

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 décembre 2019 (19.12.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/239042 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/10 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2019/051372

(22) Date de dépôt international :
07 juin 2019 (07.06.2019)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1855062 11 juin 2018 (11.06.2018) FR

(71) Déposants : **FONDATION MEDITERRANEE INFECTIO** [FR/FR] ; Faculté de Médecine, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 MARSEILLE (FR). **UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE** [FR/FR] ; 58 boulevard Charles Li-von, 13284 MARSEILLE Cedex 7 (FR).

(72) Inventeurs : **RAOULT, Didier** ; 16 rue de Lorraine, 13008 MARSEILLE (FR). **AZZA, Said** ; 39 rue Antoine Ré, 13010 MARSEILLE (FR). **LA SCOLA, Bernard** ; 335 rue Corneille, 13320 BOUC BEL AIR (FR). **CHABRIERE, Eric** ; 855 Chemin de la Croix du Garlaban, 13400 AUBAGNE (FR). **LEVASSEUR, Anthony** ; 27 allée de la musicienne, 13400 AUBAGNE (FR). **PERRIN, Pierre** ; 343 bis Bd Romain Rolland Residence les grands pins Bat A, 13009 MARSEILLE (FR).

(74) Mandataire : **CABINET BEAU DE LOMÉNIE** ; 158, rue de l'Université, 75340 PARIS Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING A TARGET NUCLEIC ACID OF A HOST CELL

(54) Titre : METHODE DE MODIFICATION D'UNE SEQUENCE CIBLE D'ACIDE NUCLEIQUE D'UNE CELLULE HOTE

(57) Abstract: The invention relates to a method for modifying, by cutting and/or total or partial degradation, a target nucleic acid sequence of a host cell, comprising bringing said host cell into contact *in vitro* or *ex vivo* with a biological system comprising: a first component comprising at least one protein selected from the proteins R350 and R354 of giant virus group A Mimivirus or at least one expression vector of at least one nucleic acid sequence of the genes R350 and/or R354 respectively encoding for at least one of said proteins R350 and/or R354; and a second component comprising at least one nucleic acid sequence, called an affinity sequence, said affinity sequence comprising at least one complementary sequence of a specific sequence of said target sequence, said specific sequence comprising at least 10 nucleotides, preferably 15 nucleotides, of said target sequence, said specific sequence being flanked at 3' and 5' by adjacent sequences surrounding a sequence of 15 nucleotides of the Zamilon virophage contained and repeated four times in the R349 gene of giant virus Mimivirus.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode de modification par coupure et/ou dégradation totale ou partielle d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte comprenant la mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo* avec un système biologique comprenant : - un premier composant comprenant au moins une protéine choisie parmi les protéines R350 et R354 de virus géant Mimivirus de lignée A ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique des gènes R350 et/ou R354 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354, et - un deuxième composant comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dénommée séquence d'affinité, la dite séquence d'affinité comprenant au moins une séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible, la dite séquence spécifique étant flanquée en 3' et 5' de séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le gène R349 de virus géant Mimivirus.

WO 2019/239042 A1

Méthode de modification d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte.

La présente invention concerne une méthode de modification d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte comprenant la
5 mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo* avec un système biologique.

Les procaryotes sont capables d'acquérir une immunité adaptative contre l'invasion d'éléments génétiques, tels que les plasmides ou les phages, via l'incorporation dans leur génome de courtes séquences
10 d'ADN étranger (de 21 à 72 nucléotides [nt]), système appelé CRISPR-Cas (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacée) [1, 2]. L'acquisition de ces séquences d'ADN étranger survient de façon adjacente aux gènes Cas qui ont pour rôle de cliver l'ADN étranger en fragments de petites tailles. CRISPR-Cas confère ainsi une
15 résistance face à une seconde infection [14, 15]

À ce jour, le système CRISPR-Cas n'avait été observé que chez les bactéries et les archées [16], mais pas chez des virus [1, 2].

La découverte des virus géants d'amibes, vivant en compétition avec d'autres microbes, a contesté la définition classique d'un virus [4,
20 5]. Depuis leur découverte, les virus géants ont révélé des caractéristiques phénotypiques et génotypiques uniques qui vont à l'encontre de la définition classique d'un virus, les plaçant à proximité de certains microbes. Les Mimivirus au diamètre supérieur à 0,5 micromètre, sont aisément visibles avec un simple microscope optique.
25 Ils possèdent un génome large et complexe qui contient des séquences provenant d'autres organismes [6]. En outre, leur infection possible par des virus, les virophages, qui se multiplient dans l'usine à virus des Mimivirus, et la présence des éléments mobiles (transpovirus, polintons) ont suscité de vifs débats sur l'origine de ces virus [7]. De
30 plus, les virophages, comme les bactériophages, peuvent s'intégrer au génome de Mimivirus sous la forme de provirophage [9]. Un des

virophages qui parasite la famille des Mimivirus a été baptisé zamilon [10].

Dans cette étude publiée dans le journal Nature [8], les chercheurs ont observé qu'un groupe parmi les Mimivirus (appelé
5 lignées A) a développé une résistance contre l'infection par un virophage nommé zamilon, alors que les virus géants des lignées B et C sont sensibles à l'infection par ce virophage. Les chercheurs ont trouvé la présence d'une séquence répétée d'ADN de zamilon qui sert à accrocher le virophage uniquement dans la lignée A. Ce complexe a
10 ainsi été nommé MIMIVIRE (Mimivirus VIrophage Résistance Élément) et présente des similarités fonctionnelles avec le système de défense CRISPR-Cas existant jusqu'alors uniquement chez les bactéries et les archées et comportant une enzyme déroulant l'ADN (hélicase R350) et une autre le coupant (nucléase R354). L'inactivation du complexe
15 MIMIVIRE a permis de restaurer la susceptibilité de Mimivirus à l'infection par le virophage. Les protéines partenaires comprises dans ce complexe MIMIVIRE sont impliquées dans la dégradation spécifique de l'ADN étranger. Le système de défense virale, MIMIVIRE, confère ainsi une immunité aux virus géants qui ont pu intégrer dans leur génome
20 l'ADN du virophage infectant.

Plus précisément, 59 souches de la collection des virus géants de la famille des *Mimiviridae* d'*Acanthamoeba polyphaga* (dont 28 de la lignée A, 8 de la lignée B et 23 de la lignée C), ont été infectées par les virophages zamilon ou Sputnik, un autre virophage [11]. Après
25 heures, une augmentation de l'ADN de Sputnik a été observée dans l'ensemble des trois lignées de *Mimiviridae*. En revanche, zamilon a été capable de se répliquer uniquement avec les souches des lignées B et C de *Mimiviridae*, mais aucune souche de la lignée A. Une séquence de 28 nucléotides (nt), spécifique de zamilon, et trois répétitions de 15 nt ont
30 été retrouvées dans l'ensemble des génomes de la lignée A contrairement aux deux autres lignées (B et C). Ces séquences sont localisées dans un gène codant une transposase-A chez zamilon, et sont

intégrées dans le gène R349 de Mimivirus et dans les gènes orthologues, chez tous les Mimivirus de la lignée A. Ces séquences répétées sont séparées par des séquences de 9,48 et 63 nt respectivement. L'étude de l'environnement génomique au voisinage des séquences répétées de zamilon a mis en évidence des ORF (open reading frame, cadre de lecture ouvert) conservés chez les Mimiviruses. Ces ORF possèdent une similarité distante avec les Cas protéines qui sont de type hélicase et nucléase. Silencés par RNA interférence, l'inactivation des ORF contenant la séquence répétée d'ADN de zamilon, ou des ORF proche des Cas protéines, a permis de restaurer la susceptibilité de la lignée A des Mimivirus à l'infection par zamilon. En outre, l'expression des gènes a confirmé qu'ils codent une hélicase R350 et une nucléase R354.

Désormais, les virus géants des lignée B et C sont dénommés respectivement Momovirus pour la lignée B et Mégavirus pour la lignée C, Mimivirus étant réservé à la lignée A. Dans la suite de la présente demande de brevet lorsqu'il est indiqué Mimivirus, il s'agit donc de virus géant Mimivirus de la lignée A dont la séquence du génome est déposée dans Genbank sous la référence AY653733.1 et/ou qui a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (Paris) selon le traité de Budapest sous le numéro d'enregistrement CNCM I-5322 le 31 Mai 2018 sous la référence APBC1.

Dans un article récent [17] la structure et l'activité nucléase de la protéine R354 ont été étudiées.

Les protéines R350 et R354 de Mimivirus sont connues de l'homme de l'art et ont été décrites [8,17] et reproduites dans les séquences SEQ. ID. N°: 1 et 2 du listage de séquences.

Ce système de défense virale confère ainsi une immunité adaptative aux virus géants qui ont pu intégrer dans leur génome l'ADN du virophage infectant. C'est pourquoi ce complexe a été nommé Mimivire (Mimivirus virophage resistance element) [11].

Suite à l'étude de Nature 2016 (8), il a été toutefois contesté que Mimivirus puisse être également capable de développer un outil de type ciseaux biologiques analogue à celui de CRISPR-Cas [12].

5 Toutefois, selon la présente invention, on a démontré que le système MIMIVIRE peut être adapté – mais différemment que le système CRISPR-Cas tel que décrit par exemple dans EP 2 800 811- pour offrir un nouvel outil biologique du type « ciseaux biologiques » comparable au système CRISPR-Cas pour des gènes étrangers autres que zamilon.

10 Le but de la présente invention est donc de rechercher les modalités selon lesquelles le système Mimivire peut être adapté pour fournir un système de « ciseaux biologiques » analogue au système CRISPR-Cas pour cibler des gènes autres que le gène zamilon dans Mimivirus et ainsi pour modifier des gènes ou séquences non codantes de bactéries ou cellules eucaryotes notamment.

15 Pour ce faire, la présente invention fournit une méthode de modification par coupure et/ou dégradation totale ou partielle d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte comprenant la mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo* avec un système biologique comprenant :

20 - un premier composant comprenant au moins une protéine choisie parmi les protéines R350 et R354 de virus géant Mimivirus de lignée A ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique des gènes R350 et/ou R354 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354, et

25 - un deuxième composant comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dénommée séquence d'affinité, la dite séquence d'affinité comprenant au moins une séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible, la dite séquence spécifique de ladite séquence cible comprenant au moins 10 nucléotides,
30 de préférence 15 nucléotides.

La séquence cible peut être une séquence d'ADN ou une séquence d'ARN transcrite du génome d'une dite cellule hôte. On comprend que ladite séquence spécifique de ladite séquence cible est autre qu'une séquence répétée du virophage zamilon contenue dans ledit gène R349.

- 5 La cellule hôte peut être une cellule de bactérie ou d'archée ou une cellule eucaryote unicellulaire ou pluricellulaire, notamment de plante ou d'animal.

Les protéines R350 et R354 de Mimivirus sont connues de l'homme de l'art et ont été décrites ci-après dans les séquences SEQ. ID. N°: 1
10 et 2 du listage de séquences.

Ces protéines R350 et R354 sont connues comme ayant des propriétés d'hélicase et respectivement nucléase comprenant des activités d'exonucléase et d'endonucléase de sorte que la modification de la dite séquence cible peut comprendre une coupure en un site
15 spécifique et/ou une dégradation totale ou partielle de la dite séquence cible.

On entend par « séquence complémentaire d'une séquence spécifique de 15 nucléotides de ladite séquence cible », une séquence d'ADN ou d'ARN qui s'hybride avec la dite séquence cible et qui ne
20 s'hybride avec aucune autre séquence d'une dite cellule hôte et desdits gènes R349, R350 ou R354.

En revanche on comprend que les dites séquences flanquantes sont tirées dudit gène R349.

Le gène R349 de Mimivirus est connu de l'homme de l'art et a été
25 décrit ci-après dans la séquence SEQ. ID. N°: 5 du listage de séquences.

Des séquences des gènes R350 et 354 codant pour les protéines 350 et 354 de Mimivirus sont connues de l'homme de l'art et ont été

décrites dans les séquences SEQ. ID. N°: 3 et 4 du listage de séquences.

Plus particulièrement, ledit deuxième composant comprend la dite séquence d'affinité sous forme d'ADN ou de préférence sous forme d'ARN.

De préférence, ladite séquence d'affinité comprend au moins 2 mêmes dites séquences complémentaires d'une même séquence spécifique, de préférence de 2 à 4, de préférence encore 4 mêmes dites séquences complémentaires d'une même séquence spécifique, répétées de façon espacée.

De préférence encore, la dite ou chaque dite séquence complémentaire de la même dite séquence spécifique de la séquence d'affinité comprend est flanquée en 3' et 5' de séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le gène R349 de virus géant Mimivirus.

De préférence encore, les dites même séquences complémentaires de la même séquence spécifique de la séquence cible sont flanquées en 3' et 5' de séquences flanquantes différentes les unes des autres entre les différentes mêmes séquences complémentaires et les dites séquences flanquantes correspondant respectivement aux séquences flanquantes des différentes mêmes séquences répétées du virophage zamilon contenues dans ledit gène R349 de Mimivirus.

On comprend que les dites séquences flanquantes sont tirées de la séquence de 28 nucléotides (SEQ.ID. N 24) incluant la dite séquence répétée de 15 nucléotides du virophage zamilon (SEQ.ID. N 6) dans le gène R349 ou tirées des séquences de 9, 48 et respectivement 63 nucléotides (SEQ. ID. N°26-28) qui séparent les séquences répétées du virophage zamilon dans le gène R349, ou une séquence flanquante en 3' de la dernière séquence spécifique répétée en 3' de 15 nucléotides du virophage zamilon dans le gène R349.

Plus particulièrement, ladite séquence d'affinité comprend le gène R349 modifié dans lequel seules les 4 séquences répétées de 15 nucléotides du virophage zamilon sont remplacées aux mêmes localisations par les dites 4 mêmes séquences complémentaires d'une
5 dite séquence spécifique de la dite séquence cible.

Un tel gène R349 modifié est illustré par la séquence SEQ.ID N° 7 incluant une séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de résistance à la tétracycline de la séquence SEQ.ID N°23.

Plus particulièrement encore, ladite séquence d'affinité est
10 intégrée dans un vecteur de clonage de la dite séquence d'affinité apte à transformer ou transfecter une dite cellule hôte et y répliquer la dite séquence d'affinité.

Plus particulièrement encore, ladite séquence d'affinité est intégrée sous forme d'ADN placée sous le contrôle d'un promoteur de
15 transcription apte à transcrire la dite séquence d'affinité d'ADN en ARN dans la dite cellule hôte.

Plus particulièrement encore, ladite cellule hôte est une bactérie ou une cellule eucaryote.

Plus particulièrement encore, ledit premier composant comprend
20 un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique R350 et/ou R354 codant pour et apte à exprimer respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354 dans une dite cellule hôte.

Plus particulièrement, les séquences d'acides nucléiques codant pour les protéines R350 et/ou R354 sont intégrés dans un plasmide,
25 sous le contrôle d'un promoteur d'expression, par exemple le promoteur T7 pour une bactérie et le promoteur CMV pour une cellule eucaryote, et encadrés des séquences de localisation nucléaire (NLS) afin d'adresser les protéines dans le noyau de la cellule eucaryote le cas échéant.

Plus particulièrement encore, les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans un même dit vecteur, de préférence un plasmide.

Selon la présente invention, on a en particulier découvert que la
5 protéine R350 n'est pas une simple hélicase mais présente une activité d'endonucléase spécifique qui coupe spécifiquement les dites séquences spécifiques répétées au sein de la séquence cible de la cellule hôte.

Dans un mode préféré de réalisation, la présente invention fournit une méthode pour au moins couper en un site spécifique la dite
10 séquence cible, caractérisé en ce que le dit premier composant comprend au moins la protéine R350 ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique du gène R350 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350.

Plus particulièrement, la présente invention fournit une méthode
15 pour au moins couper en un site spécifique et dégrader au moins partiellement la dite séquence cible, caractérisé en ce que le dit premier composant comprend au moins la protéine R350 et la protéine R354 ou au moins un vecteur d'expression d'au moins des séquences d'acides nucléiques des gènes R350 et R354 codant pour respectivement au
20 moins les dites protéines R350 et R354.

Plus particulièrement encore, les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans un même dit vecteur comprenant les séquences de Mimivirus de lignée A incluant :

- au moins une partie modifiée du gène R349, de préférence le
25 gène R349 modifié complet, ladite partie modifiée du gène R349 incluant une partie du gène 349 incluant au moins une des 4 séquences répétées de 15 nucléotides du virophage zamilon du gène R349, de préférence les 4 séquences répétées, la dite modification de la dite partie modifiée du gène R349 consistant en ce que la (ou les) dite(s)
30 séquence(s) répétée(s) de 15 nucléotides du virophage zamilon du gène

R349 est (ou sont) remplacée(s) par une même dite séquence complémentaire d'une séquence spécifique de la dite séquence cible, et

- une séquence permettant la transcription en ARN dans une dite cellule hôte de ladite partie modifiée du gène R349, de préférence du
5 gène R349 modifié complet, et

- les gènes R350 et 354, ainsi que des séquences permettant l'expression des gènes R350 et R354 dans une dite cellule hôte.

Plus particulièrement encore, pour une cellule hôte de bactérie, les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans un même
10 dit vecteur comprenant les séquences de Mimivirus de lignée A incluant l'une des séquences SEQ.ID.N°22 ou SEQ.ID.N°25 dans laquelle la séquence répétée 4 fois spécifique du gène de résistance à la tétracycline SEQ.ID.N°23 est remplacée par une dite séquence
complémentaire d'une séquence spécifique de 15 nucléotides de la
15 séquence cible.

Plus particulièrement encore, pour une cellule hôte de bactérie, les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans un même dit vecteur comprenant les séquences de Mimivirus de lignée A incluant l'une des séquences SEQ.ID.N°37 ou SEQ.ID.N°40 dans laquelle la
20 séquence répétée 4 fois spécifique du gène de résistance à la tétracycline SEQ.ID.N°39 est remplacée par une dite séquence complémentaire d'une séquence spécifique de 15 nucléotides de la séquence cible.

La présente invention fournit aussi un système biologique utile
25 pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention de modification par coupure et/ou dégradation totale ou partielle d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte comprenant la mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo*, tel que définie ci-dessus comprenant :

- un premier composant comprenant au moins une protéine choisie parmi les protéines R350 et R354 de virus géant Mimivirus de lignée A ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique de(s) gène(s) R350 et/ou R354 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354, et

- un deuxième composant comprenant une séquence d'acide nucléique, dénommée séquence d'affinité, la dite séquence d'affinité comprenant au moins une séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible, la dite séquence spécifique de ladite séquence cible comprenant au moins 10 nucléotides, de préférence 15 nucléotides, de préférence la ou chaque dite séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible étant flanquée en 3' et 5' de séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le gène R349 de virus géant Mimivirus.

Plus particulièrement, la dite ou chaque dite séquence complémentaire de la même dite séquence spécifique de la séquence d'affinité est flanquée en 3' et 5' de séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le gène R349 de virus géant Mimivirus.

Le système biologique selon la présente invention comprend évidemment l'ensemble des caractéristiques énoncées en amont pour ledit système lors de la description de la méthode selon l'invention.

La présente invention couvre également des dites méthodes et systèmes biologiques selon l'invention mis en œuvre avec des dites séquences d'acides ou de protéines qui sont homologues voire orthologues à celles des dites séquences, et/ou présentant des similarités notamment avec au moins 90% d'identité de dites séquences.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront mieux à la lecture de la description qui va suivre, faite de

manière illustrative et non limitative, en référence aux dessins annexés sur lesquels :

Les figures 1A-1B et 2A-2B représentent des gels d'électrophorèse d'agarose de diverses séquences d'acides nucléiques en présence ou non
5 des protéines R350 et/ou R354.

La figure 3 est un schéma du mode d'action hypothétique de l'hélicase R350 et la nucléase R354.

La figure 4 représente un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (15%) montrant l'effet de l'ARN.

10 La figure 5 est un schéma illustrant le mode d'action de l'ARN sur la réplication de l'ADN en présence d'ADN polymérase.

La figure 6 montre les constructions des plasmides PP20 et PP21 d'expression des protéines R350 et R354.

15 Les figures 7A-7B représentent des gels SDS-PAGE et analyse par Western-blot des protéines extraites des cellules eucaryotes transfectées ou non par les plasmides PP20 et/ou PP21 sur une membrane de nitrocellulose hybridée avec un anticorps anti-FLAG.

20 La figure 8A représente le vecteur PP14 comprenant la séquence SEQ.ID.N°25 incluant le système Mimivire modifié de la séquence SEQ.ID. N°22 comprenant une séquence dirigée contre le gène de résistance à la tétracycline de la séquence SEQ.ID.N°23.

La figure 8B représente le vecteur pACYC184 portant une séquence spécifique du gène de résistance à la tétracycline (SEQ.ID.N°23).

25 Les figures 9 à 11 et 13 montrent des résultats comparatifs de culture de bactéries avec abolition de la résistance à la tétracycline pour les bactéries transformées par le vecteur PP14.

La figure 12 montre les résultats de l'action du système Mimivire testée à l'aide d'une amplification (PCR) du gène de résistance à la tétracycline à partir de la culture bactérienne.

Les figures 14 et 15 montrent des résultats comparatifs de culture de bactéries avec abolition de la résistance à la tétracycline pour les bactéries transformées par le vecteur PP37.

La figure 16 montre des résultats comparatifs relatifs à la capacité du système Mimivire à abolir la résistance des bactéries à la tétracycline pour les bactéries transformées par le vecteur PP37, en milieu liquide.

La figure 17 montre les résultats mettant en évidence que l'action du système Mimivire n'est pas due à l'expression de protéines létales mais à l'abolition du gène de la résistance à la tétracycline.

Les résultats des exemples d'expériences réalisées sont rapportés ci-après (paragraphe I.A, I.B, I.C) et les matériels et méthodes sont explicités en fin de description (Paragraphe II). Un listage de séquences reprend des séquences SEQ.ID.N°1 à 40 mentionnées ci-après.

On a réalisé ci-après deux séries d'expériences. La première série d'expériences (I.A) vise à expliciter la compréhension du mécanisme d'action du système Mimivire. La deuxième série d'expériences (I.B, I.C) vise à confirmer les résultats mis en évidence précédemment en utilisant le système MIMIVIRE pour modifier un gène rapporteur dans des cellules eucaryotes (I.B) en réalisant l'inactivation d'un gène rapporteur qui sera facilement identifiable, pour modifier une séquence spécifique du gène de résistance à la tétracycline dans un système procaryote (*E.coli*) (I.C.1), pour vérifier la capacité du système Mimivire à abolir la résistance des bactéries à la tétracycline en milieu liquide (I.C.2), pour vérifier si la mort d'un système procaryote (*E.coli*) en présence de tétracycline est due à la modification d'une séquence spécifique du gène de résistance à la tétracycline dans ledit système par le système Mimivire (I.C.3) sans médiation protéique.

