TTTTGAAGTA ATAAAGTTTT

3701 GACTGTGTTT TATATTTTTC TCGTTCATTA TAACCCTCTT TAATTTGGTT

3751 ATATGAATTT TGCTTATTAA CGATTCATTA TAACCACTTA TTTTTTGTTT

3801 GGTTGATAAT GAACTGTGCT GATTACAAAA ATACTAAAAA TGCCCATATT

3851 TTTTCCTCCT TATAAAATTA GTATAATTAT AGCACGAGCT CTGATAAATA

3901 TGAACATGAT GAGTGATCGT TAAATTTATA CTGCAATCGG ATGCGATTAT

3951 TGAATAAAAG ATATGAGAGA TTTATCTAAT TTCTTTTTTC TTGTAAAAAA

4001 AGAAAGTTCT TAAAGGTTTT ATAGTTTTGG TCGTAGAGCA CACGGTTTAA

4051 CGACTTAATT ACGAAGTAAA TAAGTCTAGT GTGTTAGACT TTATGAAATC

4101 TATATACGTT TATATATATT TATTATCCGA TTTTTTATTA AAACGTCTCA

4151 AAATCGTTTC TGAGACGTTT TAGCGTTTAT TTCGTTTAGT TATCGGCATA

4201 ATCGTTAAAA CAGGCGTTAT CGTAGCGTAA AAGCCCTTGA GCGTAGCGTG

4251 GCTTTGCAGC GAAGATGTTG TCTGTTAGAT TATGAAAGCC GATGACTGAA

Fig. 11 (suite)

4301 TGAAATAATA AGCGCAGCGC CCTTCTATTT CGGTTGGAGG AGGCTCAAGG
4351 GAGTATGAGG GAATGAAATT CCCTCATGGG TTTGATTTTA AAAATTGCTT
4401 GCAATTTTGC CGAGCGGTAG CGCTGGAAAA TTTTTGAAAA AAATTTGGAA
4451 TTTGGAAAAA AATGGGGGGA AAGGAAGCGA ATTTTGCTTC CGTACTACGA
4501 CCCCCCATTA AGTGCCGAGT GCCAATTTTT GTGCCAAAAA CGCTCTATCC
4551 CAACTGGCTC AAGGGTTTAA GGGGTTTTTC AATCGCCAAC GAATCGCCAA
4601 CGTTTTCGCC AACGTTTTTT ATAAATCTAT ATTTAAGTAG CTTTATTGTT
4651 GTTTTTATGA TTACAAAGTG ATACACTAAC TTTATAAAAT TATTTGATTG
4701 GAGTTTTTTA AATGGTGATT TCAGAATCGA AAAAAAGAGT TATGATTTCT
4751 CTGACAAAAG AGCAAGATAA AAAATTAACA GATATGGCGA AACAAAAAGG
4801 TTTTTCAAAA TCTGCGGTTG CGGCGTTAGC TATAGAAGAA TATGCAAGAA
4851 AGGAATCAGA ACAAAAAAAA TAAGCGAAAG CTCGCGTTTT TAGAAGGATA
4901 CGAGTTTTCG CTACTTGTTT TTGATAAGGT AATTATATCA TGGCTATTAA
4951 AAATACTAAA GCTAGAAATT TTGGATTTTT ATTATATCCT GACTCAATTC
5001 CTAATGATTG GAAAGAAAAA TTAGAGAGTT TGGGCGTATC TATGGCTGTC
5051 AGTCCTTTAC ACGATATGGA CGAAAAAAAA GATAAAGATA CATGGAATAA
5101 TAGTAATATT ATACAAAATG GAAAGCACTA TAAAAAACCA CACTATCACG
5151 TTATATATAT TGCACGAAAT CCTGTAACAA TAGAAAGCGT TAGGAACAAG
5201 ATTAAGCGAA AATTGGGGAA TAGTTCAGTT GCTCATGTTG AGATACTTGA
5251 TTATATCAAA GGTTCATATG AATATTTGAC TCATGAATCA AAGGACGCTA
5301 TTGCTAAGAA TAAACATATA TACGACAAAA AAGATATTTT GAACATTAAT
5351 GATTTTGATA TTGACCGCTA TATAACACTT GATGAAAGCC AAAAAAGAGA
5401 ATTGAAGAAT TTACTTTTAG ATATAGTGGA TGACTATAAT TTGGTAAATA
5451 CAAAAGATTT AATGGCTTTT ATTCGCCTTA GGGGAGCGGA GTTTGGAATT
5501 TTAAATACGA ATGATGTAAA AGATATTGTT TCAACAAACT CTAGCGCCTT
5551 TAGATTATGG TTTGAGGGCA ATTATCAGTG TGGATATAGA GCAAGTTATG
5601 CAAAGGTTCT TGATGCTGAA ACGGGGGAAA TAAAATGACA AACAAAGAAA
5651 AAGAGTTATT TGCTGAAAAT GAGGAATTAA AAAAAGAAAT TAAGGACTTA
5701 AAAGAGCGTA TTGAAAGATA CAGAGAAATG GAAGTTGAAT TAAGTACAAC

Fig. 11 (suite)

5751 AATAGATTTA TTGAGAGGAG GGATTATTGA ATAAATAAAA GCCCCCTGAC

5801 GAAAGTCGAA GGGGGTTTTT ATTTTGGTTT GATGTTGCGA TTAATAGCAA

5851 TACAATTGCA ATAAACAAAA TGATCTTCCT TCAGGTTATG ACCATCTGTG

5901 CCAGTTCGTA ATGTCTGGTC AACTTTCCGA CTCTGAGAAA CTTCTGGAAT

5951 CGCTAGAGAA TTTCTGGAAT GGGATTCAGG AGTGGACAGA ACGACACGGA

6001 TATATAGTGG ATGTGTCAAA ACGCATACCA TTTTGAACGA TGACCTCTAA

6051 TAATTGTTAA TCATGTTGGT TACGTATTTA TTAACTTCTC CTAGTATTAG

6101 TAATTATCAT GGCTGTCATG GCGCATTAAC GGAATAAAGG GTGTGCTTAA

6151 ATCGGGCCAT TTTGCGTAAT AAGAAAAAGG ATTAATTATG AGCGAATTGA

6201 ATTAATAATA AGGTAATAGA TTTACATTAG AAAATGAAAG GGGATTTTAT

6251 GCGTGAGAAT GTTACAGTCT ATCCCTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG

6301 GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTC CCAGTCACGA CGTTGTAAAA

6351 CGACGGCCAG TGAGCGCGCG TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTGGGT

6401 ACCGGGCCCC CCCTCGAGGT CGACGGTATC GATAAGCTTG ATATCGAATT

6451 CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGTTCTAG AGCGGCCGCC ACCGCGGTGG

6501 AGCTCCAGCT TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG TTAATTGCGC GCTTGGCGTA

6551 ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC

6601 CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA

6651 TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA

6701 GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AG

Fig. 11 (suite)