I.A) Première série d'expériences vise à expliciter la compréhension du mécanisme d'action du système Mimivire.

1) On a utilisé les 2 protéines recombinantes R354 (Nucléase) et R350 (Hélicase) sur différents substrats nucléiques notamment (a) l'ORF4 du virophage zamilon de 594 nucléotides (produit amplifié par les amorces SEQ. ID. N° 12 et 13 du tableau 1 ci-après) qui porte la séquence répétée de 15 nucléotides du virophage zamilon (SEQ. ID. N°6) ainsi que (b) le gène R349 (SEQ. ID. N°5), tous 2 obtenus par PCR avec les amorces de séquences SEQ.ID.N° 10 à 13 du tableau 1).

Les figures 1A et 1B représentent des gels d'électrophorèse d'agarose (1%) de séquences d'ADN des gènes amplifiés par PCR de la séquence ORF4 de zamilon (fig.1A) et du gène R349 de Mimivire (fig.1B) traités avec une protéine R354 (N), une protéine R350 (N), les deux protéines (N+H) et un contrôle sans protéine (C).

Seule une activité exonucléasique de la protéine R354 a été observée avec dégradation totale non spécifique de l'ADN (Figures 1A et 1B).

2) On a recherché si l'action du système Mimivire impliquerait l'assistance de l'ARN correspondant à la séquence répétée, qui formerait ainsi un hétéroduplexe avec le simple brin de l'ORF4 notamment lors de la réplication de l'ADN du virophage et provoquerait ainsi l'arrêt de la réplication de l'ADN virophage.

Pour ce faire, on a réalisé des tests *in vitro* utilisant une matrice d'ADN synthétique correspondant à (a) une zone de 130 nucléotides de l'ORF4 de zamilon incluant la séquence répétée (séquence sens ou « forward » SEQ. ID. N° 8 et séquence anti-sens ou « reverse » SEQ. ID. N° 9) et (b) un ARN de 15 nucléotides correspondant la séquence répétée (séquence sens ou « forward » SEQ. ID. N° 18 et séquence anti-sens ou « reverse » SEQ. ID. N° 19). Après hybridation, l'action de la nucléase R354, hélicase R350 ou nucléase + hélicase a été testée.

La figure 2A représente des gels d'électrophorèse de polyacrylamide (15%) de séquences d'acides nucléiques comprenant l'ADN simple brin du gène ORF4 de zamilon et une séquence d'ARN de 15 nucléotides complémentaires à la séquence répétées du virophage zamilon, avec une protéine R354 (N), une protéine R350 (N), les deux protéines (N+H) et un contrôle sans protéine (C).

La figure 2B représente des gels d'électrophorèse de polyacrylamide (15%) de séquences d'acides nucléiques comprenant l'ADN double brin du gène ORF4 de zamilon et une séquence d'ARN de 15 nucléotides complémentaires à la séquence répétées du virophage zamilon, avec une protéine R354 (colonnes N), une protéine R350 (N), les deux protéines (N+H) et un contrôle sans protéine (C).

Le résultat montre de façon surprenante que l'hélicase coupe au niveau du l'hétéroduplexe alors que la nucléase dégrade totalement la matrice ADN (Figure 2A). Parallèlement, aucune action des deux protéines n'a été observée sur le double brin (Figure 2B).

Ces résultats suggèrent que la protéine codée par le gène R350 a une fonction d'endonucléase contrairement aux prédictions bioinformatique (hélicase). Afin de déterminer le site de coupure de manière exacte, les fragments issus de cette digestion ont été séquencés. Le séquençage nous a permis de situer entre la 8ième et 9ième nucléotide de la séquence répétée le site de coupure (TGATAATGvAATCTGA).

Ceci suggère que son action n'intervient que sur l'hétéroduplexe ADN/ARN retrouvé notamment lors de la réplication de l'ADN. Le mécanisme de résistance de Mimivirus envers zamilon pourrait s'opérer à travers l'introduction de cette coupure au niveau de l'ORF4 de zamilon par la protéine codée par le gène R350 suivie par la dégradation par la nucléase R354 comme illustré sur le schéma de la figure 3 sur laquelle l'ARN est référencé par A, la protéine R350 par B, et la protéine R354 par C.

La figure 3 illustre le mode d'action de l'hélicase et la nucléase sur l'ORF4 de zamilon *in vivo*.

De plus, on a observé que la présence de cet ARN de séquence répétée bloque la polymérisation d'une zone de l'ORF4 de zamilon incluant la séquence répétée et génère des formes tronquées (Figure 4). On peut donc en inférer qu'à l'échelle de la réplication de zamilon, la réplication est stoppée comme illustré dans la figure 5 au niveau de l'ORF4.

La Figure 4 représente un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (15%) montrant l'effet de l'ARN de séquence complémentaire (SEQ. ID. N° 18 et 19) à l'unité de séquence répétée sur la réplication d'un oligonucléotide de 130 bases (SEQ. ID. N° 8 et 9) correspondant la séquence de l'ORF4. On a réalisé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (15 % PAGE) d'un ADN synthétique (sens (SEQ. ID. N° 8) ou anti-sens (SEQ. ID. N° 9) utilisé comme matrice par l'ADN polymérase ADN dépendante (Klenow) après une hybridation préalable avec un ARN complémentaire correspondant à l'unité de séquence répétée (SEQ. ID. N° 18 et 19). Les contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions en absence de Klenow (C= sans Klenow) ou d'ARN (+ = avec ARN ou - = sans ARN).

La figure 5 est un schéma illustrant le mode d'action de l'ARN complémentaire à l'unité de séquence répétée (1) sur la réplication de l'ADN (2) en présence d'ADN polymérase (3) montrant l'importance cruciale de cet ARN dans le processus d'action du système Mimivire.

I.B) Utilisation du système MIMIVIRE dans des cellules eucaryotes.

On a cherché à confirmer les résultats précédemment mis en évidence en utilisant le système MIMIVIRE dans un système eucaryote en effectuant l'inactivation d'un gène rapporteur facilement identifiable.

On a choisi d'inactiver le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) dans la lignée de cellules humaines HEK293. Dans un premier temps, on a cloné respectivement les gènes R350 et R354 étiquetés FLAG et flanqués des séquences NLS dans les plasmides pcDNA3.1/Hygro ou pcDNA3.1/Zeo comme illustré dans la figure 6.

La figure 6 montre les constructions des plasmides de transfection PP20 et PP21 utilisées dans cette étude pour valider le système MIMIVIRE dans lesquels les gènes MIMI_R354 (nucléase) et MIMI_R350 (hélicase) sont sous le contrôle du promoteur CMV et encadrés des séquences de localisation nucléaire (NLS) afin d'adresser l'hélicase et la nucléase dans le noyau de la cellule.

On a transfecté les cellules 293GFP avec ces plasmides afin d'établir une nouvelle lignée de cellules HEK293 GFP qui exprime les protéines R350 et R354. L'expression de la nucléase et de l'hélicase a été confirmée par Western Blot avec un anticorps monoclonal anti-FLAG (figures 7A-7B). Cet anticorps anti-FLAG reconnaît les bandes à 101.6 KDa pour l'hélicase et 70.8 KDa pour la nucléase.

Les Figures 7A-7B représentent des gels SDS-PAGE et analyse par Western-blot des protéines extraites des cellules 293GFP. On a réalisé des électrophorèses sur gel 10% SDS-PAGE de 50 µg d'un extrait protéique provenant des cellules 293GFP transfectées ou non par les plasmides PP20 et/ou PP21 (Fig.7A) sur une membrane de nitrocellulose hybridée avec un anticorps anti-FLAG au 1:1000 (Fig.7B). Les tailles sont indiquées à gauche en KDa.

Dans un second temps, on a fait synthétiser un ARN de 45 nucléotides (séquences sens et antisens SEQ.ID.N°20-21, tableau 1) comprenant 2 unités de séquence spécifique répétées de 15 nucléotides provenant de la GFP (séquences sens et antisens SEQ.ID.N°29-30, tableau 1) et encadrée de la même séquence que l'on peut trouver dans le gène R349 de Mimivirus (tableau 1, séquences sens SEQ.ID.N°20 incluant la séquence SEQ.ID. N°29 et séquences antisens SEQ.ID.N°21

incluant la séquence SEQ.ID. N°30). Cette séquence 15 nucléotides est une partie du guide ARN utilisé pour inactiver le gène de la GFP avec le système CRISPR/Cas9 tel que décrit dans l'article Science. 2014 Jan 3;343:84-87.

- 5 On a transfecté cet ARN dans les cellules HEK293 GFP qui expriment les gènes R350 et R354. La lecture de ces expérimentations a permis de suivre l'extinction relative de la fluorescence de la GFP par FACS.

10 I.C) Utilisation du système MIMIVIRE dans des cellules procaryotes.

I.C.1. Modification d'une séquence spécifique du gène de résistance à la tétracycline chez la bactérie E.coli

On a vectorisé le système dans un vecteur d'expression PP14 (SEQ. ID. N°25) pour procaryote sous contrôle du promoteur T7 inductible par l'IPTG. La séquence du gène R349 a été modifiée (SEQ. ID. N°7) afin d'agir contre le gène de la résistance à la tétracycline en remplaçant les 15 nucléotides de la séquence répétée de zamilon par 15 nucléotides spécifique du gène de résistance à la tétracycline (SEQ. ID. N°23 : CACCCTGGATGCTGT). Les gènes R350 et R354 ont été ajoutés à la suite du R349 et sont organisés en opéron sous contrôle du promoteur inductible T7 (annexe 1, SEQ. ID. N°22).

Les figures 8A-8B représentent le vecteur Mimivire (PP14-figure 8A) portant la séquence SEQ. ID. N°25 incluant la séquence SEQ.ID.N°22 avec le gène R349 modifié (SEQ. ID. N°7) par une séquence dirigée contre le gène de résistance à la tétracycline (SEQ. ID. N°23) ainsi que des gènes R350 (SEQ. ID. N°3) et R354 (SEQ. ID. N°4) sous la commande d'un même promoteur T7 (SEQ. ID. N°31) avec une organisation en « opéron » à l'aide de séquences d'opéron Lac (SEQ. ID. N°32), séquence de Shine-Dalgarno et terminateur T7 (SEQ. ID. N°33).

Le vecteur PP14 dans lequel sont clonés les gènes R349, R350 et R354 fait partie de la famille des vecteurs pET qui sont des vecteurs d'expression chez les bactéries. Ces vecteurs embarquent entre autres, un promoteur T7 inductible c'est-à-dire que l'expression ne se fait qu'en
5 présence d'un certain composé dans le milieu de culture à savoir l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Ce vecteur permet de synthétiser de manière constitutive une protéine appelée lacI qui se fixe sur la séquence Lac operator et ainsi bloque la transcription du gène cloné en aval du promoteur T7 du fait que la T7 ARN polymérase fixée
10 au préalable sur le promoteur T7 ne peut pas transcrire le gène à cause de l'encombrement stérique que lui crée la présence de la protéine lacI. Néanmoins, en présence d'IPTG, la protéine lacI se complexe avec cette molécule IPTG entraînant un changement de conformation de la protéine lacI la rendant incapable de se fixer sur la séquence lac operator, ce qui
15 permet à la T7 RNA polymérase de transcrire le gène cloné en aval du promoteur T7. Et, le terminateur T7 stoppe la T7 RNA polymérase à la fin de la transcription.

La séquence Shine-Dalgarno est reconnue par le ribosome de la bactérie. Chez les bactéries il est possible de faire traduire un ARN
20 messenger dit « polycistronique » c'est-à-dire qui contient la transcription de plusieurs gènes à la suite selon une organisation en « opéron ». Pour ce faire, chaque partie de l'ARN messenger qui contient la transcription d'un gène doit être précédée d'une séquence Shine-Dalgarno reconnue par le ribosome qui pourra donc se fixer dessus et
25 initier la traduction de l'ARN messenger.

En présence de l'IPTG dans le milieu, on réalise la transcription en ARN du R349 modifié qui embarque les 4 unités repeat correspondant à la tétracycline d'une part et d'autre part, on réalise la transcription d'un autre ARN messenger qui embarque les gènes R350 (hélicase) et R354
30 (nucléase). Les 2 transcriptions sont indépendantes l'une de l'autre.

Ce vecteur PP14 est ensuite transféré par électroporation dans des bactéries *E.coli* BL21 préalablement transformées par le vecteur

pACYC184 (figure 8B) permettant l'expression du gène de la résistance à la tétracycline. Les bactéries sont établies selon différentes dilutions sur boîte LB/agar contenant soit Ampiciline/Tétracycline/IPTG (50µg/ml ; 12µg/ml ; 0.1mM respectivement) soit Ampiciline/IPTG (50µg/ml ; 1mM respectivement).

Les figures 9 à 11 et 13 montrent des résultats comparatifs de culture de bactéries avec abolition de la résistance à la tétracycline pour les bactéries transformées par le vecteur PP14.

La Figure 9 montre les résultats de la première expérience. Sur les boîtes Amp/IPTG on dénombre (de gauche à droite) 16 ; 3 et 48 bactéries pour des dilutions étalées correspondantes respectivement au 1/10 ; 1/50 ; et au reste de la transformation. Sur les boîtes Amp/Tet/IPTG, on dénombre respectivement 0 ; 0 et 8 bactéries.

La Figure 10 montre les résultats de la seconde expérience. Sur les boîtes Amp/IPTG on dénombre (de gauche à droite) 5 et 28 bactéries pour des dilutions étalées correspondantes respectivement au 1/5 et au reste de la culture. Volume de départ de 1ml. Sur les boîtes Amp/Tet/IPTG, on dénombre respectivement 9 et 4 bactéries. Ces résultats montrent que le système Mimivire permet bien d'abolir la résistance à la tétracycline. Ces résultats ont été confirmés par d'autres expériences assurant de la présence ou l'absence du vecteur conférant la résistance à la tétracycline.

Dans un premier temps, on a testé l'induction de l'expression des gènes du système Mimivire par l'IPTG sur la croissance d'E. coli BL21-DE3 doublement transformée (pACYC184 et PP14).

La Figure 11 montre l'effet de l'induction du système Mimivire : Les bactéries contenant le vecteur pACYC184 sont électroporées avec le vecteur PP14 contenant le système Mimivire et étalées à volume égal sur des boîtes LB/Agar Ampicilline/Tétracycline +ou- IPTG.

Sur la figure 11, on voit clairement que l'induction de l'expression des gènes du système Mimivire se traduit par la diminution drastique du nombre de colonies quel que soit l'antibiotique.

Suite à ces résultats, on a voulu caractériser des clones
5 bactériens doublement transformés du système Mimivire. Pour ce faire, on a mis en culture les clones bactériens issus des boîtes LB/Agar Ampicilline/Tétracycline sans IPTG, en milieu Ampicilline +IPTG dans le but d'activer le système Mimivire et en parallèle, les mêmes clones sont mis en culture en milieu Ampicilline sans IPTG comme contrôle négatif.
10 L'action du système Mimivire est testée à l'aide d'une amplification (PCR) du gène de résistance à la Tétracycline à partir de la culture bactérienne. Dans l'hypothèse d'une action du système Mimivire, cette amplification devrait être impossible.

Un test de l'action du système Mimivire par PCR a été réalisé à
15 partir de la culture bactérienne de 10 clones issus de la boîte LB/Agar Ampicilline/Tétracycline et poussé 16h en Ampicilline seul ou Ampicilline + IPTG.

Le résultat de la PCR montre l'amplification d'un fragment de 1.3 kb correspondant au gène de résistance de la tétracycline.

20 Dans les conditions expérimentales utilisées pour l'amplification du gène de résistance à la tétracycline, ce résultat ne permet pas de visualiser une absence totale ou partielle du vecteur pACYC184 portant le gène de résistance à la Tétracycline. Une faible présence de vecteur intact peut engendrer un fragment lors de l'amplification et expliquer
25 ainsi les résultats obtenus dans la figure 12. Une amplification en temps réel (qPCR) a permis une meilleure interprétation de l'action du système Mimivire.

Il est à noter que sur les 10 clones, 2 seulement ont poussé en milieu Ampicilline/IPTG (clone 7 et 10) alors que les 10 clones ont
30 poussé en milieu Ampicilline seul. Ce dernier résultat montre

majoritairement que l'induction du système Mimivire à un effet sur la pousse des bactéries tout comme le résultat issu de la figure 11.

La Figure 13 montre l'étalement du clone 7 sur boîte Tétracycline (284 bactéries) avec IPTG et sur boîte Tétracycline (402 bactéries) sans IPTG à une dilution correspondante à 103 CFU théorique.

Le clone 7 répond à l'induction du système Mimivire via l'IPTG car on passe de 346 (boîtes Ampicilline/IPTG) à 284 bactéries (boîtes Tétracycline/IPTG) soit une diminution d'environ 18%, alors que l'on ne montre pas de différence notable sur le contrôle sans IPTG (passage de 393 à 402 bactéries).

L'absence de colonies sur tétracycline confirme une action du système Mimivire sur l'inhibition de la résistance à la Tétracycline.

I.C.2. Etude de la capacité du système Mimivire à abolir la résistance des bactéries à la tétracycline en milieu liquide

Des bactéries *E.coli* ont été transformées avec le plasmide pACYC184 contenant le gène de résistance à la tétracycline (SEQ. ID. N°35).

Le vecteur Mimivire PP37 porte la séquence SEQ. ID. N°40 incluant la séquence SEQ.ID.N°37 avec le gène R349 modifié (SEQ. ID. N°38) par une séquence dirigée contre le gène de résistance à la tétracycline (SEQ. ID. N°39) ainsi que des gènes R350 (SEQ. ID. N°3) et R354 (SEQ. ID. N°4) sous la commande d'un même promoteur T7 (SEQ. ID. N°31) inductible par l'IPTG, avec une organisation en « opéron » à l'aide de séquences d'opéron Lac (SEQ. ID. N°32), séquence de Shine-Dalgarno et terminateur T7 (SEQ. ID. N°33).

Le vecteur PP37Vector (SEQ ID n° 40) dans lequel sont clonés les gènes R349, R350 et R354 fait partie de la famille des vecteurs pET qui sont des vecteurs d'expression chez les bactéries. Ces vecteurs embarquent entres autres, un promoteur T7 inductible c'est-à-dire que

l'expression ne se fait qu'en présence d'un certain composé dans le milieu de culture à savoir l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Ce vecteur est le même que celui du vecteur PP14 mais avec les 15 nucléotides spécifiques du gène de résistance à la tétracycline correspondant à la SEQ. ID. N°39 : CGGCTCTTACCAGCC.

Les bactéries E.coli BL21 préalablement transformées avec le plasmide pACYC184 ont été transformées avec le vecteur PP37Vector. Les bactéries ont été étalées sur des boîtes contenant 100 mg/L d'ampicilline et 12 mg/L de tétracycline supplémenté ou non avec 1mM d'IPTG.

La Figure 14 montre les résultats de la première expérience. Sur les boîtes Amp/Tet on dénombre (de gauche à droite) 1597 et 259 bactéries pour des dilutions étalées correspondant respectivement au 1/1 et 1/10. On constate que sur les boîtes Amp/Tet/IPTG, on n'obtient aucune bactérie.

La Figure 15 montre les résultats de la seconde expérience. Sur les boîtes Amp/Tet on dénombre (de gauche à droite) 562 et 60 bactéries pour des dilutions étalées correspondant respectivement au 1/1 et 1/10. Volume de départ de 1ml. On constate que sur les boîtes Amp/Tet/IPTG, on n'obtient aucune bactérie.

Les résultats obtenus (figure 14 et 15) montrent l'absence de colonies sur l'agar contenant de la tétracycline en présence d'IPTG qui induit l'expression des protéines du système Mimivire. Ces résultats mettent en évidence la capacité du système Mimivire à abolir la résistance des bactéries à la tétracycline causant la mort des bactéries.

L'induction du système MIMIVIRE a été testée dans un milieu liquide. Pour ce faire, deux colonies d'*Escherichia coli* présentant les plasmides PP37Vector et pACYC184, ont été sélectionnées sur des boîtes contenant de l'ampicilline (100 mg/L) et de la tétracycline (12 mg/l) et cultivées dans 2 mL de milieu contenant de l'ampicilline (100 ug/L) et (12 ug/mL) à 37°C sous agitation à 200 rpm. Après 2 heures, chaque

culture a été divisée en deux tubes dans lesquels un tube a été
supplémenté avec 1mM d'IPTG pour induire l'expression des protéines
du système Mimivire. A intervalle de temps régulier, 10 µl ont été dilués
dans 1 mL à partir duquel 100 µL ont été étalés sur des boîtes d'agar
5 contenant 100 µg/L d'ampicilline et 12 µg/mL de tétracycline.

Tel que présenté en figure 16, l'induction de l'expression des
protéines du système Mimivire par l'IPTG induit la mort des bactéries 4
heures après induction. On constate en effet que 30 et 20 fois moins de
colonies ont été obtenues pour le clone 1 et le clone 2 respectivement
10 après addition d'IPTG. Ces résultats mettent en évidence la capacité du
système Mimivire à abolir la résistance des bactéries à la tétracycline en
milieu liquide, causant la mort des bactéries.

I.C.3. Vérification de l'implication de protéines médiatrices dans l'activité du système Mimivire

15 Pour exclure l'expression de protéines létales par le système
Mimivire dans les bactéries *E.coli*, leur viabilité a été testée sur
différents milieux. Pour ce faire, 4 colonies d'*E.coli* présentant les
plasmides PP37Vector et pACYC184 ont été collectées et cultivées dans
1mL de milieu contenant de l'ampicilline et de la tétracycline à 37°C
20 sous agitation à 200 rpm. Après deux heures, chaque culture a été
supplémentée avec 1 mM d'IPTG pour induire l'expression des protéines
du système Mimivire. Après 4 heures, 10 µL ont été dilués dans 1 mL,
puis 100 µL ont été étalés sur des boîtes d'agar contenant de
l'ampicilline et de la tétracycline ou contenant de l'ampicilline mais pas
25 de tétracycline.

Les résultats présentés en figure 17 confirment que la mort des
bactéries n'est pas due à l'expression de protéines létales mais à
l'abolition de la résistance à la tétracycline. Ces résultats permettent de
prouver que l'activité Mimivire peut être transférée dans *E.coli* pour agir
30 contre un gène cible en incluant 15 séquences spécifiques répétées de
nucléotides de ladite séquence. La substitution de 15 nucléotides de la

séquence Zamilon par 15 nucléotides spécifiques du gène de résistance à la tétracycline n'a pas créé de protéine abortive. Seuls les acides aminés codant pour la séquence répétée DNES du Zamilon ayant été mutés. Ces résultats excluent la possibilité que le système Mimivire soit
5 médié par des interactions protéiques.

II) Matériels et Méthodes

1) Traitement enzymatique

Les réactions enzymatiques ont été effectuées en incubant chaque produit de PCR, de transcription in vitro (IVT) ou d'amorce avec la
10 nucléase (R354), l'hélicase (R350) ou les deux enzymes. Les réactions enzymatiques ont été conduites dans du tampon CutSmart® (Ref: B7204S) de New England Biolabs (acétate de potassium 50 mM, acétate de trisium 20 mM, acétate de magnésium 10 mM, 100 ug ml⁻¹ de BSA, pH 7,9) à 32° C pendant 2 heures, en utilisant une concentration de
15 protéine de 0,5 mg.ml⁻¹ pour chaque enzyme. Après incubation, toutes les réactions ont été traitées par la protéinase K pour éviter que l'ADN ou l'ARN ne se répande dans les puits des gels. Après incubation, les produits des réactions enzymatiques ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) ou de PolyAcrylamide
20 dénaturant (dPAGE) à 15%. Les contrôles ont été effectués avec les mêmes conditions, en absence de l'enzyme R354 ou R350.

2) Conditions de cultures.

2.1) Dans des cellules eucaryotes :

Les amibes *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010) ont été
25 ensemencées à 5 x 10⁶ dans le milieu salin amibien (PAS) de Page comme décrit précédemment (7). La lignée HEK293 GFP (cellules humaine de rein embryonnaire, Clinisciences) a été cultivée à 37°C dans un incubateur à CO₂ à 5% dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) additionné de 10% de FBS (Gibco), GlutaMAX 2 mM (Life

Technologies), 100 U / ml de pénicilline, 100 ug / ml. Streptomycine et 100 pg / ml d'acide aminé non essentiel.

2.2) Dans des cellules procaryotes :

Les bactéries *Escherichia Coli* One Shot™ BL21 (DE3) chimiquement compétente (Thermo Fischer, Réf: C600003) ont été cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB) avec un antibiotique approprié. Les bactéries ont été étalées sur LB-agar avec un antibiotique approprié (12µg / ml pour la tétracycline et 50µg / ml pour l'ampicilline). Le système Mimivire a été induit par l'ajout de 0,2 µM d'isopropyl β-D-1-thigalactopyranoside (IPTG) sur des plaques de LB-agar.

3) Test d'infection et de transfection.

Les amibes *A. Castellanii* ont été infectées ou co-infectées respectivement avec Mimivirus ou Mimivirus et le virophage zamilon en utilisant une MOI de 10. Les cellules ont ensuite été incubées à 32 ° C et à des points réguliers post-infection, les cellules ont été recueillies pour l'extraction d'ARN avec le Kit d'isolation mirRena™ miRNA (Ambion). Les cellules 293GFP ont étéensemencées sur des plaques 6 puits (Corning) 48 h avant la transfection à une densité de 300 000 cellules/puits. Les cellules ont été transfectées à 80-90% de confluence en utilisant la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Un total de 4 ug de PP20vector/PP21vector (hébergeant respectivement la séquence NLS-R350-NLS et NLS-R354-NLS) ont été utilisés pour la transfection. MIMI_R354 (Nucléase) et MIMI_R350 (Hélicase) sont marqués par 3 séquences FLAG à l'extrémité N-terminale (3xDYKDDDDK) pour confirmer l'expression des protéines correspondantes par des expériences de Western Blot avec un anticorps monoclonal anti-FLAG (Clone M2, Sigma). Le lendemain, ces cellules sontensemencées dans une flask T75. Une sélection avec de l'hygromycine (100 ug / ml) et de la zéocine (100 ug / ml) a été appliquée au jour 3 après la transfection.

Ces cellules ont été cultivées dans ces conditions pendant 3 semaines afin d'isoler des cellules doublement transfectée stables (lignée 293GFP [PP20 / PP21]).

4) Test de transformation.

5 Les plasmides utilisés dans ces expériences sont le PP14 synthétisé par Genscript hébergeant une expression inducible du système Mimivire sous le contrôle du promoteur T7 (voir l'annexe 1 et la figure 8 A), le vecteur PP37 hébergeant une expression inducible du système Mimivire sous le contrôle du promoteur T7 (voir l'annexe 2), et
10 le vecteur pACYC184 (société Mo Bi Tec Ref: V32402). Les bactéries *Escherichia Coli* One Shot™ BL21 (DE3) a été transformé par le plasmide pACYC184 selon le protocole et les instructions du fabricant. Les bactéries ont été étalées sur une plaque de LB-agar tétracycline (Tet) (jour 1). Le lendemain, un clone a été prélevé et cultivé dans 10 ml de
15 milieu LB sélectif Tet pendant une nuit à 37° C sous agitation à 200 tr/min. Au jour 3, 200 µl de la culture ont été inoculés dans 20 ml de milieu LB+Tet frais jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0,7. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 7000 tr / min pendant 1 minute à 4° C et lavées trois fois avec du glycérol 10%. Après la
20 première centrifugation, toutes les étapes ont été réalisées sur glace et en chambre froide. Les bactéries ont été remises en suspension dans 50 µl de glycérol 10% et 200 ng de vecteur PP14 ont été ajoutés. Le mélange a été transféré dans une cuvette Gene Pulser® avec un espace de 0,1 cm (Bio-Rad, Réf 165-2089) et une impulsion électrique a été
25 produite avec le MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, Réf: 165-2100) en utilisant le programme Ec1. Le temps d'électroporation indiqué par le dispositif après l'impulsion était de 5,8 ms. Après électroporation, 1 ml de LB a été ajouté immédiatement et incubé pendant 1 heure à 37° C sous agitation à 200 tr/min. Plusieurs dilutions ont été étalées sur des
30 plaques de LB-agar sélectif Tet / Amp/IPTG ou Amp/IPTG et incubées pendant une nuit à 37° C. Le lendemain, les colonies ont été comptées.

5) Clonage, expression et purification.

Les séquences des gènes codant pour la protéine R350 et R354 de Mimivirus ont été optimisées pour maximiser l'expression dans *E.coli* et synthétisé par GenScript. La protéine R354 inclut une étiquette polyhistidine (SEQ.ID.N°34) à l'extrémité C-terminale. La séquence du R349 reste inchangée à l'exception de l'unité repeat de 15 nucléotides qui correspond à une séquence de la tétracycline (SEQ.ID. N°7 incluant SEQ.ID. N°23 répétée 4 fois ou SEQ.ID. N°38 incluant SEQ. ID. N°39 répétée 4 fois). Ces gènes ont été inséré entre les sites de coupure XbaI et XhoI du plasmide pET22b (+) (annexe 1, SEQ.ID. N°22).

Les protéines recombinantes ont été exprimées dans *E. coli* BL21 (DE3) -pGro7 / GroEL (TaKaRa) en utilisant un milieu ZYP-5052. Chaque culture a été cultivée à 37° C jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm de 0,8 suivie de l'addition de L-arabinose (0,2% m / v) et d'une induction avec une transition de température à 18° C pendant 20 h. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (5 000 g, 30 min, 4° C) et les culots résultants ont été remis en suspension dans du tampon de charge (20 mM MES pH 6,0) et conservés à -80° C pendant une nuit. Les cellules congelées ont été décongelées et incubées sur de la glace pendant 1 h après addition de lysozyme et de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) à des concentrations finales respectives de 0,25 mg ml⁻¹ et 0,1 mM. Les cellules partiellement lysées ont ensuite été perturbées par trois cycles consécutifs de sonication (30 s, amplitude 45) effectués sur un système de sonication Q700 (QSonica). Les débris cellulaires ont été jetés après une étape de centrifugation (11 000 g, 20 min, 4° C).

La protéine recombinante a été purifiée en utilisant une colonne échangeuse de cations à partir de 6 ml de RESOURCE S (GE Healthcare) en utilisant un tampon MES 20 mM pH 6,0 et un gradient linéaire à 0,5 M de NaCl dans 10 volumes de colonne. Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE colorée au bleu de Coomassie (10%) et les activités d'hélicase ont été évaluées sur une électrophorèse sur gel de Polyacrylamide dénaturant comme décrit précédemment (15% de

dPAGE). Les fractions actives (généralant un clivage au niveau de l'unité répétée de 15 nucléotides de zamilon) ont été regroupées et purifiées davantage en utilisant une Chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (tampon de chargement et de lavage: Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, tampon d'élution: Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 250 et 500 mM) sur une colonne de 5 ml d'HisTrap FF brut (GE Healthcare). Les fractions ont été analysées en utilisant SDS-PAGE à 10% (coloration de Coomassie) et évaluées en utilisant l'activité hélicase comme décrit précédemment.

6) Extraction ARN et caractérisation

Les cultures obtenues ont été traitées avec le kit mirVana™ miRNA (Ambion). Des fractions enrichies de petits ARN (<200 nt), ainsi que de l'ARN total ont été obtenus. Les échantillons d'ARN ont été caractérisés en utilisant des puces RNA 6000 Pico Total RNA (Agilent) combinées avec le Bioanalyzer Agilent 2100 ou une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (dPAGE-15% acrylamide) pour les petits ARN.

7) Analyse par Northern Blot

Pour confirmer l'expression et la taille de "l'ARN repeat", des hybridations par Northern Blot ont été effectuées en utilisant 10 ug d'ARN total ou 2 ug de petit ARN. Les échantillons d'ARN ont été dénaturés pendant 5 minutes à 95° C dans un tampon de charge contenant 50% de formamide suivi d'un refroidissement immédiat sur de la glace. Des échantillons d'ARN ont été passés sur des gels de Polyacrylamide dénaturants à 15% d'urée (dPAGE), électroblotés sur des membranes Hybond N + (GE Healthcare) à 20 V pendant 1 heure en utilisant un transfert semi-sec (Hoefer TE 77, GE Healthcare). La membrane est ensuite cross-linked aux UV pendant 2min.

Les sondes (LNA), par ex. 5'-TCA-GAT-TCA-TTA-TCA-G-3' et 5'-CTG-ATA-ATG-AAT-CTG-A-3', avec de la digoxigénine (DIG) aux deux extrémités, ont été achetées auprès d'Eurogentec. La pré-hybridation et l'hybridation ont été réalisées en utilisant un tampon Easy Hybridization

(Roche Applied Science) à 37° C. Après hybridation, les membranes ont été lavées deux fois en utilisant une solution tampon de faible stringence (2X SSC, 0,1% SDS) et une solution tampon de stringence élevée (0,1X SSC, 0,1% SDS), pendant dix minutes à température ambiante et quinze minutes à 60°C, respectivement.

Les membranes ont ensuite été hybridées avec une sonde marquée au DIG comme recommandé par le fabricant (DIG-System, Roche Diagnostics), à l'exception de la détection de la sonde hybridée qui a été réalisée en utilisant un anti-digoxine monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort (Jackson ImmunoResearch, 1: 5000). Après plusieurs lavages, des transferts ont été révélés par des tests de chimioluminescence (ECL, GE Healthcare). Le signal résultant a été détecté sur Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) en utilisant un processeur de film automatisé (Hyperprocessor™, GE Healthcare).

8) Transcription *in vitro*

Toutes les transcriptions *in vitro* ont été réalisées selon les instructions et les recommandations du fabricant (Kit Megashortscript™ de Thermofisher, ref: AM1354). Brièvement, les matrices ADN ont été hybridées avec des amorces incluant les promoteur T7 et opéron lac (SEQ.ID.N°14-15 et 16-17) et mélangées avec le tampon de réaction T7 (1 x), une solution de T7 NTP (7,5 mM), l'enzymes T7 (2 ul pour une réaction de 20 ul) pendant 4 heures à 37° C. Les matrices d'ADN ont été dégradées par TURBO DNase (2 U) pendant 15 minutes à 37° C. Les transcrits d'ARN ont été précipités à l'éthanol. Les culots finaux ont été remis en suspension dans de l'eau exempte de nucléase.

9) PCR avortée

Les matrices ADN ont été incubées avec les ARN complémentaire correspondant à l'unité repeat de zailon de 15 nucléotides (SEQ.ID.N°18-19) ainsi qu'une amorce d'élongation à 95°C pendant 5 minutes puis en les refroidissant progressivement jusqu'à 25°C. Tous les mélanges ont été incubés avec 5 U de Klenow exo-, provenant de

ThermoFisher (réf: EP0422) pendant 1 heure à 37°C. Les contrôles ont été effectués avec les mêmes conditions à sans l'ARN ou Klenow.

10) Purification des ARNs ou ADNs à partir de gel de polyacrylamide

5 La récupération d'acide nucléique à partir de bandes de polyacrylamide excisées à partir de gels a été réalisée par la méthode d'écrasement et de trempage comme décrit précédemment (18).

11) Séquençage des ARN et ADN

10 Les échantillons d'ADN simple brin de 65 nucléotides ont été séquencés sur la technologie MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). L'approche RNAseq a été choisie et les banques ont été construites en utilisant Truseq stranded mRNA strategy et ont été barre-codé avec un autre projet RNAseq.

15 Les échantillons ont été mesurés sur le Nanodrop et le volume maximum de 16,5 µL, compris entre 36 et 160ng, a été impliqué pour synthétiser l'ADN du second brin. La procédure d'ARNm brin Truseq a été suivie à partir de là et toutes les étapes de purifications d'Ampure ont été remplacées par une précipitation alcoolique en raison de la petite taille des fragments d'ADN. Les profils de bibliothèques ont été
20 visualisés par bioanalyseur DNA1000 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) à 71, 78, 130 paire de bases. La concentration finale des banques ont été de 143 et 333 nmol/l pour les 6 échantillons.

25 Les banques ont été normalisées à 2 nM et regroupées. Après une étape de dénaturation et une dilution à 15 pM, le pool a été chargé sur la cartouche de réactif, puis sur l'instrument avec la cellule d'écoulement. La génération automatisée de grappe et l'exécution de séquençage ont été effectuées sur le kit MiSeq Reagent V3 en 150 cycles.

Une information totale de 5 Gb a été obtenue à partir d'une densité de grappe de 1618 K / mm² avec un filtre de contrôle de qualité passant de 85,6% (18 644 000 lectures de paires appariées). Au sein de cette série, les représentations de l'indice ont été déterminées comme étant respectivement de 0,69%, 0,47%, 0,84%, 0,65%, 0,76% à 0,94%. Le minimum de 152 675 au maximum de 302 220 lectures appariées en fonction des échantillons conduit à un nombre global de 1 407 155 lectures appariées qui ont été ajustées puis analysées.

12) Test Mimivire

Les cellules 293GFP [PP20 / PP21] ont étéensemencées sur des plaques à 6 puits à 150000 cellules/puits 24h avant la transfection. Les cellules ont été transfectées en utilisant la lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Un total de 30 pmol d'ARN a été utilisé pour la transfection. Les cellules transfectées ont été analysées par FACS trois jours après la transfection.

13) SDS-PAGE et Western Blot

Les cellules transfectées ou non ont été lysées par sonication dans un tampon de solubilisation (urée 7 M, thiourée 2 M, Tris 30 mM, CHAPS 4% (p / v) et centrifugées à 10 000 g, 20 min, 4 ° C. Les protéines solubles ont été collectées et la concentration a été déterminée en utilisant le Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-rad).

Cinquante microgrammes de protéines solubles ont été fractionnés sur une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% puis révélés par InstantBlue Protein Stain (Expedeon). De plus, des protéines résolues ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-blot Transfer Medium, Biorad, Hercules, CA, USA) à 100 V pendant 1 h en utilisant une unité de transfert semi-sèche (Hoefer TE 77, GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). Les membranes ont ensuite été bloquées dans du PBS additionné de 0,3% de Tween-20 et de 5% de lait écrémé en poudre (PBS-Tween-Milk) pendant 1,5 h et incubées avec des

anticorps anti-FLAG monoclonaux de souris (1: 1000). Les bandes immunoréactives ont été détectées en utilisant une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à de la peroxydase (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) diluée à 1: 5000 dans le tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante. Trois lavages de 15 min ont été appliqués entre chaque étape. Les bandes immunocolorées ont été visualisées avec le kit à base de chimioluminescence, tel que décrit par le fabricant (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). Le signal résultant a été capturé par un système d'imagerie Fusion FX7 (Vilber Lourmat, France).

14) Prédiction de structure secondaire pour l'ARN hébergeant deux séquences répétées de GFP de 15 nucléotides

Les structures secondaires ont été prédites en utilisant le serveur web Mfold. Nous avons conservé la structure secondaire avec l'énergie libre minimale.

15) Digestion sur gel et spectrométrie MALDI-TOF

Les bandes excisées des gels ont été décolorées et soumises à une digestion dans le gel avec de la trypsine (Proteomics grade trypsine, Agilent Technologies, Cedar Creek, TX). Les peptides tryptiques ont ensuite été extraits du gel par des traitements successifs avec de l'eau et de l'acétonitrile (qualité HPLC). Les extraits ont été regroupés et concentrés dans un évaporateur Speedvac. La solution de peptides a ensuite été déposée sur la cible d'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI). Les analyses de masse ont été effectuées sur un spectromètre de vitesse Brüker Autoflex Speed MALDI-temps de vol (MALDI-TOF) (Brüker Daltonique, Wissembourg, France). Les spectres de masse ont été calibrés de manière externe en utilisant des peptides de digestion tryptique de sérum albumine bovine (Brüker). Des listes de masse de peptides tryptiques ont été utilisées pour identifier les protéines, en utilisant le logiciel Mascot (Matrixscience). Les recherches ont été effectuées contre une base de données interne

contenant la séquence étiquetée de MIMI_R350 (Helicase like), y compris une étiquette de polyhistidine à l'extrémité amino-N-terminale.

Tableau 1 :

Gene d'origine	noms	séquences	Expériences
MimiR349	R349_Fwd	SEQ.ID.N°10 : ATGGAATTAATTAGTCGTGTC	PCRMIMI_R349 (SEQ.ID.N°5 de 2895 nt)
	R349_Rev	SEQ.ID.N°11 : TTAATCTTTGAATCCTTGAGC	
Zamilon ORF4	ORF4ZA_Fwd	SEQ.ID.N°12 : ATGTCTGTTCTAGAAAACCT	PCR Zamilon ORF4 (594 nt)
	ORF4ZA_Rev	SEQ.ID.N°13 : TTAAGTTATAATTTTGTATA	
Zamilon ORF4	DNASyntFwd	SEQ.ID.N°8 : ATAGAACAACCAAAAAAATATCAAA ATCTAGAGATGAATCAAGTGAATC AGAAGAATCTGATAATGAATCTGAT AATGAATCCGATGAGGAAGTTGAA TCAGAACTGAGATAGAACCAGTC AAATCTAA	Séquences sens et anti sens de l'ADN synthétique (130 nt) utilisé comme substrat pour des traitements enzymatiques et les expériences de polymérisation avortées
	DNASyntRev	SEQ.ID.N°9 : TTAGATTTGACTGGTTCTATCTCAG TTTCTGATTCAACTTCCTCATCGGA TTCATTATCAGATTCATTATCAGAT TCTTCTGATTCACTTGATTCATCTC TAGATTTTGATATTTTTTTGGTTGT TCTAT	
MimiR349	T7-4repeat Fwd	SEQ.ID.N°14 :TAATACGACTCACT ATAGGGTACTCCCATAAATAATATC AC	Amorces de PCR du

	T7-4repeat Rev	SEQ.ID.N°15 GAGACAAAATTTCA TCTACC	produit sens utilisées comme matrice de transcription in vitro pour obtenir l'ARN MIMI_R349 + (311 nt))
MimiR349	T7-4Rev- repeat Fwd	SEQ.ID.N°16 TAATACGACTCACTA TAGGGAGACAAAATTTTCATCTACC	Amorces de PCR du produit anti sens utilisées comme matrice de transcription in vitro pour obtenir l'ARN MIMI_R349 + (311 nt))
	T7-Rev Repeat.Rev	SEQ.ID.N°17 TACTCCCATAAATAA TATCAC	
Zamilon ORF4	Repeat_RNA _Fwd	SEQ.ID.N°18 : UGAUAAUGAAUCU GA	Séquence sens et antisens ARN de 15 nucléotides utilisée avec les traitements enzymatiques et des expériences de polymérisation avortée
	Repeat_RNA _Rev	SEQ.ID.N°19 : UCAGAUUCAUUUAU CA	
GFP/MIMI _R349	GFP repeat Fwd	SEQ.ID.N°20 : AAUCGCUGGACGG CGACGUUAAUGAAUCGCUGGACGG CGACGUCA	Séquences sens et antisens du gène GFP utilisé dans le test Mimivire dans les cellules eucaryotes
	GFP repeat Rev	SEQ.ID.N°21 : UGACGUCGCCGUC CAGCGAUUCAUUAACGUCGCCGUC CAGCGAUU	

Annexe 1:

SEQ.ID.N°22 =insert synthétisé et cloné par genscript dans pET-22b(+) aux sites de restriction Xba I/Xho I comprenant
5 successivement les séquences des :

a) promoteur T7 (SEQ.ID.N°31) *TAATACGACTCACTATAG* ;

b)opéronLac(SEQ.ID.N°32) *GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC*;

c) site de restriction Xba I= TCTAGA ;

d) séquence Shine-Dalgarno: AAGGAGA ;

10 e) première séquence soulignée= SEQ.ID.N°7 du gène 349 modifié incluant l'unité répétée 4 fois tirée du gène de résistance à la tétracycline SEQ.ID.N°23=CACCCTGGATGCTGT_avec les 3 séquences de spacer intercalées SEQ.ID.N°26,27 et 28,

15 f) premier spacer entre les première et deuxième séquences soulignées incluant le terminateur T7 SEQ.ID.N°33 *CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG*, la séquence du Promoteur T7, SEQ.ID.N° 31 *TAATACGACTCACTATAG* et la séquence du Lac operator, SEQ.ID.N°32: *GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC* et une Séquence Shine-Dalgarno;

20 g) deuxième séquence soulignée= Séquence du gène R350 ;

h) deuxième spacer entre les deuxième et troisième séquences soulignées incluant une séquence Shine-Dalgarno, et

i) troisième séquence soulignée = Séquence du gène R354 ;

j) site de restriction Xho I=CTCGAG ;

25 k) séquence de l'étiquette poly histidine
SEQ.ID.N°34 : *CACCACCACCACCACCAC*;

i) le terminateur T7 SEQ.ID.N°33 :
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

- 5 SEQ.ID.N°22 : séquences organisées en opéron incluant le gène R349 modifié avec séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de résistance à la tétracycline (SEQ ID N°23) et les gènes R350 et 354.

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAAAA
TATTTTACTTGTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAATATGGTTCATGT
10 GGTTCAAAATAGGTACAGATAAACTTATATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTA
GATGATGATGATTCTGTAAAGCGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTCATACATCCA
AAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATA
GTGAAAGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCA
GAAAATCATACTCAAAATAATACAAATACTCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATT
15 CATCAAATAATTCCACTCAATCCACCCTGGATGCTGTTAATGAATCCACCCTGGATGCTGTCA
ATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTGGACCTCGATCCACCCTGGATGCTGTTG
AAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAATATTGGTAATTCAAATAGTATCA
CCCTGGATGCTGTATCTATGACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTTAAACGAAATTAACCA
TGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTC
20 GTCCAAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTTC
ATACCAATAAAAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGA
AATGTTTATGTAATCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAATAAATACCAGGCA
TCTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGT
ATTTCAAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTCTTTTATAC
25 TTATGAATCCAATACTTGTATCATCATGTTATTTTATTCTACAAAAATGTAAATTATTATCCT
TCTTGGATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATA
CTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCT
TGAAAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTATAGACC
AATGGAAATGAGACTACTATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGG
30 ATGTGAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATATTAT
CGGTCTGAATTATTTGAAAGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAATATGTTGACGAT
AACAACGACGATGGTAAATTTTCTTTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTAT
AATGGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTTGAGAT
CAAAATGTATGGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGT

TACCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATTGTTCTAA
AATTAATTGGAAACAAATATTTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAA
GACAAGATGTGGGGAAATTTTCATTGAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAATACTAGTAT
TATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTA
5 ACTCATAATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATT
CTATTCGAATTGTAGACGACAAAAATATTGGTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTG
AATCGGCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTACACAGAGTTTAA
TTTACAAGAATTTGCCAACTGAAACCCACCGAAATTAATATTTGGGATCAATGTTTCATAT
GGTTATCTGTCAAAATAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGCTGTAGAAAT
10 TTATGGAAAAGAACCACAAATTGATGAATTGGAATATTTTGCTTGTAATGAAGATGAACTGG
ATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCT
TATGAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAAAATATCT
TGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACA
TAAAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCCATACAAAATTAATAGAAC
15 CATATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAATAATAATTATTTGGAAT
GTTCAAAGAATTTATTAACCTCTTGCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAAATTGGACA
GCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACG
CTAAAGCAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTTGG
ATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATT
20 AAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAA
TAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAGATCTCGATCC
CGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTCCTCACTAGAAAT
AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCAATGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTG
AACCCGGAGCCGAGCATCGAAAACCCGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCCGGGTAACAA
25 CAGCGTGTATAAAAGCGACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCCCGATCT
GGATTCTGAAGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTCGTAAGAGAACGAAGACC
CGTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCAGGAATTCGTGGGCCAATACCTG
AACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCTGTACCATGGTCTGGGTAGCGGCAAGACCGC
GAGCGCGATCAACCTGATGAACATTCTGTACAACTATGACAACGGCACCAACTTTATCGTTCT
30 GATTAAAGCGAGCCTGCACAACGACCCGTGGATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTCGTG
ATCCGAGCGAACAGAACGTGGACAACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCG
TGCACTATGACAGCCCGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCTGGACCTGA
GCAAACCGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGTAAACGTGTATAGCAACA
TTAACAGCAAATGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTACGAGTACATCATGAAGGACAAGCGT

GAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATTAGCGCGACCCCGGCGATCAACACCCCGTTCGAA
CTGGCGCTGATGTTTAACCTGCTGCGTCCGGGTATTTTCCCAGAGCAGCGAGCTGGATTTCAA
CCGTACCTTTGTGACCGAAAGCAGCTACCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGA
GCGTCGTATCCTGGGCCTGGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCGCGTC
5 AAGAACTGAAGTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCTACCGTATTTTCG
AGAAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCGTCGTGGCAAGCAGAGCCAACTGTAC
CGTACCTATACCCGTCAGGCGTGCAACTTCGTGTTTCCGTACGTTAACATGAACGTGAACGGT
GAAGTGCCTCCGCGTCCGGGCAAGTTCGCTCTGAGCGAAAACTGGCGGACGATTTTAGCAA
GGGCAAAAACCTGGACGTTCCGGATACCGAGAAAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGA
10 TTGAGAACTACCTGAACGAGACCGAACGTTATTTTCAAGACATCAACAAGAAAGACGCGGAGA
ACGGTCGTACCATCATTAACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAAGTTCAACA
GCTTTCTGCAGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCTGACCGAAATGTACAAC
TGCAGCCCGAAAAATGCTGGCGATCGCGTTCATGACCTATATTAGCCCGGGCAAGGTGATGAT
CTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCATCGACGTTATGAAAATTTACTTTCTGTCTGATCGG
15 TTTCAACGATTTTACGATCGCGCGTGAGTACATGGGCTATTGCGAATACCACGGTCGTATCGA
CCCGAAGGATCGTGTGCGTATCAAGAACATGTTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAA
GTGCAAAGTTATCATGCTGAGCCCGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATCCGTC
AGGAGCACATTATGGAACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTGATTGGCCGTGGT
GTTTCGTCAATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGTATCGTGGATATTTACCGTTA
20 TAAGGTTATCAAACCGGAAAAACCTGGACCCGGACGATACCGTGCGTCAAAGCACCGACGAGT
ACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAAGCGAACCTGATTGAGAGCTTCCTGGGCGCTATGAAA
GAAGCGGCGGTTGATTGCGAGCTGTTTAAGGAACACAACATGATGAGCCAGAGCTACTATTG
CTTCAAATTTCCGGAGAGCGCGGTGACCAAGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACA
TCAAGGACGATGTGAAATATGATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGCGTATTC
25 GTGTGGTTAAGGTGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAACCCGGTGTATAGCA
GCCCGACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGTTTATGACTTCGAGACCCACTACC
CGGTGGGTCAGGTTGAATTTATCGATAACCTGCCGAACAAGCTGGACAAAGATACCTACATCA
TGCGTATTGATGTGATCATTCCGAGCATTACCGGTAGCGTTAACACCTAACACTAGAAATAAT
TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCGATGACCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATC
30 GATAAAATTCTGTGGAACATCCTGGGTGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTG
GTGAACAGCGTTGCGAACACCATTTACAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGATAAGCTGAAA
GTGATCATCGAATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACATCTACGATAACGACAGC
ATCCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTGGTAGCAAAACCATCGGCAAGAACAG
CACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAGATATCGCGGTGATTAAGCTGAGCGATATTGAGG

CGGGCGAAAACTGGTTCAAGAAAAGCCCGAAAATCAGCAGCAAGCAGTTTCAAAGCGTTGAC
AAAGTTGAGGTGGCGACCTACGAAGACCTGATCAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGAT
TTATAAGGAAAGCCACTACATCCGTCGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCGCA
ATTCGAGCAGAAGAGCAAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACCGCGACCGCGA
5 TTAGCGTGGTTTTTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTTATTCTGCTGGACAAGTGCG
GTCGTGGCCTGCCGTTCGTGGAGAACAAATTTGTTCAACACGGTAACAAGTATGAACAAATCG
GCACCATGTTCTACAGCTTTCGTAACAACGTTGAGGTGGGTGAGTACGGCCTGCTGCAGCAC
AGCGGTCACAAGTTTATCGCGGCGAGCCCGGATGGCATCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGG
TGGCCTGAGCAAACTGGTGGGTGCTCTGCTGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCA
10 ACAACAGCGGTGATCTGGACGGCGATATCTGCCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGCAAACCC
AGCTGTATGTTACCGAGATGGACGAATGCGACTTCCTGCAGTGCAAATTGACGAGTACGAT
AGCTGGGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTCCGGGTCTGAGCAAAACCACCAA
CCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCGACAAAAACCTGATCGGCAGCGACGACAAGG
AAAAATGCCTGTATAACAGCAAATACATCTATCCGCCGAAGCTGCACATGACCAACGAGGAAA
15 TCGAGAAGTGGATTAGCAGCGAAATCATGAACTACCACAACAACGACCTGAGCGAGAACTATA
TGATTGATCGTGTGATCTACTGGCGTCTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAACA
AAGAAGCGTTCGAGGAAAAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTTCTGTTTTATC
GTCAGCACAGCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAGAAGGTTAAAGAAGATAAC
AGCGCGGAGATTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTCTGAGCCTGAACAAAGATAGCAAGTAC
20 GAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAATGGCGTAAGAAATATAACCAAATCAAGGCGAAGAA
AGCGCAGATGTACAAGAACAAGAGCTACAACAAGTACACCAAGTTCAGCAACCTCGAG CACCA
CCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTG
CCACCGCTGAGCAATAA CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
TG.

Annexe 2 :

SEQ.ID.N°37 =insert synthétisé et cloné par genscript dans pET-22b(+) aux sites de restriction Xba I/Xho I comprenant successivement les séquences des :

- 5 a) promoteur T7 (SEQ.ID.N°31) *TAATACGACTCACTATAG* ;
- b) opéronLac(SEQ.ID.N°32) *GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC*;
- c) site de restriction Xba I= TCTAGA ;
- d) séquence Shine-Dalgarno: AAGGAGA ;
- e) première séquence soulignée= SEQ.ID.N°38 du gène 349
10 modifié incluant l'unité répétée 4 fois tirée du gène de résistance à la tétracycline SEQ.ID.N°39= CGGCTCTTACCAGCC_avec les 3 séquences de spacer intercalées SEQ.ID.N°26,27 et 28,
- f) premier spacer entre les première et deuxième séquences soulignées incluant le terminateur T7 SEQ.ID.N°33
15 *CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG*, la séquence du Promoteur T7, SEQ.ID.N° 31 *TAATACGACTCACTATAG* et la séquence du Lac operator, SEQ.ID.N°32: *GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC* et une Séquence Shine-Dalgarno;
- g) deuxième séquence soulignée= Séquence du gène R350 ;
- 20 h) deuxième spacer entre les deuxième et troisième séquences soulignées incluant une séquence Shine-Dalgarno, et
- i) troisième séquence soulignée = Séquence du gène R354 ;
- j) site de restriction Xho I=CTCGAG ;
- k) séquence de l'étiquette poly histidine
25 SEQ.ID.N°34 :*CACCACCACCACCAC*;

i) le terminateur T7 SEQ.ID.N°33 :
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

- 5 SEQ.ID.N°37 : séquences organisées en opéron incluant le gène R349 modifié avec séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de résistance à la tétracycline (SEQ ID N°39) et les gènes R350 et 354.

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAAAA
10 TATTTTACTTGTTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAATATGGTTCATGT
GGTTTCAAATAGGTACAGATAAACTTATATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTA
GATGATGATGATTCTGTTAAAGCGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTCATACATCCA
AAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATA
GTGAAAGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCA
15 GAAAATCATACTCAAAATAATACAAATACTCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATT
CATCAAATAATTCCACTCAATCCGGCTCTTACCAGCCTAATGAATCCGGCTCTTACCAGCCCAA
TGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTGGACCTCGATCCGGCTCTTACCAGCCTGA
AGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAATATTGGTAATTCAAATAGTATCGG
CTCTTACCAGCCATCTATGACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTTAAACGAAATTAACCAT
20 GGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTCG
TCCAAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTCA
TACCAATAAAAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGAA
ATGTTTATGTACTCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAAAAAATACCAGGCAT
CTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAATGGTATTAAATGGAAGTA
25 TTTCAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTCTTTTATACT
TATGAATCCAATACTTGTTATCATCATGTTATTTCACTTACAAAAATGTAAATTATTATCCTT
CTTGGATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATAC
TAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTT
GAAAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTATAGACCA
30 ATGGAAATGAGACTACTATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGA
TGTGAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATATTATC
GGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAATATGTTGACGATA
ACAACTGACGATGGTAAAATTTTCTTTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTATA
ATGGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTTTCAGATC
35 AAAATGTATGGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTT

ACCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATTGTTCTAAA
ATTAATTGGAAACAAATATTTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAAG
ACAAGATGTGGGGAAATTTTCATTGAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAATACTAGTATT
ATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTA
5 CTCATAATTCCTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTC
TATTCGAATTGTAGACGACAAAAATATTGGTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGA
ATCGGCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTCACACAGAGTTTAAT
TTACAAGAATTTGCCAACTGAAACCCACCGAAATTAATATTTGGGATCAATGTTTCATATG
GTTATCTGTCAAATAATTCCTTCGTTACCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGCTGTAGAAATTT
10 ATGGAAAAGAACCACAAATTGATGAATTGGAATATTTTGCTTGTAATGAAGATGAACTGGAT
TCAAACATATTTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCTTA
TGAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAAAATATCTTG
ACGAAAAAATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACATA
AAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCCATACAAAATTAATAGAACCA
15 TATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAAATAATAATTATTTGGAAATGT
TCAAAGAATTTATTAACCTCTTGCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAAATTGGACAGC
ATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACGCT
AAAGCAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTTGGAT
GAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAA
20 GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAGATCTCGATCCC
GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCACTAGAAATA
ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCAATGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGA
ACCCGGAGCCGAGCATCGAAAACCCGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCTGGGTAAACAAC
25 AGCGTGTATAAAAGCGACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCCCGATCTG
GATTCTGAAGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTCTGTAAGAGAACGAAGACCC
GTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCAGGAATTCGTGGGCCAATACCTGA
ACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCTGCTGTACCATGGTCTGGGTAGCGGCAAGACCGCG
AGCGCGATCAACCTGATGAACATTCTGTACAACTATGACAACGGCACCACTTTATCGTTCTG
30 ATTAAGCGAGCCTGCACAACGACCCGTGGATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTCTGTA
TCCGAGCGAACAGAACGTGGACAACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAACATCCACTTCGT
GCACTATGACAGCCCGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCTGGACCTGA
GCAAACCGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGTAACTGTATAGCAACA
TTAACAGCAAATGGGCAAGCGTGCGAAAAGTTATCTACGAGTACATCATGAAGGACAAGCGT

GAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATTAGCGCGACCCCGGCGATCAACACCCCGTTCGAA
CTGGCGCTGATGTTTAACCTGCTGCGTCCGGGTATTTTCCCAGAGCAGCGAGCTGGATTTCAA
CCGTACCTTTGTGACCGAAAGCAGCTACCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGA
GCGTCGTATCCTGGGCCTGGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCGCGTC
5 AAGAACTGAAGTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCTACCGTATTTTCG
AGAAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCGTCGTGGCAAGCAGAGCCAACTGTAC
CGTACCTATACCCGTCAGGCGTGCAACTTCGTGTTTCCGTACGTTAACATGAACGTGAACGGT
GAAGTGCCTCCGCGTCCGGGCAAGTTCGTCGTGAGCGAAAACTGGCGGACGATTTTAGCAA
GGGCAAAAACCTGGACGTTCCGGATACCGAGAAAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGA
10 TTGAGAACTACCTGAACGAGACCGAACGTTATTTTCAAGACATCAACAAGAAAGACGCGGAGA
ACGGTCGTACCATCATTAACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAAGTTCAACA
GCTTTCTGCAGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCTGACCGAAATGTACAAC
TGCAGCCCGAAAAATGCTGGCGATCGCGTTCATGACCTATATTAGCCCGGGCAAGGTGATGAT
CTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCATCGACGTTATGAAAATTTACTTTCTGTCTGATCGG
15 TTTCAACGATTTTACGATCGCGCGTGAGTACATGGGCTATTGCGAATACCACGGTCGTATCGA
CCCGAAGGATCGTGTGCGTATCAAGAACATGTTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAA
GTGCAAAGTTATCATGCTGAGCCCGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATCCGTC
AGGAGCACATTATGGAACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTGATTGGCCGTGGT
GTTTCGTCAATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGTATCGTGGATATTTACCGTTA
20 TAAGGTTATCAAACCGGAAAAACCTGGACCCGGACGATACCGTGCGTCAAAGCACCGACGAGT
ACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAAGCGAACCTGATTGAGAGCTTCCTGGGCGCTATGAAA
GAAGCGGCGGTTGATTGCGAGCTGTTTAAGGAACACAACATGATGAGCCAGAGCTACTATTG
CTTCAAATTTCCGGAGAGCGCGGTGACCAAGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACA
TCAAGGACGATGTGAAATATGATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGCGTATTC
25 GTGTGGTTAAGGTGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAACCCGGTGTATAGCA
GCCCGACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGTTTATGACTTCGAGACCCACTACC
CGGTGGGTCAGGTTGAATTTATCGATAACCTGCCGAACAAGCTGGACAAAGATACCTACATCA
TGCGTATTGATGTGATCATTCCGAGCATTACCGGTAGCGTTAACACCTAACACTAGAAATAAT
TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCGATGACCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATC
30 GATAAAATTCTGTGGAACATCCTGGGTGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTG
GTGAACAGCGTTGCGAACACCATTTACAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGATAAGCTGAAA
GTGATCATCGAATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACATCTACGATAACGACAGC
ATCCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTGGTAGCAAAACCATCGGCAAGAACAG
CACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAGATATCGCGGTGATTAAGCTGAGCGATATTGAGG

CGGGCGAAAACTGGTTCAAGAAAAGCCCGAAAATCAGCAGCAAGCAGTTTCAAAGCGTTGAC
AAAGTTGAGGTGGCGACCTACGAAGACCTGATCAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGAT
TTATAAGGAAAGCCACTACATCCGTCGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCGCA
ATTCGAGCAGAAGAGCAAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACCGCGACCGCGA
5 TTAGCGTGGTTTTTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTTATTCTGCTGGACAAGTGCG
GTCGTGGCCTGCCGTTCGTGGAGAACAAATTTGTTCAACACGGTAACAAGTATGAACAAATCG
GCACCATGTTCTACAGCTTTCGTAACAACGTTGAGGTGGGTGAGTACGGCCTGCTGCAGCAC
AGCGGTCACAAGTTTATCGCGGCGAGCCCGGATGGCATCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGG
TGGCCTGAGCAAACTGGTGGGTGCTCTGCTGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCA
10 ACAACAGCGGTGATCTGGACGGCGATATCTGCCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGCAAACCC
AGCTGTATGTTACCGAGATGGACGAATGCGACTTCCTGCAGTGCAAATTGACGAGTACGAT
AGCTGGGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTCCGGGTCTGAGCAAAACCACCAA
CCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCGACAAAAACCTGATCGGCAGCGACGACAAGG
AAAAATGCCTGTATAACAGCAAATACATCTATCCGCCGAAGCTGCACATGACCAACGAGGAAA
15 TCGAGAAGTGGATTAGCAGCGAAATCATGAACTACCACAACAACGACCTGAGCGGAGAACTATA
TGATTGATCGTGTGATCTACTGGCGTCTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAACA
AAGAAGCGTTCGAGGAAAAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTTCTGTTTTATC
GTCAGCACAGCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAGAAGGTTAAAGAAGATAAC
AGCGCGGAGATTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTCTGAGCCTGAACAAAGATAGCAAGTAC
20 GAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAATGGCGTAAGAAATATAACCAAATCAAGGCGAAGAA
AGCGCAGATGTACAAGAACAAGAGCTACAACAAGTACACCAAGTTCAGCAACCTCGAGCACCA
CCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTG
CCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACCGGGTCTTGAGGGGTTTTT
TG

25

30

LISTAGE DE SEQUENCE

SEQ. ID. N°1 : protéine R350 de Mimivirus

MNRRNRSNDLNPEPSIENPNNQIAEEFPGNNSVYKSDGYVDLKNNGRLFPIWILKN
FKQYKLPEIIRKENEDPCNVQVKLELRKYQEFVGQYLNPQGPYTSILLYHGLGSGKT
5 ASAINLMNILYNYDNGTGNFIVLIKASLHNDPWMQDLKEWLGRDPSEQNVDNVTCL
DRYKNIHFVHYDSPFADSSFMSVIKTLDSLKPTMYIIDEAHNFIRNVYSNINSKLGK
RAKVIYEYIMKDKRENKNTRIVLISATPAINTPFELALMFNLLRPGIFPSSELDNFRT
FVTESSYPILNPMKKNMFERRILGLVSYYIGATPDLYARQELKYINLPMSAYQYDIY
RIFEKLEAEIQERARRRGKQSQLYRTYTRQACNFVFPYVNMNVNGELRPRPGKFRL
10 SEKLADDFSKGKNLDVPDTEKEILNKYTKAIENYLNETERYFQNKKKDAENGRTII
NDLDEFKKGFGTKFNSFLQYYQSEGPRSSLLTEMYNCSPKMLAIAFMTYISPGKVM
YSNYVVMGIDVMKIYFRLIGFNDFTIAREYMGYCEYHGRIDPKDRVRIKNMFNDK
NNVYGKCKVIMLSPSATEGIQLDIRQEHIMEPYWTEVRIQQVIGRGVRQCCHRD
LPMSEIRVDIYRYKVIKPENLDPDDTVRQSTDEYVEDQAKSKANLIESFLGAMKEAA
15 VDCELFKEHNMMSSQSYCFKFPESA VT KTNVGPAYREDIKDDVKYDSGLNSKNSIV
ERIRVVKVNAVYQINTDNNNPVYSSPTKYWYNKKTGMVYDFETHYPVGQVEFIDN
LPNKLDKDTYIMRIDVIIPSITGSVNT

SEQ. ID. N°2: protéine R354 de Mimivirus

MTDISYYNNEIDKILWNILGDDYFTQDEFDDLNSVANTIYQYDNEVSIDKLKVIIE
20 FVILNKFCLCYIDNDSILNQVKYEKKS SVGSKTIGKNSTNDDEDDDEDIAVIKLS
AGENWFKKSPKISSKQFQSVDKVEVATYEDLISHKHDYPKEIYKESHYIRNRRLDV
IKKIPQFEQKSKEWLKQRTESLTATAISVVFDEDPYKHPIVILLDKCGRGLPFVENKF
VHHGNKYEQIGTMFY SFRNNVEVGEYGLLQHS GHKFIAASPDGICSKKANTGGLSK
LVGRILLEIKFPFSREINNSGDLDGDICPHYYFLQVQTQLYVTEMDECDLQCKIDEY
25 DSWEDFVKDSNPVPGLSKTTNLEKGCLIQLSDKNLIGSDDKEKCLYNSKYIYPPKL
HMTNEEIEKWISSEIMNYHNNDLSENYMIDRVIIYWRLSQVTCNLIKLNKEAFEEKI
PLLQQFWDYVLFYRQHSDKLDKLIK FVEKVKEDNSAEIFS YINEDFLSLNKDSKYEP
LYQEETEWRRKKYNQIKAKKAQMYKNKSYNKYTKFSN

SEQ. ID. N°3: gène R350 de Mimivirus

ATGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGAACCCGGAGCCGAGCATCGAAAAC
CCGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCTGGGTAAACAACAGCGTGTATAAAAGC
GACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCCCGATCTGGATTCTG
AAGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTTCGTAAAGAGAACGAAGACC
5 CGTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCAGGAATTCGTGGGCC
AATACCTGAACCCGCGAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCTGTACCATGGTCTGG
GTAGCGGCAAGACCGCGAGCGCGATCAACCTGATGAACATTCTGTACAACTATG
ACAACGGCACCAACTTTATCGTTCTGATTAAAGCGAGCCTGCACAACGACCCGTG
GATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTCTGTATCCGAGCGAACAGAACGTGG
10 ACAACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCGTGCACTATGACAG
CCCGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCTGGACCTGAGCAA
ACCGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGTAACGTGTATAGC
AACATTAACAGCAAACTGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTACGAGTACATCATGA
AGGACAAGCGTGAAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATTAGCGCGACCCCGG
15 CGATCAACACCCCGTTGAACTGGCGCTGATGTTTAACTGCTGCGTCCGGGTA
TTTTCCCGAGCAGCGAGCTGGATTTCAACCGTACCTTTGTGACCGAAAGCAGCT
ACCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGAGCGTCGTATCCTGGGCC
TGGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCGCGTCAAGAACTGA
AGTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCTACCGTATTTTTCGA
20 GAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCGTCTGGCAAGCAGAGCCA
ACTGTACCGTACCTATACCCGTCAGGCGTGCAACTTCGTGTTTCCGTACGTTAAC
ATGAACGTGAACGGTGAACCTGCGTCCGCGTCCGGGCAAGTTCGTCTGAGCGAA
AACTGGCGGACGATTTTAGCAAGGGCAAAAACCTGGACGTTCCGGATACCGAG
AAAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGATTGAGAACTACCTGAACGAGACCG
25 AACGTTATTTTCAGAACATCAACAAGAAAGACGCGGAGAACGGTCGTACCATCAT
TAACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAAGTTCAACAGCTTTCTG
CAGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCTGACCGAAATGTACAAC
TGCAGCCCGAAAATGCTGGCGATCGCGTTCATGACCTATATTAGCCCGGGCAAG
GTGATGATCTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCATCGACGTTATGAAAATT
30 TACTTTCTGCTGATCGGTTTCAACGATTTTACGATCGCGCGTGAGTACATGGGCT
ATTGCGAATACCACGGTCGTATCGACCCGAAGGATCGTGTGCGTATCAAGAACA
TGTTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAAGTGCAAAGTTATCATGCTGA
GCCCCGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATCCGTCAGGAGCACATTA
TGGAACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTGATTGGCCGTGGTGTTC
35 GTCAATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGTATCGTGGATATTTACC
GTTATAAGGTTATCAAACCGGAAAACCTGGACCCGGACGATACCGTGCGTCAAA
GCACCGACGAGTACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAAGCGAACCTGATTGAGA
GCTTCCTGGGCGCTATGAAAGAAGCGGCGGTTGATTGCGAGCTGTTTAAGGAAC
ACAACATGATGAGCCAGAGCTACTATTGCTTCAAATTTCCGGAGAGCGCGGTGA
40 CCAAGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACATCAAGGACGATGTGAAAT
ATGATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGCGTATTCGTGTGGTTA
AGGTGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAACCCGGTGTATAGCA
GCCCCACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGTTTATGACTTCGAGA
CCCCTACCCGGTGGGTGAGGTTGAATTTATCGATAACCTGCCGAACAAGCTGG
45 ACAAAGATACCTACATCATGCGTATTGATGTGATCATTCCGAGCATTACCGGTAG
CGTTAACACCTAA

SEQ. ID. N°4 : gène R354 de Mimivirus

ATGACCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATCGATAAAAATTCTGTGGAACATCC
 TGGGTGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTGGTGAACAGCGTTG
 CGAACACCATTTACCAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGATAAGCTGAAAGTGAT
 CATCGAATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACATCTACGATAACGAC
 5 AGCATCCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTGGTAGCAAAACCATC
 GGCAAGAACAGCACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAGATATCGCGGTGATT
 AAGCTGAGCGATATTGAGGCGGGCGAAAAGTGGTTCAAGAAAAGCCCGAAAATC
 AGCAGCAAGCAGTTTCAAAGCGTTGACAAAGTTGAGGTGGCGACCTACGAAGAC
 CTGATCAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGATTTATAAGGAAAGCCACTACA
 10 TCCGTCGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCGCAATTCGAGCAGAA
 GAGCAAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACCGCGACCGCGATTAG
 CGTGGTTTTTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTTATTCTGCTGGACAAG
 TCGCGTCGTGGCCTGCCGTTTCGTGGAGAACAATTTGTTACCCACGGTAACAAG
 TATGAACAAATCGGCACCATGTTCTACAGCTTTCGTAACAACGTTGAGGTGGGT
 15 GAGTACGGCCTGCTGCAGCACAGCGGTCACAAGTTTATCGCGGCGAGCCCGGAT
 GGCATCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGGTGGCCTGAGCAAAGTGGTGGGTGCT
 CTGCTGGAGATTAAGTTCCCGTTTACCGGTGAAATCAACAACAGCGGTGATCTG
 GACGGCGATATCTGCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGCAAACCCAGCTGTAT
 GTTACCGAGATGGACGAATGCGACTTCTGCAGTGCAAATTTGACGAGTACGAT
 20 AGCTGGGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTCCGGGTCTGAGCAAA
 ACCACCAACCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTGAGCTGAGCGACAAAAACCTGATC
 GGCAGCGACGACAAGGAAAAATGCCTGTATAACAGCAAATACATCTATCCGCCG
 AAGCTGCACATGACCAACGAGGAAATCGAGAAGTGGATTAGCAGCGAAATCATG
 AACTACCACAACAACGACCTGAGCGAGAACTATATGATTGATCGTGTGATCTACT
 25 GGCGTCTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAACAAAGAAGCGTTTCG
 AGGAAAAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTTCTGTTTTATCGTCA
 GCACAGCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAGAAGGTTAAAGAAGA
 TAACAGCGCGGAGATTTTACGCTACATCAACGAAGACTTTCTGAGCCTGAACAAA
 GATAGCAAGTACGAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAATGGCGTAAGAAATAT
 30 AACCAATCAAGGCGAAGAAAGCGCAGATGTACAAGAACAAGAGCTACAACAAG
 TACACCAAGTTCAGCAAC

SEQ. ID. N°5 : gène R349 de Mimivirus

ATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAAAATATTTTACTTGTTAGTT
 CTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAATATGGTTCATGTGGTTTCAA
 35 AATAGGTACAGATAAAACTTATATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTA
 GATGATGATGATTCTGTTAAAGCGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTC
 ATACATCCAAAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGA
 AATCGATGCATATGATAGTGAAAGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGC
 TGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCAGAAAATCATACTCAAATAATACAAATACT
 40 CCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATTATCAAATAATTCCACTCAATC
 TGATAATGAATCTGATAATGAATCTGATAATGAATCTGACAATGAATCTGATCAA
 TCATGTAGTGATTTTACTGTGGACCTCGATCTGATAATGAATCTGATGAAGAAG
 TTTTGTGTTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAATATTGGTAATTCAAATAGTAT
 TGATAATGAATCTGAATCTATGACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTAAACGAA
 45 ATTAACCATGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGAA
 TTAACGATATTGTTATTCGTCCAAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATAT
 TACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTACATACCAATAAAAATGGTTTCTTATTATTC
 AAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGAAATGTTTATGTACTCTAAAA

ATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAAAAAATACCAGGCATCTCTAAGAGA
 TATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGTAT
 TTCAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTCT
 TTTATACTTATGAATCCAATACTTGTTATCATCATGTTATTTTCATTCTACAAAAAT
 5 GTAAATTATTATCCTTCTTGGATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGTA
 AAAATATGTTCTTTTCAAGTGATACTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACAA
 CGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTTGAAAAATACATCGATAACAAA
 CTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTATAGACCAATGGAAATGAGA
 CTAATAATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGATGTG
 10 AGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATAT
 TATCGGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAAT
 ATGTTGACGATAACAACCTGACGATGGTAAAATTTTCTTTAACATTCATGATATTA
 CTTTTTACAAAAGATTTTATAATGGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTATT
 TTATCTCACAGATAGTGAAATTTTCAAGATCAAAATGTATGGAACTAACTGGATGT
 15 CAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTTACCTATTTAATTTACCGG
 ACAAATTTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATTGTTCTAAAATTAATTGG
 AAACAAATATTTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAAG
 ACAAGATGTGGGGAAATTTTCAATTGAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAATA
 CTAGTATTATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATATT
 20 GATACGGATTGTACTACTCATAATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAAT
 CTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTCTATTCTGAATTGTAGACGACAAAAATATTGG
 TTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGAATCGGCTATTATGCAATTTTAT
 TATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTCACACAGAGTTTAATTTACAAGAATTTG
 CCAAATGAAACCCACCGAAATTAAATATTTGGGATCAATGTTTCATATGGTTAT
 25 CTGTCAAATAAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGCTGTAGAA
 ATTTATGGAAAAGAACCCACAATTGATGAATTGGAATATTTTGCTTGTAATGAAG
 ATGAACTGGATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTAA
 AGAATTCGGTTATGAATCTTATGAACATTGTCTAAAAACTTTGTGTAAATATAAT
 TATGAAGATGATACTGATAAAAATATCTTGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTAG
 30 CTGCCGGTTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACATAAAACAAATGAATTTACC
 CACATTGGACTATTACATTTCTGGCCCATACAAAATTAATAGAACCATATTAATT
 AATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAAATAAATTAATTTGGAAATGT
 TCAAAGAATTTATTAATCTTTGTCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAAA
 TTGGACAGCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTATT
 35 TCCAAATCTAAAAACGCTAAAGCAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAAA
 TTCATATCGACGAAAAAATGTTGGATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGGT
 TTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAA

SEQ. ID. N°6 : séquence répétée du virophage zamilon

TGATAATGAATCTGA

40 SEQ. ID. N°7: Gène R349 modifié avec des séquences répétées du gène de résistance à la tétracycline (SEQ ID N°23)

ATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAAAATATTTTACTTGTTAGTT
 CTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAATATGGTTCATGTGGTTTCAA
 AATAGGTACAGATAAACTTATATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTA
 45 GATGATGATGATTCTGTTAAAGCGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTC
 ATACATCCAAAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGA

AATCGATGCATATGATAGTGAAAGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGC
TGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCAGAAAATCATACTCAAATAATACAAATACT
CCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATTTCATCAAATAATTCCACTCAATC
CACCCTGGATGCTGTTAATGAATCCACCCTGGATGCTGTCAATGAATCTGATCAA
5 TCATGTAGTGATTTTGACTGTGGACCTCGATCCACCCTGGATGCTGTTGAAGAA
GTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAAATATTGGTAATTCAAATAGTA
TCACCCTGGATGCTGTATCTATGACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTAAACGA
AATTAAAACCATGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGA
ATTAACGATATTGTTATTCGTCCAAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATA
10 TTACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTTCATACCAATAAAAAATGTTTTCTTATTATT
CAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGAAATGTTTATGTACTCTAAA
AATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAAAAAATACCAGGCATCTCTAAGAG
ATATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGTA
TTTCAAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTT
15 TTTTATACTTATGAATCCAATACTTGTTATCATCATGTTATTTTCATTCTACAAAAA
TGTAATTTATTATCCTTCTTGATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGT
AAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATACTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACA
ACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTTGAAAAATACATCGATAACAA
ACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTATAGACCAATGGAAATGAG
20 ACTACTATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGATGT
GAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATA
TTATCGGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAA
TATGTTGACGATAACAACCTGACGATGGTAAAATTTTCTTTAACATTCATGATATT
ACTTTTTACAAAAGATTTTATAATGGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTTCGTTAT
25 TTTATCTCACAGATAGTGAAATTTTCAGATCAAATGTATGGAACTAACTGGATG
TCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTTACCTATTTAATTTACCG
GACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATTGTTCTAAAATTAATTG
GAAACAAATATTTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAA
GACAAGATGTGGGGAAATTTTCATTGAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAAT
30 ACTAGTATTATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATAT
TGATACGGATTGTACTACTCATAATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAA
TCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTCTATTTCGAATTGTAGACGACAAAAATATTG
GTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGAATCGGCTATTATGCAATTTTA
TTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTCACACAGAGTTTAATTTACAAGAATTT
35 GCCAACTGAAACCCACCGAAATTAATATTTGGGATCAATGTTTCATATGGTTA
TCTGTCAAATAAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGTGTAGA
AATTTATGGAAAAGAACCACAAATTGATGAATTGGAATATTTTGTCTGTAATGAA
GATGAACTGGATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTA
AAGAATTCGGTTATGAATCTTATGAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAA
40 TTATGAAGATGATACTGATAAAAAATATCTTGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTA
GCTGCCGTTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACATAAAACAAATGAATTTAC
CCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCATACAAAATTAATAGAACCATATTAAT
TAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAAATAAATATTTTGAAATG
TTCAAAGAATTTATTAATCTTTGTCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAA
45 ATTGGACAGCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTAT
TTCCAAATCTAAAAACGCTAAAGCAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAA
ATTCATATCGACGAAAAAATGTTGGATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGG
TTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAA

SEQ. ID. N°8 séquence sens de 130 nucléotides de l'ORF4 de zamilon

ATAGAACAACCAAAAAAATATCAAAATCTAGAGATGAATCAAGTGAATCAGAAGA
 ATCTGATAATGAATCTGATAATGAATCCGATGAGGAAGTTGAATCAGAACTGAG
 ATAGAACCAGTCAAATCTAA

SEQ. ID. N°9 séquence anti sens de 130 nucléotides de l'ORF4 de zamilon

- 5 TTAGATTTGACTGGTTCTATCTCAGTTTCTGATTCAACTTCCTCATCGGATTCAT
 TATCAGATTCATTATCAGATTCTTCTGATTCACTTGATTCATCTCTAGATTTTGA
 TATTTTTTTGGTTGTTCTAT

SEQ.ID.N°10 : amorce du gène R349 de mimivirus

ATGGAATTAATTAGTCGTGTC

- 10 SEQ.ID.N°11 : amorce du gène R349 de mimivirus

TTAATCTTTGAATCCTTGAGC

SEQ.ID.N°12 : amorce du gène de l'ORF4 du virophage zamilon

ATGTCTGTTCTAGAAAACCT

- 15 SEQ.ID.N°13 : amorce du gène de l'ORF4 du virophage zamilon
 TTAAGTTATAATTTTGTATA

SEQ.ID.N°14 : amorce d'une séquence sens incluant les séquences des promoteur T7 et opéron Lac

TAATACGACTCACTATAGGGTACTCCCATAAATAATATCAC

- 20 SEQ.ID.N°15 : amorce d'une séquence sens incluant les séquences des promoteur T7 et opéron Lac

GAGACAAAATTTTCATCTACC

SEQ.ID.N°16 : amorce d'une séquence antisens incluant les séquences des promoteur T7 et opéron Lac

TAATACGACTCACTATAGGGGAGACAAAATTTTCATCTACC

- 25 SEQ.ID.N°17 : amorce d'une séquence antisens incluant les séquences des promoteur T7 et opéron Lac

TACTCCCATAAATAATATCAC

SEQ.ID.N°18 : séquence sens de l'ARN de la séquence répétée du virophage zamilon

- 30 UGAUAAUGAAUCUGA

SEQ.ID.N°19 : séquence anti sens de l'ARN de la séquence répétée du virophage zamilon

UCAGAUUCAUUAUCA

SEQ.ID.N°20 : séquence sens de l'ARN de la séquence répétée du gène GFP

AAUCGCUGGACGGCGACGUUAAUGAAUCGCUGGACGGCGACGUCA

- 5 SEQ.ID.N°21 : séquence anti sens de l'ARN de la séquence répétée du gène GFP

UGACGUCGCCGUCCAGCGAUUCAUUAACGUCGCCGUCCAGCGAUU

- 10 SED.ID.N° 22: séquences organisées en opéron incluant le gène R349 modifié avec séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de résistance à la tétracycline (SEQ ID N°23) et les gènes R350 et 354.

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAAT
AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCT
TTACTCATGGAGAAAATATTTTACTTGTTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTAT
GGGTAATAATGAATATGGTTCATGTGGTTTCAAAATAGGTACAGATAAACTTAT
15 ATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTAGATGATGATGATTCTGTAAAG
CGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTCATACATCCAAAGGAAAAATTTA
TCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATAGTGAA
AGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGAT
TCAGAAAATCATACTCAAAATAATACAAATACTCCATAAATAATATCACACTAAT
20 TAATTTGGATTCATCAATAAATTCCACTCAATCCACCCTGGATGCTGTAAATGAA
TCCACCCTGGATGCTGTCAATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTG
GACCTCGATCCACCCTGGATGCTGTTGAAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAA
TAATTCAGATAATATTGGTAATTCAAATAGTATCACCTGGATGCTGTATCTATG
ACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTAAACGAAATTTAAACCATGGTAGATGAAA
25 TTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTCGTCC
AAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGTATC
ATTTCATACCAATAAAAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATC
CTTTTCGTTGAAGAAATGTTTATGTACTCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCA
TACCATTTAAAAAATACCAGGCATCTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTCATACAAT
30 TAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGTATTTCAAATAGTGTTTCCATT
GACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTCTTTTATACTTATGAATCCAATA
CTTGTTATCATCATGTTATTTCACTTCTACAAAAATGTAAATTATTATCCTTCTTG
ATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTG
ATACTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATT
35 CAATAATTCTCTTGAAAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATT
GTGCCTGATAGTTATAGACCAATGGAAATGAGACTACTATTAAGTTAGGTATAA
CATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGATGTGAGGATGATGAAGACATATTTT
CGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATATTATCGGTCTGAATTATTTTGAA
AGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAATATGTTGACGATAACAACGACG
40 ATGGTAAAATTTTCTTTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTATAAT
GGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTT
CAGATCAAAATGTATGGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTC
TACCATATATAGTTACCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCT
TCGTCTGAATTTATTGTTCTAAAATTAATTGGAAACAAATATTTTTATTATCCGG
45 TTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAAGACAAGATGTGGGGAAATTTTCATT

GAAAAATAATTCAGTTCTTGAAGCTCGTTAATACTAGTATTATTAACAGACAATCT
AAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTACTACTCATA
ATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATA
TTCTATTCTGAATTGTAGACGACAAAAATATTGGTTTTGGTGATGGGCCTAAAATT
5 GAATTTTGTGAATCGGCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATA
ATTTTCACACAGAGTTTAATTTACAAGAATTTGCCAAACTGAAACCCACCGAAAT
TAAATATTTGGGATCAATGTTTCATATGGTTATCTGTCAAATAATTCTTCGTTA
CCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGTCTGTAGAAATTTATGGAAAAGAACCCACAA
TTGATGAATTGGAATATTTTGTCTGTGAATGAAGATGAAACTGGATTCAAACATAT
10 TTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCTTAT
GAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAA
ATATCTTGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAGATACGG
CAATATCAAGAACATAAAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCT
GGCCCATACAAAATTAATAGAACCATATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAG
15 GTAAGGATAAAAAATAAATTATTTGGAAATGTTCAAAGAATTTATTAACCTCTT
GTCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAAATTGGACAGCATCAACTTGTGTA
AGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACGCTAAAG
CAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTT
GGATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGA
20 TTCAAAGATTAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT
GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTC
TTGAGGGGTTTTTTGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
GGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCACTAGAAATAATTTGTTTTAACTTTAAG
AAGGAGATATAGCAATGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGAACCCGGAGC
25 CGAGCATCGAAAACCCGAACAACAGATTGCGGAGGAATTCGGGGTAACAACA
GCGTGTATAAAAGCGACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCC
CGATCTGGATTCTGAAGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTCGTAA
AGAGAACGAAGACCCGTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCA
GGAATTCGTGGGCCAATACCTGAACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCT
30 GTACCATGGTCTGGGTAGCGGCAAGACCGCGAGCGCGATCAACCTGATGAACAT
TCTGTACAACCTATGACAACGGCACCAACTTTATCGTTCTGATTAAAGCGAGCCTG
CACAACGACCCGTGGATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTGCTGATCCGAGC
GAACAGAACGTGGACAACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCG
TGCACTATGACAGCCCGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCT
35 GGACCTGAGCAAACCGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGT
AACGTGTATAGCAACATTAACAGCAAACCTGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTAC
GAGTACATCATGAAGGACAAGCGTGAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATT
AGCGCGACCCCGGCGATCAACACCCCGTTTCAAACTGGCGCTGATGTTTAACTG
CTGCGTCCGGGTATTTTCCCGAGCAGCGAGCTGGATTTCAACCGTACCTTTGTG
40 ACCGAAAGCAGCTACCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGAGCGT
CGTATCCTGGGCCTGGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCG
CGTCAAGAACTGAAGTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCT
ACCGTATTTTCGAGAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCTGCTGTG
GCAAGCAGAGCCAACCTGTACCGTACCTATACCCGTGAGGCGTGCAACTTCGTGT
45 TTCCGTACGTTAACATGAACGTGAACGGTGAACCTGCGTCCGCGTCCGGGCAAGT
TCCGTCTGAGCGAAAAAATGGCGGACGATTTTAGCAAGGGCAAAAACCTGGACG
TTCCGGATACCGAGAAAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGATTGAGAACTA
CCTGAACGAGACCGAACGTTATTTTCAGAACATCAACAAGAAAGACGCGGAGAA
CGGTGCTACCATCATTAACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAA
50 GTTCAACAGCTTTCTGCAGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCT

GACCGAAATGTACAACTGCAGCCCGAAAATGCTGGCGATCGCGTTCATGACCTA
TATTAGCCCGGGCAAGGTGATGATCTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCAT
CGACGTTATGAAAATTTACTTTTCGTCTGATCGGTTTCAACGATTTTACGATCGCG
CGTGAGTACATGGGCTATTGCGAATACCACGGTCGTATCGACCCGAAGGATCGT
5 GTGCGTATCAAGAACATGTTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAAGTGC
AAAGTTATCATGCTGAGCCCGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATC
CGTCAGGAGCACATTATGGAACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTG
ATTGGCCGTGGTGTTCGTCAATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGT
ATCGTGGATATTTACCGTTATAAGGTTATCAAACCGGAAAACCTGGACCCGGAC
10 GATACCGTGCGTCAAAGCACCGACGAGTACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAA
GCGAACCTGATTGAGAGCTTCTGGGCGCTATGAAAGAAGCGGCGGTTGATTGC
GAGCTGTTTAAGGAACACAACATGATGAGCCAGAGCTACTATTGCTTCAAATTTTC
CGGAGAGCGCGGTGACCAAGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACATCA
AGGACGATGTGAAATATGATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGC
15 GTATTCGTGTGGTTAAGGTGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAA
CCCGGTGTATAGCAGCCCGACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGT
TTATGACTTCGAGACCCACTACCCGGTGGGTGAGGTTGAATTTATCGATAACCTG
CCGAACAAGCTGGACAAAGATACCTACATCATGCGTATTGATGTGATCATTCCGA
GCATTACCGGTAGCGTTAACACCTAACACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG
20 AAGGAGATATAGCGATGACCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATCGATAAAAT
TCTGTGGAACATCCTGGGTGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTG
GTGAACAGCGTTGCGAACACCATTTACCAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGAT
AAGCTGAAAGTGATCATCGAATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACA
TCTACGATAACGACAGCATCCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTG
25 GTAGCAAAACCATCGGCAAGAACAGCACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAG
ATATCGCGGTGATTAAGCTGAGCGATATTGAGGCGGGCGAAAACCTGGTTCAAGA
AAAGCCCGAAAATCAGCAGCAAGCAGTTTCAAAGCGTTGACAAAGTTGAGGTGG
CGACCTACGAAGACCTGATCAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGATTTATAA
GGAAAGCCACTACATCCGTCGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCG
30 CAATTCGAGCAGAAGAGCAAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACC
GCGACCGCGATTAGCGTGGTTTTTGTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTT
ATTCTGCTGGACAAGTGCGGTCTGCGCCTGCCGTTCTGGAGAACAAATTTGTT
CACCACGGTAACAAGTATGAACAAATCGGCACCATGTTCTACAGCTTTCGTAACA
ACGTTGAGGTGGGTGAGTACGGCCTGCTGCAGCACAGCGGTCACAAGTTTATCG
35 CGGCGAGCCCGGATGGCATCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGGTGGCCTGAGCA
AACTGGTGGGTCTGCTGCTGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCAACA
ACAGCGGTGATCTGGACGGCGATATCTGCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGC
AAACCCAGCTGTATGTTACCGAGATGGACGAATGCGACTTCTGCAGTGCAAAA
TTGACGAGTACGATAGCTGGGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTC
40 CGGGTCTGAGCAAAACCACCAACCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCG
ACAAAAACCTGATCGGCAGCGACGACAAGGAAAAATGCCTGTATAACAGCAAATA
CATCTATCCGCCGAAGCTGCACATGACCAACGAGGAAATCGAGAAGTGGAATTAG
CAGCGAAATCATGAACTACCACAACAACGACCTGAGCGAGAACTATATGATTGAT
CGTGTGATCTACTGGCGTCTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAAC
45 AAAGAAGCGTTTCGAGGAAAAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTT
CTGTTTTATCGTCAGCACAGCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAG
AAGGTTAAAGAAGATAACAGCGCGGAGATTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTTC
TGAGCCTGAACAAAGATAGCAAGTACGAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAAT
GGCGTAAGAAATATAACCAAATCAAGGCGAAGAAAGCGCAGATGTACAAGAACA
50 AGAGCTACAACAAGTACACCAAGTTCAGCAACCTCGAGCACCACCACCACCA

CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC
CGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGG
TTTTTTG.

- 5 SEQ. ID. N°23 : séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de
résistance à la tétracycline

CACCCTGGATGCTGT

SEQ.ID. N°24 : séquence de 28 nt du virus zébravirus

AATCTGATAATGAATCTGATAATGAATC

SEQ.ID. N°25 : vecteur PP14

- 10 CCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG
AGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGAT
15 AACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACC
GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTT
CTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTG
ACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGAC
20 GGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGC
GGTAAAGCTCATCAGCGTGGTTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCAT
CCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAA
GCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTA
25 AGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCT
CACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGG
TAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCA
ATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCA
TCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTT
30 CAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCA
GACGTTTTGTCAGCAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTC
TGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGC
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCG
CCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAA
35 GATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCG
GTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCAT
GATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCG
GAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGC
CTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
40 TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
GGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGG
CAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTC
CACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGG
GATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCA
45 CCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGA

TCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATT CAGCATTTGCATG
GTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCT
GAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCG
AGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGA
5 CCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTT
GATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTG CAGGC
AGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCA
CTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCG
CTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATT
10 TAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAA
CGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAA
TGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAC
GTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATA
CTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTC
15 TCTTCCGGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTG
TCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAG
TAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGA
GATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAA
ACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTC
20 GGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGAT
GCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACT
ATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
TTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAA
AATATTTTACTTGTTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAAT
25 ATGTTTCATGTGGTTTTCAAATAGGTACAGATAAAACTTATATTGAAAGTCCAGT
ATATATTGACATTAAATTAGATGATGATGATTCTGTTAAAGCGTTTTTATTCTTGT
AATTTATTCACGATGATTCATACATCCAAAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCAT
TTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATAGTGAAAGTGATGTTGGAA
GTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCAGAAAATCATA
30 CTCAAATAATAACAAATACTCCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATTCA
TCAAATAATTCCACTCAATCCACCCTGGATGCTGTTAATGAATCCACCCTGGATG
CTGTCAATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTGGACCTCGATCCAC
CCTGGATGCTGTTGAAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAAT
ATTGGTAATTCAAATAGTATCACCTGGATGCTGTATCTATGACTGAAAAAGCTG
35 GAATAATTTTGTAAACGAAATTAACCATGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAA
AAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTCGTCCAAGCGGACAGTAT
GTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGATCATTTTCATACCAATA
AAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGA
AATGTTTATGTACTCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTA AAAAAT
40 ACCAGGCATCTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAA
TGGTATTAATGGAAGTATTTCAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATA
GAATTTTGTGATAATTTCTTTTATACTTATGAATCCAATACTTGTTATCATCATG
TTATTTCACTTACAAAAATGTAAATTATTATCCTTCTTGGATATATTTCAAATCT
GAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATACTAATAGTGTGT
45 ATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTTGA
AAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTAT
AGACCAATGGAAATGAGACTACTATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATT
ACAATTTTAATGGATGTGAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAA
TCAATATGTACCTCATATTATCGGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTT
50 ATTGTCATAAATCCAAATATGTTGACGATAACAACCTGACGATGGTAAAATTTTCT

TTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTATAATGGAATCGTTTATCTT
GATAATGGTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTTTACAGATCAAAATGTAT
GGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTTA
CCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATT
5 GTTCTAAAATTAATTGGAAACAAATATTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATA
CTGCTCAAGATTTTAAGACAAGATGTGGGGAAATTTTATTGAAAAATAATTCAGT
TCTTGAACCTCGTTAATACTAGTATTATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACT
ACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTACTACTCATAATTCTTTCGAGAGAT
TGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTCTATTCTGAATTGT
10 AGACGACAAAAATATTGTTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGAATCG
GCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTACACAGAGT
TTAATTTACAAGAATTTGCCAACTGAAACCCACCGAAATTAATATTTTGGGATC
AATGTTTCATATGGTTATCTGTCAAAATAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCT
CTAGCTTTTGGCTGTAGAAATTTATGGAAAAGAACCCACAATTGATGAATTGGAAT
15 ATTTTGTCTGTAATGAAGATGAACTGGATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATA
CAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCTTATGAACATTGTCTAAAA
ACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAAATATCTTGACGAAAA
AATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACAT
AAAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCCATACAAAATT
20 AATAGAACCATATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAATA
ATAATTATTTGGAAATGTTCAAAGAATTTATTAACCTTTTGTCTGAAAATGAATT
AAAAATCTTGCTAAAAAATTGGACAGCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAA
TATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACGCTAAAGCAGGTATTCGATTTG
GTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTTGGATGAACATAATAT
25 TGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAAGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
CAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGA
TAACAATTCCCACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCAA
30 TGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGAACCCGGAGCCGAGCATCGAAAACC
CGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCTGGGTAAACAACAGCGTGTATAAAAGCG
ACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCCCGATCTGGATTCTGA
AGAATTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTGTAAGAGAACGAAGACCC
GTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCAGGAATTCGTGGGCCA
35 ATACCTGAACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCTGTACCATGGTCTGGG
TAGCGGCAAGACCGCGAGCGCATCAACCTGATGAACATTCTGTACAACATATGA
CAACGGCACCAACTTTATCGTTCTGATTAAGCGAGCCTGCACAACGACCCGTGG
ATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTGCTGATCCGAGCGAACAGAACGTGGAC
AACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCGTGCACTATGACAGCC
40 CGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCTGGACCTGAGCAAAC
CGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACCTTTATCCGTAACGTGTATAGCAA
CATTAAACAGCAAACCTGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTACGAGTACATCATGAA
GGACAAGCGTGAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATTAGCGCGACCCCGGC
GATCAACACCCCGTTTGAACCTGGCGCTGATGTTTAACTGCTGCGTCCGGGTAT
45 TTTCCCGAGCAGCGAGCTGGATTTCAACCGTACCTTTGTGACCGAAAGCAGCTA
CCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGAGCGTCGTATCCTGGGCCT
GGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCGCGTCAAGAACTGAA
GTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCTACCGTATTTTCGAG
AAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCGTGCTGGCAAGCAGAGCCAA
50 CTGTACCGTACCTATACCCGTCAGGCGTGCAACTTCGTGTTTCCGTACGTTAACA

TGAACGTGAACGGTGAACCTGCGTCCGCGTCCGGGCAAGTTCCGTCTGAGCGAAA
AACTGGCGGACGATTTTAGCAAGGGCAAAAACCTGGACGTTCCGGATACCGAGA
AAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGATTGAGAACTACCTGAACGAGACCGA
ACGTTATTTTCAGAACATCAACAAGAAAGACGCGGAGAACGGTCGTACCATCATT
5 AACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAAGTTCAACAGCTTTCTGC
AGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCTGACCGAAATGTACAACT
GCAGCCCGAAAATGCTGGCGATCGCGTTCATGACCTATATTAGCCCGGGCAAGG
TGATGATCTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCATCGACGTTATGAAAATTTA
CTTTCGTCTGATCGGTTTTCAACGATTTTACGATCGCGCGTGAGTACATGGGCTAT
10 TGCGAATACCACGGTCGTATCGACCCGAAGGATCGTGTGCGTATCAAGAACATG
TTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAAGTGCAAAGTTATCATGCTGAGCC
CGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATCCGTCAGGAGCACATTATGG
AACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTGATTGGCCGTGGTGTTCGTC
AATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGTATCGTGGATATTTACCGTT
15 ATAAGGTTATCAAACCGGAAAACCTGGACCCGGACGATACCGTGCGTCAAAGCA
CCGACGAGTACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAAGCGAACCTGATTGAGAGCT
TCCTGGGCGCTATGAAAGAAGCGGCGGTTGATTGCGAGCTGTTTAAGGAACACA
ACATGATGAGCCAGAGCTACTATTGCTTCAAATTTCCGGAGAGCGCGGTGACCA
AGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACATCAAGGACGATGTGAAATATG
20 ATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGCGTATTCGTGTGGTTAAGG
TGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAACCCGGTGTATAGCAGCCC
GACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGTTTATGACTTCGAGACCCAC
TACCCGGTGGGTCAGGTTGAATTTATCGATAACCTGCCGAACAAGCTGGACAAA
GATACCTACATCATGCGTATTGATGTGATCATTCCGAGCATTACCGGTAGCGTTA
25 ACACCTAACACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCGATGA
CCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATCGATAAAATTCTGTGGAACATCCTGGG
TGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTGGTGAACAGCGTTGCGAAC
ACCATTTACCAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGATAAGCTGAAAGTGATCATCG
AATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACATCTACGATAACGACAGCAT
30 CCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTGGTAGCAAAACCATCGGCAA
GAACAGCACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAGATATCGCGGTGATTAAGCT
GAGCGATATTGAGGCGGGCGAAAACCTGGTTCAAGAAAAGCCCGAAAATCAGCAG
CAAGCAGTTTCAAAGCGTTGACAAAAGTTGAGGTGGCGACCTACGAAGACCTGAT
CAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGATTTATAAGGAAAGCCACTACATCCGT
35 CGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCGCAATTTCGAGCAGAAGAGC
AAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACCGCGACCGCGATTAGCGTG
GTTTTTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTTATTCTGCTGGACAAGTGCG
GTCGTGGCCTGCCGTTCTGTTGAGAAACAATTTGTTTACCACGGTAACAAGTATG
AACAAATCGGCACCATGTTCTACAGCTTTTCGTAACAACGTTGAGGTGGGTGAGT
40 ACGGCCTGCTGCAGCACAGCGGTCACAAGTTTATCGCGGCGAGCCCGGATGGCA
TCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGGTGGCCTGAGCAAACCTGGTGGGTCGTCTGC
TGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCAACAACAGCGGTGATCTGGACG
GCGATATCTGCCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGCAAACCCAGCTGTATGTTAC
CGAGATGGACGAATGCGACTTCCTGCAGTGCAAATTTGACGAGTACGATAGCTG
45 GGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTCCGGGTCTGAGCAAAACCAC
CAACCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCGACAAAAACCTGATCGGCAG
CGACGACAAGGAAAAATGCCTGTATAACAGCAAATACATCTATCCGCCGAAGCTG
CACATGACCAACGAGGAAATCGAGAAGTGATTAGCAGCGAAATCATGAACTAC
CACAACAACGACCTGAGCGAGAATAATGATTGATCGTGTGATCTACTGGCGT
50 CTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAACAAAGAAGCGTTTCGAGGAA

AAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTTCTGTTTTATCGTCAGCACA
 GCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAGAAGGTTAAAGAAGATAACA
 GCGCGGAGATTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTCTGAGCCTGAACAAAGATA
 GCAAGTACGAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAATGGCGTAAGAAATATAACC
 5 AAATCAAGGCGAAGAAAGCGCAGATGTACAAGAACAAGAGCTACAACAAGTACA
 CCAAGTTCAGCAACCTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAA
 CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
 ATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG
 AACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
 10 GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG
 CCGGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTCCCC
 GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC
 ACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGC
 CCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG
 15 ACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAT
 TTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
 AAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAGGTGGCAC
 TTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCA
 AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAA
 20 AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
 GGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
 GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGC
 GGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTT
 TTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
 25 AACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
 CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC
 CATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
 CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
 30 ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTAC
 TTAAGTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
 CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT
 CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG
 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
 35 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
 AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTT
 TTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
 CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
 40 ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT
 CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTG
 TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA
 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAA
 45 CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
 GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTT

SEQ. ID. N°26 : séquence du premier spacer du gène R349 modifié
 (N.B. : ne pas tenir compte du premier nucléotide A ajouté uniquement

pour faire un total de 10 nt comme requis par le logiciel de listage de séquence)

ATAATGAATC

SEQID°27 : séquence du deuxième spacer du gène R349 modifié

5 CAATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGAAGTGTGGACCTCGATC

SEQ. ID. N°28 : séquence du troisième spacer du gène R349 modifié

TGAAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTGAGATAATATTGGTAATTCA
AATAGTAT

SEQ. ID. N°29 : séquence sens d'ARN spécifique du gène GFP

10 GCUGGACGGCGACGA

SEQ. ID. N°30 : séquence anti sens d'ARN spécifique du gène GFP

ACGUCGCCGUCCAGC

SEQ.ID.N°31: séquence du Promoteur T7

TAATACGACTCACTATAG

15 SEQ.ID.N°32: séquence de l'opéron Lac

GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC.

SEQ.ID.N°33 : séquence du terminateur T7

CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

SEQ.ID.N°34 :séquence de l'étiquette polyhistidine

20 CACCACCACCACCACCAC

SEQ.ID. N°35 : Séquence du plasmide pACYC184 portant le gène de résistance à la tétracycline

GAATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATA
AAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGA
25 ACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTT
TACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCAT
TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGT
GATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTC
ATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGAT
30 TTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGC
GTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTG
CTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCTGTTTCAGCTACTGACGGGGT
GGTGCGTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTG

GCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGA
GAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCG
CTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTTCACTGCGGCGAGCGGAAA
TGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACA
5 GGGAAGTGAGAGGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA
CAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCT
GCCTTTCGTTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTTGTCTCATTCCA
CGCCTGACACTCAGTTCGCGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCAC
10 GAACCCCCCGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGCTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGAAGACATGCAAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGAT
TTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAACTGAAAGGACA
AGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTA
GCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTCAGAG
15 CAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGA
TAAAATATTTCTAGATTTTCAAGTCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGT
CAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAA
GCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGT
ATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTG
20 TAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGGATATCGTCC
ATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGA
TGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCC
GCCAGTCCTGCTCGCTTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGG
CGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCA
25 CCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGG
AAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGCGGTATGG
TGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCAT
TCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAA
TGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACC
30 CAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGA
CTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCA
TTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCTTG
CGGTATTCGGAATCTTGACGCCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCAGTGGTCCCGCCAC
CAAACGTTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCT
35 GGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTAT
GATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTC
CAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCT
TACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCC
TCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTT
40 GTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGA
ATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCAACCACTCCAAGAATTGGAGCCA
ATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATC
CATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGG
GTCCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGAGGACCCGGCTAGG
45 CTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAAC
GTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGT
CTTCGGTTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCCCCTACGTGCTG
CTGAAGTTGCCCGCAACAGAGAGTGGAACCAACCGGTGATACCACGATACTATG
ACTGAGAGTCAACGCCATGAGCGGCCTCATTTCTTATTCTGAGTTACAACAGTCC
50 GCACCGCTGTCCGGTAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCC

GCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCG
 CCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCG
 CCCTGCACCAATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGT
 5 GGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTAACCGTTTTTATCAGGCTCTGGGA
 GGCAGAATAAATGATCATATCGTCAATTATTACCTCCACGGGGAGAGCCTGAGC
 AAACTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAA
 TAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAA
 CCGACGACCGGGTTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATC
 ACTTATTCAGGCGTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAA
 10 ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCT
 GCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCAT
 CAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAA
 GAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGA
 TTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGT
 15 TTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATC
 GTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAAC
 GGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCC
 ATACG

SEQ.ID. N°36 : séquence du gène de résistance à la tétracycline

20 ATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATA
 GGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGC
 CAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCT
 CGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCTGCTACTTGGAGCCA
 CTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCG
 25 TGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGAT
 GGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGCGGTATGGTGG
 CAGGCCCGTGCGCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCG
 GCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGG
 AGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGG
 30 GCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGC
 CGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGC
 CTGTCTGCTTGGGTATTCGGAATCTTGACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCC
 ACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTA
 CGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTC
 35 CGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATC
 AGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTG
 ATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGG
 CGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCT
 CGACCTGA

40 SEQ.ID. N°37 : séquences organisées en opéron incluant le gène R349
 modifié avec séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de
 résistance à la tétracycline (SEQ ID N°39) et les gènes R350 et 354.

45 TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAAT
 AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCT
 TTAATCATGGAGAAAATATTTTACTTGTTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTAT
 GGGTAATAATGAATATGGTTCATGTGGTTTCAAATAGGTACAGATAAACTTAT

ATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTAGATGATGATGATTCTGTTAAAG
CGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTCATACATCCAAAGGAAAAATTTA
TCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATAGTGAA
AGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGAT
5 TCAGAAAATCATACTCAAAATAATACAAATACTCCCATAAATAATATCACACTAAT
TAATTTGGATTCATCAAAATAATTCCACTCAATCCGGCTCTTACCAGCCTAATGAA
TCCGGCTCTTACCAGCCCAATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTG
GACCTCGATCCGGCTCTTACCAGCCTGAAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAA
TAATTCAGATAATATTGGTAATTCAAATAGTATCGGCTCTTACCAGCCATCTATG
10 ACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTAAACGAAATTAACCATGGTAGATGAAA
TTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTCGTCC
AAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGTATC
ATTTCATACCAATAAAAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATC
CTTTTCGTTGAAGAAATGTTTATGTACTCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCA
15 TACCATTTAAAAAATACCAGGCATCTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTCATACAAT
TAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGTATTTCAAATAGTGTTTCCATTT
GACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTCTTTTATACTTATGAATCCAATA
CTTGTTATCATCATGTTATTTTATTCTACAAAAATGTAAATTATTATCCTTCTTG
ATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTG
20 ATACTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATTT
CAATAATTCTCTTGAAAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATT
GTGCCTGATAGTTATAGACCAATGGAAATGAGACTACTATTAAGTTAGGTATAA
CATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGATGTGAGGATGATGAAGAACATATTTT
CGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATATTATCGGTCTGAATTATTTTGAA
25 AGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAATATGTTGACGATAACAACCTGACG
ATGGTAAAATTTTCTTTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTATAAT
GGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTT
CAGATCAAAATGTATGGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTC
TACCATATATAGTTACCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCT
30 TCGTCTGAATTTATTGTTCTAAAATTAATTGGAAACAAATATTTTTATTATCCGG
TTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAAGACAAGATGTGGGGAAATTTTATT
GAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAATACTAGTATTATTAACAGACAATCT
AAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTACTACTCATA
ATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATA
35 TTCTATTGCAATTGTAGACGACAAAAATATTGGTTTTGGTGATGGGCCTAAAATT
GAATTTTGTGAATCGGCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATA
ATTTTCACACAGAGTTTAATTTACAAGAATTTGCCAACTGAAACCCACCGAAAT
TAAATATTTGGGATCAATGTTTCATATGGTTATCTGTCAAATAATTCTTCGTTA
CCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGTGCTAGAAATTTATGGAAAAGAACCCACAA
40 TTGATGAATTGGAATATTTTGCTTGTAATGAAGATGAACTGGATTCAAACATAT
TTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCTTAT
GAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAA
ATATCTTGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAGATACGG
CAATATCAAGAACATAAAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCT
45 GGCCCATACAAAATTAATAGAACCATATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAG
GTAAGGATAAAAAATAAATTATTTGGAAATGTTCAAAGAATTTATTAACCTTTT
GTCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAAATTGGACAGCATCAACTTGTGTA
AGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACGCTAAAG
CAGGTATTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTT
50 GGATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGA

TTCAAAGATTAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT
GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTC
TTGAGGGGTTTTTTGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
GGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG
5 AAGGAGATATAGCAATGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGAACCCGGAGC
CGAGCATCGAAAACCCGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCCGGGTAACAACA
GCGTGTATAAAAGCGACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCC
CGATCTGGATTCTGAAGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTCTGTAA
AGAGAACGAAGACCCGTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCA
10 GGAATTCGTGGGCCAATACCTGAACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCT
GTACCATGGTCTGGGTAGCGGCAAGACCGCGAGCGCGATCAACCTGATGAACAT
TCTGTACAACTATGACAACGGCACCAACTTTATCGTTCTGATTAAAGCGAGCCTG
CACAACGACCCGTGGATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTCTGTGATCCGAGC
GAACAGAACGTGGACAACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCG
15 TGCATATGACAGCCCGTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCT
GGACCTGAGCAAACCGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGT
AACGTGTATAGCAACATTAACAGCAAACCTGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTAC
GAGTACATCATGAAGGACAAGCGTGAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATT
AGCGCGACCCCGCGATCAACACCCCGTTTCAAACTGGCGCTGATGTTTAACTG
20 CTGCGTCCGGGTATTTTCCCGAGCAGCGAGCTGGATTTCAACCGTACCTTTGTG
ACCGAAAGCAGCTACCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGAGCGT
CGTATCCTGGGCCTGGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCG
CGTCAAGAACTGAAGTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCT
ACCGTATTTTCGAGAACTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCTGTCGTG
25 GCAAGCAGAGCCAACTGTACCGTACCTATACCCGTGAGGCGTGCAACTTCGTGT
TTCCGTACGTTAACATGAACGTGAACGGTGAACCTGCGTCCGCGTCCGGGCAAGT
TCCGTCTGAGCGAAAACTGGCGGACGATTTTAGCAAGGGCAAAAACCTGGACG
TTCCGGATACCGAGAAAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGATTGAGAACTA
CCTGAACGAGACCGAACGTTATTTTCAGAACATCAACAAGAAAGACGCGGAGAA
30 CGGTCTGATACCATCATTAACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAA
GTTCAACAGCTTTCTGCAGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCT
GACCGAAATGTACAACTGCAGCCCGAAAATGCTGGCGATCGCGTTTATGACCTA
TATTAGCCCGGGCAAGGTGATGATCTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCAT
CGACGTTATGAAAATTTACTTTCTGTCTGATCGGTTTCAACGATTTTACGATCGCG
35 CGTGAGTACATGGGCTATTGCGAATACCACGGTCGTATCGACCCGAAGGATCGT
GTGCGTATCAAGAACATGTTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAAGTGC
AAAGTTATCATGCTGAGCCCGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATC
CGTCAGGAGCACATTATGGAACCGTATTGGACCGAAGTTCGTATCCAGCAAGTG
ATTGGCCGTGGTGTTCTGTCAATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGT
40 ATCGTGGATATTTACCGTTATAAGGTTATCAAACCGGAAAACCTGGACCCGGAC
GATACCGTGCGTCAAAGCACCGACGAGTACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAA
GCGAACCTGATTGAGAGCTTCTGGGCGCTATGAAAGAAGCGGCGGTTGATTGC
GAGCTGTTTAAGGAACACAACATGATGAGCCAGAGCTACTATTGCTTCAAATTTT
CGGAGAGCGCGGTGACCAAGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACATCA
45 AGGACGATGTGAAATATGATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGC
GTATTCGTGTGGTTAAGGTGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAA
CCCGGTGTATAGCAGCCCGACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGT
TTATGACTTCGAGACCCACTACCCGGTGGGTGAGGTTGAATTTATCGATAACCTG
CCGAACAAGCTGGACAAGATACCTACATCATGCGTATTGATGTGATCATTCCGA
50 GCATTACCGGTAGCGTTAACACCTAACACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG

AAGGAGATATAGCGATGACCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATCGATAAAAT
 TCTGTGGAACATCCTGGGTGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTG
 GTGAACAGCGTTGCGAACACCATTTACCAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGAT
 AAGCTGAAAGTGATCATCGAATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACA
 5 TCTACGATAACGACAGCATCCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTG
 GTAGCAAAACCATCGGCAAGAACAGCACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAG
 ATATCGCGGTGATTAAGCTGAGCGATATTGAGGCGGGCGAAAACCTGGTTCAAGA
 AAAGCCCGAAAATCAGCAGCAAGCAGTTTCAAAGCGTTGACAAAGTTGAGGTGG
 CGACCTACGAAGACCTGATCAGCCACAAGCACGATTACCCGAAAGAGATTTATAA
 10 GGAAAGCCACTACATCCGTCGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCG
 CAATTCGAGCAGAAGAGCAAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACC
 GCGACCGCGATTAGCGTGGTTTTTGTATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTT
 ATTCTGCTGGACAAGTGCGGTCTGCGCCTGCCGTTCTGTTGAGAAACAAATTTGTT
 CACCACGGTAACAAGTATGAACAAATCGGCACCATGTTCTACAGCTTTCGTAACA
 15 ACGTTGAGGTGGGTGAGTACGGCCTGCTGCAGCACAGCGGTCAACAAGTTTATCG
 CGGCGAGCCCGGATGGCATCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGGTGGCCTGAGCA
 AACTGGTGGGTCTGCTGCTGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCAACA
 ACAGCGGTGATCTGGACGGCGATATCTGCCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGC
 AAACCCAGCTGTATGTTACCGAGATGGACGAATGCGACTTCCTGCAGTGCAAAA
 20 TTGACGAGTACGATAGCTGGGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTC
 CGGGTCTGAGCAAAACCACCAACCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCG
 ACAAAAACCTGATCGGCAGCGACGACAAGGAAAAATGCCTGTATAACAGCAAATA
 CATCTATCCGCCGAAGCTGCACATGACCAACGAGGAAATCGAGAAGTGGAATTAG
 CAGCGAAATCATGAACTACCACAACAACGACCTGAGCGAGAATAATATGATTGAT
 25 CGTGTGATCTACTGGCGTCTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAAC
 AAAGAAGCGTTCGAGGAAAAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTT
 CTGTTTTATCGTCAGCACAGCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAG
 AAGGTTAAAGAAGATAACAGCGCGGAGATTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTT
 TGAGCCTGAACAAAGATAGCAAGTACGAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAAT
 30 GCGGTAAGAAATATAACCAAATCAAGGCGAAGAAAGCGCAGATGTACAAGAACA
 AGAGCTACAACAAGTACACCAAGTTCAGCAACCTCGAGCACCACCACCACCA
 CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC
 CGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGG
 TTTTTTG

35 SEQ. ID. N°38: Gène R349 modifié avec des séquences répétées du
 gène de résistance à la tétracycline (SEQ ID N°39)

ATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAAAATATTTTACTTGTAGTT
 CTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAATATGGTTCATGTGGTTTCAA
 AATAGGTACAGATAAACTTATATTGAAAGTCCAGTATATATTGACATTAAATTA
 40 GATGATGATGATTCTGTAAAGCGTTTTATTCTTGTAATTTATTCACGATGATTC
 ATACATCCAAAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCATTTATTTGTGGTGGAGGTGA
 AATCGATGCATATGATAGTGAAAGTGATGTTGGAAGTGATGCTGAGTCTGATGC
 TGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCAAGAAATCATACTCAAATAATAACAATACT
 CCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATTCAATCAATAATTCCACTCAATC
 45 CGGCTCTTACCAGCCTAATGAATCCGGCTCTTACCAGCCCAATGAATCTGATCAA
 TCATGTAGTGATTTTGAAGTGTGGACCTCGATCCGGCTCTTACCAGCCTGAAGAA
 GTTTTTGTTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAAATTTGGTAATTCAAATAGTA
 TCGGCTCTTACCAGCCATCTATGACTGAAAAAGCTGGAATAATTTTGTAAACGA

AATTAAAACCATGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAAAAATATTAATTCTGTTGGA
 ATTAACGATATTGTTATTCGTCCAAGCGGACAGTATGTGAGTAATATGGGATATA
 TTACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTTCATACCAATAAAAAATGGTTTCTTATTATT
 CAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGAAATGTTTATGTACTCTAAA
 5 AATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAAAAAATACCAGGCATCTCTAAGAG
 ATATTGCTCCTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAATGGTATTAATGGAAGTA
 TTTCAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATAGAATTTTGTGATAATTTTC
 TTTTATACTTATGAATCCAATACTTGTTATCATCATGTTATTTTCATTCTACAAAAA
 TGTAATATTATCCTTCTTGGATATATTTCAAATCTGAGATTGATATTAATAGT
 10 AAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATACTAATAGTGTGTATGTTAAAGATAATAACA
 ACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTTGAAAAATACATCGATAACAA
 ACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTATAGACCAATGGAAATGAG
 ACTACTATTAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATTACAATTTTAATGGATGT
 GAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAATCAATATGTACCTCATA
 15 TTATCGGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTTATTGTCAATAATCCAAA
 TATGTTGACGATAACAACCTGACGATGGTAAAATTTTCTTTAACATTTCATGATATT
 ACTTTTTACAAAAGATTTTATAATGGAATCGTTTATCTTGATAATGGTTCGTTAT
 TTTATCTCACAGATAGTGAAATTTGAGATCAAAATGTATGGAACTAACTGGATG
 TCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTTACCTATTTAATTTACCG
 20 GACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATTGTTCTAAAATTAATTG
 GAAACAAATATTTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATACTGCTCAAGATTTTAA
 GACAAGATGTGGGGAAATTTTCATTGAAAAATAATTCAGTTCTTGAACCTCGTTAAT
 ACTAGTATTATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACTACAGTATCTATTAATAT
 TGATACGGATTGTACTACTCATAATTCTTTTCGAGAGATTGTTTATCCTGACACAA
 25 TCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTCTATTTCGAATTGTAGACGACAAAAATATTG
 GTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGAATCGGCTATTATGCAATTTTA
 TTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTACACAGAGTTTAATTTACAAGAATTT
 GCCAACTGAAACCCACCGAAATTAATATTTGGGATCAATGTTTCATATGGTTA
 TCTGTCAAAATAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCTCTAGCTTTTGCTGTAGA
 30 AATTTATGGAAAAGAACCCACAATTGATGAATTGGAATATTTTGCTTGTAATGAA
 GATGAACTGGATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATACAATCCCGAATTAGTTA
 AAGAATTCGGTTATGAATCTTATGAACATTGTCTAAAACTTTGTGTAAATATAA
 TTATGAAGATGATACTGATAAAATATCTTGACGAAAAAATATTGCGAGCAATTA
 GCTGCCGGTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACATAAAACAAATGAATTTAC
 35 CCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCATACAAAATTAATAGAACCATATTAAT
 TAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAAATAATAATTATTTGGAAATG
 TTCAAAGAATTTATTAATCTTTGTCTGAAAATGAATTAATAATCTTGCTAAAAA
 ATTGGACAGCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAATATAGAATTATCATTAT
 TTCAAATCTAAAAACGCTAAAGCAGGTATTTCGATTTGGTACTTGTAATTTAGAA
 40 ATTCATATCGACGAAAAAATGTTGGATGAACATAATATTGATACAGTCAAAGAGG
 TTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAA

SEQ. ID. N°39 : séquence spécifique de 15 nucléotides du gène de résistance à la tétracycline

CGGCTCTTACCAGCC

45 SEQ. ID. N°40 : vecteur PP37

CCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG
AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
CGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
5 TTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGAT
AACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACC
GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTT
CTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACCTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTG
10 ACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGAC
GGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGC
GGTAAAGCTCATCAGCGTGGTTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCAT
CCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAA
15 GCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTA
AGGGGGATTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCT
CACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGG
TAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCA
ATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCA
20 TCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTT
CAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCA
GACGTTTTTGAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTC
TGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGC
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCG
25 CCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAA
GATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCG
GTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCAT
GATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCAACG
GAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCT
30 CTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
GGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGG
CAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTC
CACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGG
35 GATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCA
CCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGA
TCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATG
GTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCT
GAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGACGACGCGCCG
40 AGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGA
CCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTT
GATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGC
AGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCA
CTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCG
45 CTTTCGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATT
TAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAA
CGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAA
TGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAC
GTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATA
50 CTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTACCACCCTGAATTGACTC

TCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTG
TCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAG
TAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGA
GATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAA
5 ACAAGCGCTCATGAGCCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTC
GGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGAT
GCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACT
ATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
TTAAGAAGGAGATATAGATATGGAATTAATTAGTCGTGTCTTTACTCATGGAGAA
10 AATATTTTACTTGTAGTTCTACAAATAAGTTATATATTATGGGTAATAATGAAT
ATGGTTCATGTGGTTTCAAATAGGTACAGATAAACTTATATTGAAAGTCCAGT
ATATATTGACATTAAATTAGATGATGATGATTCTGTTAAAGCGTTTTATTCTTGT
AATTTATTACGATGATTCATACATCCAAAGGAAAAATTTATCTATCAAGATCAT
TTATTTGTGGTGGAGGTGAAATCGATGCATATGATAGTGAAAGTGATGTTGGAA
15 GTGATGCTGAGTCTGATGCTGAGTCTGATGCTGAATCAGATTCAGAAAATCATA
CTCAAATAATACAAATACTCCCATAAATAATATCACACTAATTAATTTGGATTCA
TCAAATAATTCCACTCAATCCGGCTCTTACCAGCCTAATGAATCCGGCTCTTACC
AGCCCAATGAATCTGATCAATCATGTAGTGATTTTGACTGTGGACCTCGATCCGG
CTCTTACCAGCCTGAAGAAGTTTTTGTGATCGTAATGATAATAATTCAGATAAT
20 ATTGGTAATTCAAATAGTATCGGCTCTTACCAGCCATCTATGACTGAAAAAGCTG
GAATAATTTTGTAAACGAAATTAACCATGGTAGATGAAATTTTGTCTCAAAA
AAATATTAATTCTGTTGGAATTAACGATATTGTTATTCGTCCAAGCGGACAGTAT
GTGAGTAATATGGGATATATTACAGAATCAGGTAGTGTATCATTTCATACCAATA
AAAATGGTTTCTTATTATTCAAGTCCAATGTTTCATGAAATCCTTTTCGTTGAAGA
25 AATGTTTATGTACTCTAAAAATAATTTTATTTATTTGGCCATACCATTTAAAAAAT
ACCAGGCATCTCTAAGAGATATTGCTCCTTTTTCATACAATTAATAAAACAAAAAA
TGGTATTAATGGAAGTATTTCAAATAGTGTTTCCATTTGACACTGAAAAAATA
GAATTTTGTGATAATTTCTTTTATACTTATGAATCCAATACTTGTTATCATCATG
TTATTTCAATTCTACAAAAATGTAAATTATTATCCTTCTTGATATATTTCAAATCT
30 GAGATTGATATTAATAGTAAAAATATGTTCTTTTCAAGTGATACTAATAGTGTGT
ATGTTAAAGATAATAACAACGTGTATAAATACCATAATTTCAATAATTCTCTTGA
AAAATACATCGATAACAACTCGACTTGGATGTCGTAATTGTGCCTGATAGTTAT
AGACCAATGGAAATGAGACTACTATTAAAGTTAGGTATAACATTGTATAGCGATT
ACAATTTTAATGGATGTGAGGATGATGAAGAACATATTTTCGAAATTATGAAAAA
35 TCAATATGTACCTCATATTATCGGTCTGAATTATTTTGAAAGTTTCATTGTAGTT
ATTGTCAATAATCCAAATATGTTGACGATAACAACTGACGATGGTAAAATTTTCT
TTAACATTCATGATATTACTTTTTACAAAAGATTTTATAATGGAATCGTTTATCTT
GATAATGGTTTCGTTATTTTATCTCACAGATAGTGAAATTTGAGATCAAAATGTAT
GGAACTAACTGGATGTCAATTGTGTGAGCTAGCTGATTCTACCATATATAGTTA
40 CCTATTTAATTTACCGGACAAAATTGATGAAATTTACTCTTCGTCTGAATTTATT
GTTCTAAAATTAATTGGAAACAAATATTTTATTATCCGGTTGAAAATTTTGATA
CTGCTCAAGATTTTAAGACAAGATGTGGGGAAATTTTCATTGAAAAATAATTCAGT
TCTTGAACCTCGTTAATACTAGTATTATTAACAGACAATCTAAAAGTTATCATACT
ACAGTATCTATTAATATTGATACGGATTGTACTACTCATAATTCTTTTCGAGAGAT
45 TGTTTATCCTGACACAATCTCTTAGTTATTCCGCAGAATATTCTATTCTGAATTGT
AGACGACAAAAATATTGGTTTTTGGTGATGGGCCTAAAATTGAATTTTGTGAATCG
GCTATTATGCAATTTTATTATAAGTATTTAATTGCTCATAATTTTCACACAGAGT
TTAATTTACAAGAATTTGCCAACTGAAACCCACCGAAATTAAATATTTGGGATC
AATGTTTTCATATGGTTATCTGTCAAATAATTCTTCGTTACCGATTAGATTACCT
50 CTAGCTTTTGCTGTAGAAATTTATGGAAAAGAACCCACAATTGATGAATTGGAAT

ATTTTGCTTGTAATGAAGATGAACTGGATTCAAACATATTTATCCAGCCAAATA
CAATCCCGAATTAGTTAAAGAATTCGGTTATGAATCTTATGAACATTGTCTAAAA
ACTTTGTGTAAATATAATTATGAAGATGATACTGATAAAAATATCTTGACGAAAA
AATATTGCGAGCAATTAGCTGCCGGTTTTAAAAGATACGGCAATATCAAGAACAT
5 AAAACAAATGAATTTACCCACATTGGACTATTACATTTCTGGCCCATACAAAATT
AATAGAACCATATTAATTAATAATCTTGTTTTATCGGGAGGTAAGGATAAAAATA
ATAATTATTTGGAAATGTTCAAAGAATTTATTAACCTCTTGTCTGAAAATGAATT
AAAAATCTTGCTAAAAAATTGGACAGCATCAACTTGTGTAAGACCAGATAACAAA
TATAGAATTATCATTATTTCCAAATCTAAAAACGCTAAAGCAGGTATTCGATTTG
10 GTACTTGTAATTTAGAAATTCATATCGACGAAAAAATGTTGGATGAACATAATAT
TGATACAGTCAAAGAGGTTTTAATTACACCTGCTCAAGGATTCAAAGATTAAGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
CAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGA
15 TAACAATTCCCCACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCAA
TGAACCGTCGTAACCGTAGCAACGACCTGAACCCGGAGCCGAGCATCGAAAACC
CGAACAACCAGATTGCGGAGGAATTCCCGGGTAACAACAGCGTGTATAAAAGCG
ACGGCTACGTTGATCTGAAGAACAACGGTCGTCTGTTCCCGATCTGGATTCTGA
AGAACTTTAAACAATACAAGCTGCCGGAGATCATTGTAAGAGAACGAAGACCC
20 GTGCAACGTGCAGGTTAAGCTGGAGCTGCGTAAATATCAGGAATTCGTGGGCCA
ATACCTGAACCCGCAGGGTCCGTATACCAGCATCCTGCTGTACCATGGTCTGGG
TAGCGGCAAGACCGCGAGCGGATCAACCTGATGAACATTCTGTACAACTATGA
CAACGGCACCAACTTTATCGTTCTGATTAAGCGAGCCTGCACAACGACCCGTGG
ATGCAGGACCTGAAGGAGTGGCTGGGTCGTGATCCGAGCGAACAGAACGTGGAC
25 AACGTTACCAAGCTGGATCGTTACAAAAACATCCACTTCGTGCACTATGACAGCC
CGTTTCGCGGATAGCAGCTTTATGAGCGTTATTAAGACCCTGGACCTGAGCAAAC
CGACCATGTACATCATTGATGAGGCGCACAACTTTATCCGTAACGTGTATAGCAA
CATTAAACAGCAAACCTGGGCAAGCGTGCGAAAGTTATCTACGAGTACATCATGAA
GGACAAGCGTGAAAACAAGAACACCCGTATCGTGCTGATTAGCGCGACCCCGGC
30 GATCAACACCCCCGTTTGAACCTGGCGCTGATGTTTAACTGCTGCGTCCGGGTAT
TTTCCCGAGCAGCGAGCTGGATTTCAACCGTACCTTTGTGACCGAAAGCAGCTA
CCCGATCCTGAACCCGATGAAGAAAAACATGTTTGAGCGTCGTATCCTGGGCCT
GGTTAGCTACTATATTGGTGCGACCCCGGACCTGTATGCGCGTCAAGAACTGAA
GTACATCAACCTGCCGATGAGCGCGTACCAGTATGATATCTACCGTATTTTCGAG
35 AAACCTGGAGGCGGAAATTCAAGAACGTGCGCGTCGTGCTGGCAAGCAGAGCCAA
CTGTACCGTACCTATACCCGTCAGGCGTGCAACTTCGTGTTTCCGTACGTTAACA
TGAACGTGAACGGTGAACCTGCGTCCGCGTCCGGGCAAGTTCCGTCTGAGCGAAA
AACTGGCGGACGATTTTAGCAAGGGCAAAAACCTGGACGTTCCGGATACCGAGA
AAGAAATCCTGAACAAGTATACCAAAGCGATTGAGAACTACCTGAACGAGACCGA
40 ACGTTATTTTCAGAACATCAACAAGAAAGACGCGGAGAACGGTCGTACCATCATT
AACGACCTGGATGAATTCAAGAAAGGCTTTGGTACCAAGTTCAACAGCTTTCTGC
AGTACTATCAAAGCGAGGGTCCGCGTAGCAGCCTGCTGACCGAAATGTACAACT
GCAGCCCGAAAATGCTGGCGATCGCGTTTATGACCTATATTAGCCCGGGCAAGG
TGATGATCTACAGCAACTATGTGGTTATGGAAGGCATCGACGTTATGAAAATTTA
45 CTTTCGTCTGATCGGTTTCAACGATTTTACGATCGCGCGTGAGTACATGGGCTAT
TGCGAATACCACGGTCGTATCGACCCGAAGGATCGTGTGCGTATCAAGAACATG
TTCAACGACAAGAACAACGTGTACGGCAACAAGTGCAAAGTTATCATGCTGAGCC
CGAGCGCGACCGAGGGTATTCAACTGCTGGATATCCGTCAGGAGCACATTATGG
AACCGTATTGGACCGAAGTTTCGTATCCAGCAAGTGATTGGCCGTGGTGTTCGTC
50 AATGCAGCCACCGTGACCTGCCGATGAGCGAGCGTATCGTGGATATTTACCGTT

ATAAGGTTATCAAACCGGAAAACCTGGACCCGGACGATACCGTGCGTCAAAGCA
CCGACGAGTACGTTGAAGATCAGGCGAAGAGCAAAGCGAACCTGATTGAGAGCT
TCCTGGGCGCTATGAAAGAAGCGGCGGTTGATTGCGAGCTGTTTAAGGAACACA
ACATGATGAGCCAGAGCTACTATTGCTTCAAATTTCCGGAGAGCGCGGTGACCA
5 AGACCAACGTTGGCCCGGCGTACCGTGAAGACATCAAGGACGATGTGAAATATG
ATAGCGGTCTGAACAGCAAAAACAGCATCGTTGAGCGTATTTCGTGTGGTTAAGG
TGAACGCGGTTTACCAAATCAACACCGACAACAACAACCCGGTGTATAGCAGCCC
GACCAAGTACTGGTATAACAAGAAAACCGGCATGGTTTATGACTTCGAGACCCAC
TACCCGGTGGGTCAGGTTGAATTTATCGATAACCTGCCGAACAAGCTGGACAAA
10 GATACCTACATCATGCGTATTGATGTGATCATTCCGAGCATTACCGGTAGCGTTA
ACACCTAACACTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGCGATGA
CCGACATTAGCTACTATAACAACGAGATCGATAAAATTCTGTGGAACATCCTGGG
TGACGATTATTTACCCAAGACGAATTTGACGATCTGGTGAACAGCGTTGCGAAC
ACCATTTACCAGTATGACAACGAAGTGAGCATCGATAAGCTGAAAGTGATCATCG
15 AATTCGTTATCCTGAACAAGTTCAAGCTGTGCTACATCTACGATAACGACAGCAT
CCTGAACCAAGTGAAATACGAGAAGAAAAGCGTTGGTAGCAAAACCATCGGCAA
GAACAGCACCAACGACGATGAGGACGATGACGAAGATATCGCGGTGATTAAGCT
GAGCGATATTGAGGCGGGCGAAAACCTGGTTCAAGAAAAGCCCGAAAATCAGCAG
CAAGCAGTTTCAAAGCGTTGACAAAGTTGAGGTGGCGACCTACGAAGACCTGAT
20 CAGCCACAAGCAGATTACCCGAAAGAGATTTATAAGGAAAGCCACTACATCCGT
CGTAACACCCGTCTGGATGTGATCAAGAAAATTCCGCAATTCGAGCAGAAGAGC
AAAGAATGGCTGAAACAACGTACCGAGAGCCTGACCGCGACCGCGATTAGCGTG
GTTTTTGATGAAGACCCGTATAAACACCCGATCGTTATTCTGCTGGACAAGTGCG
GTCGTGGCCTGCCGTTCTGGAGAACAATTTGTTCCACCACGGTAACAAGTATG
25 AACAAATCGGCACCATGTTCTACAGCTTTTCGTAACAACGTTGAGGTGGGTGAGT
ACGGCCTGCTGCAGCACAGCGGTCAACAAGTTTATCGCGGCGAGCCCGGATGGCA
TCTGCAGCAAGAAAGCGAACACCGGTGGCCTGAGCAAACCTGGTGGGTCTGCTGC
TGGAGATTAAGTTCCCGTTTAGCCGTGAAATCAACAACAGCGGTGATCTGGACG
GCGATATCTGCCGCACTACTATTTTCTGCAGGTGCAAACCCAGCTGTATGTTAC
30 CGAGATGGACGAATGCGACTTCCTGCAGTGCAAAATTGACGAGTACGATAGCTG
GGAAGACTTTGTGAAGGATAGCAACCCGATCGTTCCGGGTCTGAGCAAAACCAC
CAACCTGGAGAAGGGCTGCCTGATTCAGCTGAGCGACAAAACCTGATCGGCAG
CGACGACAAGGAAAAATGCCTGTATAACAGCAAATACATCTATCCGCCGAAGCTG
CACATGACCAACGAGGAAATCGAGAAGTGATTAGCAGCGAAATCATGAACTAC
35 CACAACAACGACCTGAGCGAGAACTATATGATTGATCGTGTGATCTACTGGCGT
CTGAGCCAAGTTACCTGCAACCTGATTAAGCTGAACAAAGAAGCGTTTCGAGGAA
AAAATCCCGCTGCTGCAGCAATTCTGGGACTACGTTCTGTTTTATCGTCAGCACA
GCGACAAGCTGGATAAACTGATTAAGTTTGTGGAGAAGGTTAAAGAAGATAACA
GCGCGGAGATTTTTCAGCTACATCAACGAAGACTTTCTGAGCCTGAACAAAGATA
40 GCAAGTACGAGCCGCTGTATCAGGAAGAGACCGAATGGCGTAAGAAATATAACC
AAATCAAGGCGAAGAAAGCGCAGATGTACAAGAACAAGAGCTACAACAAGTACA
CCAAGTTCAGCAACCTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAA
CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
ATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGTGTAAGGAGG
45 AACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG
CCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCC
GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC
ACCTCGACCCCAAAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGC
50 CCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG

ACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAT
TTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC
AAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTACGGTGGCAC
TTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCA
5 AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAA
AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGC
GGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTT
10 TTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
AACTCGGTGCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC
CATAACCATGAGTGATAAACAACGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT
15 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTAC
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG
20 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTTCATTT
TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
25 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT
CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTG
TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA
30 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAA
CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTT

Références Bibliographiques

1. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 2014 ; 54 : 234–244.
- 5 2. Desnues C, La SB, Yutin N, et al. Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 18078–18083.
3. Filee J, Chandler M. Gene exchange and the origin of giant viruses. *Intervirology* 2010 ; 53 : 354–361.
- 10 4. Forterre P. Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept. *Intervirology* 2010 ; 53 : 362–378.
5. Gaia M, Benamar S, Boughalmi M, et al. Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity. *PLoS One* 2014 ; 9 : e94923.
- 15 6. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003 ; 299 : 2033.
7. La Scola B, Desnues C, Pagnier I, Robert C, Barrassi L, et al. (2008) The virophage as a unique parasite of the giant Mimivirus, *Nature* 2008 ; 455 : 100–104.
- 20 8. Levasseur A, Bekliz M, Chabrière E, et al. MIMIVIRE is a defence system in Mimivirus that confers resistance to virophage. *Nature* 2016 ; 531 : 249–252.
9. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 4360–4377.
- 25

10. Raoult D. How the virophage compels the need to readdress the classification of microbes. *Virology* 2015 ; 477 : 119–124
11. Sharma V, Colson P, Pontarotti P, Raoult D. Mimivirus inaugurated in the 21st century the beginning of a
5 reclassification of viruses. *Curr Opin Microbiol* 2016 ; 31 : 16–24.
12. J. M. Claverie and C. Abergel, "CRISPR-Cas-like system in giant viruses: why MIMIVIRE is not likely to be an adaptive immune system," *Virol. Sin.* 31(3), 193 (2016).
13. Yutin N, Raoult D, Koonin EV. Virophages, polintons, and
10 transpovirons: a complex evolutionary network of diverse selfish genetic elements with different reproduction strategies. *Virol J* 2013 ; 10 : 158. [CrossRef] [PubMed] [Google Scholar]
14. Casane D, Laurenti P. Le cas CRISPR, mutations « ready-made » et évolution lamarckienne d'un système immunitaire
15 adaptatif. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 640–645. [CrossRef] [EDP Sciences] [PubMed] [Google Scholar]
15. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1014–1022. [CrossRef]
20 [EDP Sciences] [PubMed] [Google Scholar]
16. La Gilgenkrantz H. révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1066–1069. [CrossRef] [EDP Sciences] [PubMed] [Google Scholar]

17. Chao Dou et al « structural and mechanistic analyses reveal a unique cas4-like protein in the Mimivirus virophage resistant element system”, ISCIENCE (2018), 10.1016/j.isci.2018.04.01.
18. Petrov A, Wu T, Puglisi EV, Purification d'ARN de Puglisi JD.
5 RNA purification by preparative polyacrylamide gel electrophoresis, Methods Enzymol 2013, 530: 315- 30.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de modification par coupure et/ou dégradation totale ou partielle d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte
5 comprenant la mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo* avec un système biologique comprenant :

- un premier composant comprenant au moins une protéine choisie parmi les protéines R350 et R354 de virus géant Mimivirus de lignée A ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide
10 nucléique des gènes R350 et/ou R354 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354, et

- un deuxième composant comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dénommée séquence d'affinité, la dite séquence d'affinité comprenant au moins une séquence complémentaire d'une
15 séquence spécifique de ladite séquence cible, la dite séquence spécifique de ladite séquence cible comprenant au moins 10 nucléotides, de préférence 15 nucléotides.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dit deuxième composant comprend la dite la séquence d'affinité sous
20 forme d'ADN ou de préférence sous forme d'ARN.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la dite la séquence d'affinité comprend au moins 2 mêmes dites séquences complémentaires d'une même séquence spécifique, de préférence de 2 à 4, de préférence encore 4 mêmes dites séquences
25 complémentaires d'une même séquence spécifique, répétées de façon espacée.

4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la dite ou chaque dite séquence complémentaire de la même dite séquence spécifique de la séquence d'affinité est flanquée en 3' et 5' de
30 séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du

virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le gène R349 de virus géant Mimivirus.

5 5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les dites mêmes séquences complémentaires de la même séquence
spécifique de la séquence cible sont flanquées en 3' et 5' de séquences
flanquantes différentes les unes des autres entre les différentes mêmes
séquences complémentaires et les dites séquences flanquantes
correspondant respectivement aux séquences flanquantes des
différentes mêmes séquences répétées du virophage zamilon contenues
10 dans ledit gène R349 de Mimivirus.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la dite séquence d'affinité comprend le gène R349 modifié dans lequel seules les 4 séquences répétées de 15 nucléotides du virophage zamilon sont remplacées aux même localisations par les dites 4 mêmes
15 séquences complémentaires d'une dite séquence spécifique de la dite séquence cible.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la dite séquence d'affinité est intégrée dans un vecteur de clonage de la dite séquence d'affinité apte à transformer ou transfecter
20 une dite cellule hôte et y répliquer la dite séquence d'affinité.

8. Méthode selon la revendication 7, caractérisé en ce que la dite séquence d'affinité est intégrée sous forme d'ADN placée sous le contrôle d'un promoteur de transcription apte à transcrire de la dite séquence d'affinité d'ADN en ARN dans la dite cellule hôte.

25 9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la dite cellule hôte est une bactérie ou une cellule eucaryote.

10. Méthode selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le dit premier composant comprend un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique de gène R350 et/ou R354 codant

pour et apte à exprimer respectivement au moins une dite protéine R350 et/ou R354 dans une dite cellule hôte.

11 Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans
5 un même dit vecteur, de préférence un plasmide.

12. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11, pour au moins couper en un site spécifique la dite séquence cible, caractérisé en ce que le dit premier composant comprend au moins la protéine R350 ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide
10 nucléique du gène R350 codant pour respectivement au moins une dite protéine R350.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, pour au moins couper en un site spécifique et dégrader au moins partiellement la dite séquence cible, caractérisé en ce que le dit premier composant
15 comprend au moins la protéine R350 et la protéine R354 ou au moins un vecteur d'expression d'au moins des séquences d'acides nucléiques des gènes R350 et R354 codant pour respectivement au moins les dites protéines R350 et R354.

14. Méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que les dits premier et deuxième composants sont intégrés dans
20 un même dit vecteur comprenant les séquences de Mimivirus de lignée A incluant :

- au moins une partie modifiée du gène R349, de préférence le gène R349 modifié complet, ladite partie modifiée du gène R349
25 incluant une partie du gène 349 incluant au moins une des 4 séquences répétées de 15 nucléotides du virophage zamilon du gène R349, de préférence les 4 séquences répétées, la dite modification de la dite partie modifiée du gène R349 consistant en ce que la (ou les) dite(s) séquence(s) répétée(s) de 15 nucléotides du virophage zamilon du gène
30 R349 est (ou sont) remplacée(s) par une même dite séquence complémentaire d'une séquence spécifique de la dite séquence cible, et

- une séquence permettant la transcription en ARN de ladite partie modifiée du gène R349, de préférence du gène R349 modifié complet dans une dite cellule hôte, et

- les gènes R350 et 354, ainsi que des séquences permettant
5 l'expression des gènes R350 et R354 dans une dite cellule hôte.

15. Système biologique utile pour la mise en œuvre d'un procédé de modification par coupure et/ou dégradation totale ou partielle d'une séquence cible d'acide nucléique d'une cellule hôte comprenant la mise en contact de la dite cellule hôte *in vitro* ou *ex vivo*, tel que défini dans
10 l'une des revendications 1 à 14 comprenant :

- un premier composant comprenant au moins une protéine choisie parmi les protéines R350 et R354 de virus géant Mimivirus de lignée A ou au moins un vecteur d'expression d'au moins une séquence d'acide nucléique des gènes R350 et/ou R354 codant pour respectivement au
15 moins une dite protéine R350 et/ou R354, et

- un deuxième composant comprenant une séquence d'acide nucléique, dénommée séquence d'affinité, la dite séquence d'affinité comprenant au moins une séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible, la dite séquence spécifique de ladite
20 séquence cible comprenant au moins 10 nucléotides, de préférence 15 nucléotides, de préférence la ou chaque dite séquence complémentaire d'une séquence spécifique de ladite séquence cible étant flanquée en 3' et 5' de séquences adjacentes encadrant une séquence de 15 nucléotides du virophage zamilon contenue et répétée 4 fois dans le
25 gène R349 de virus géant Mimivirus de lignée A.

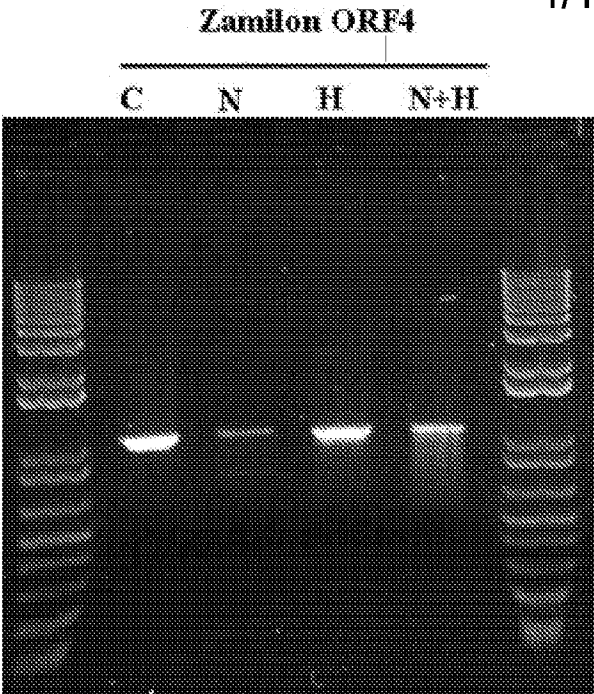


FIG.1A

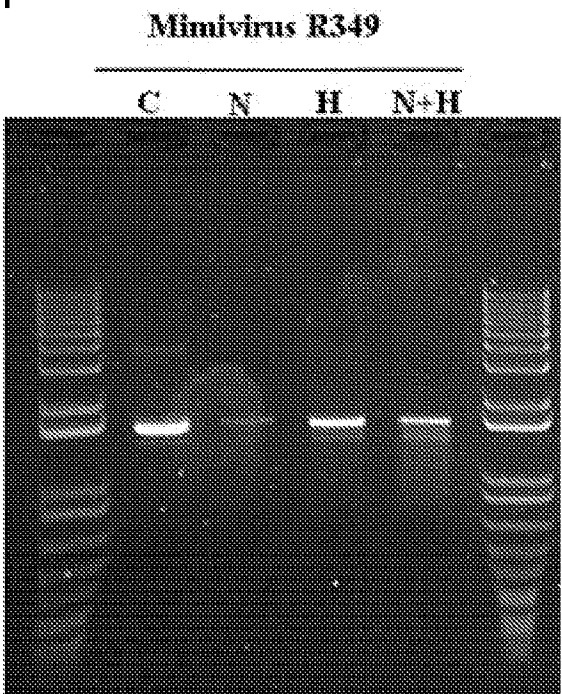


FIG.1B

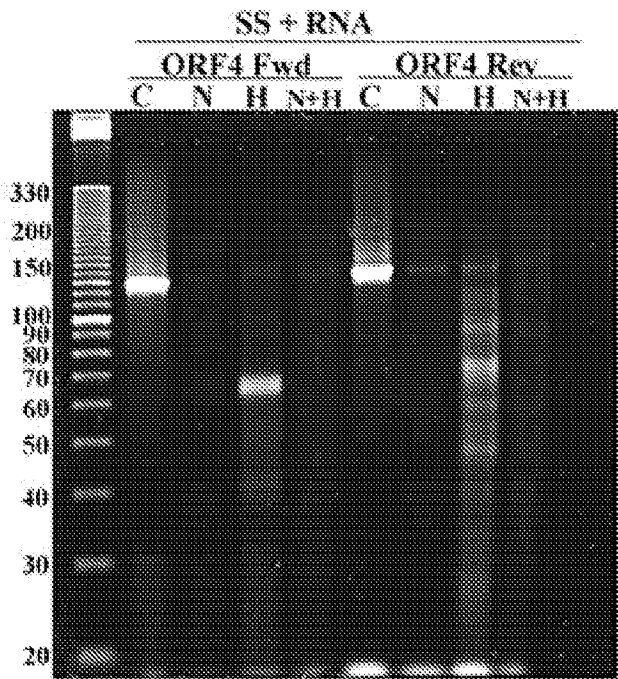


FIG.2A

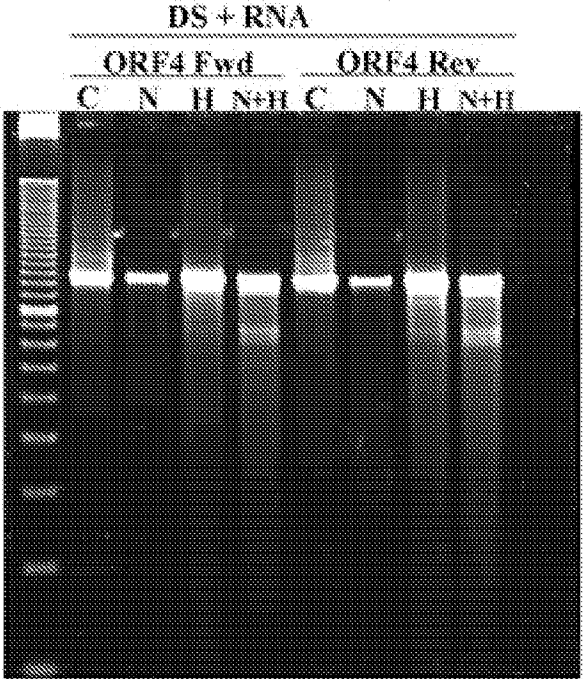
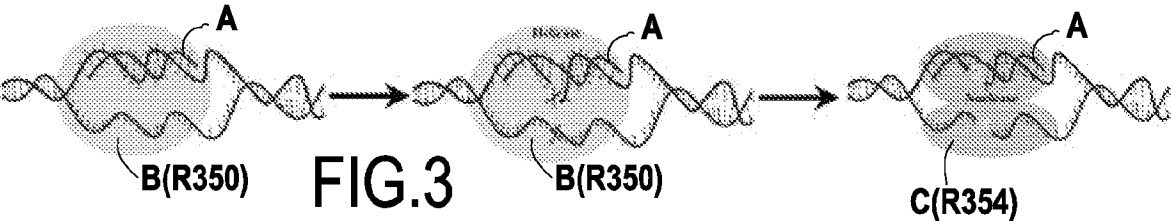


FIG.2B



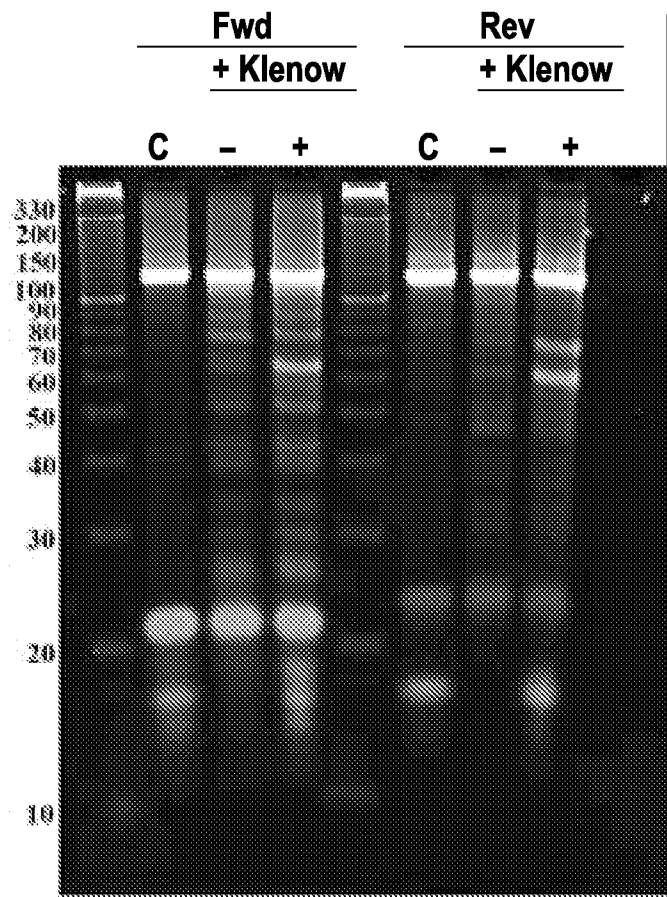


FIG.4

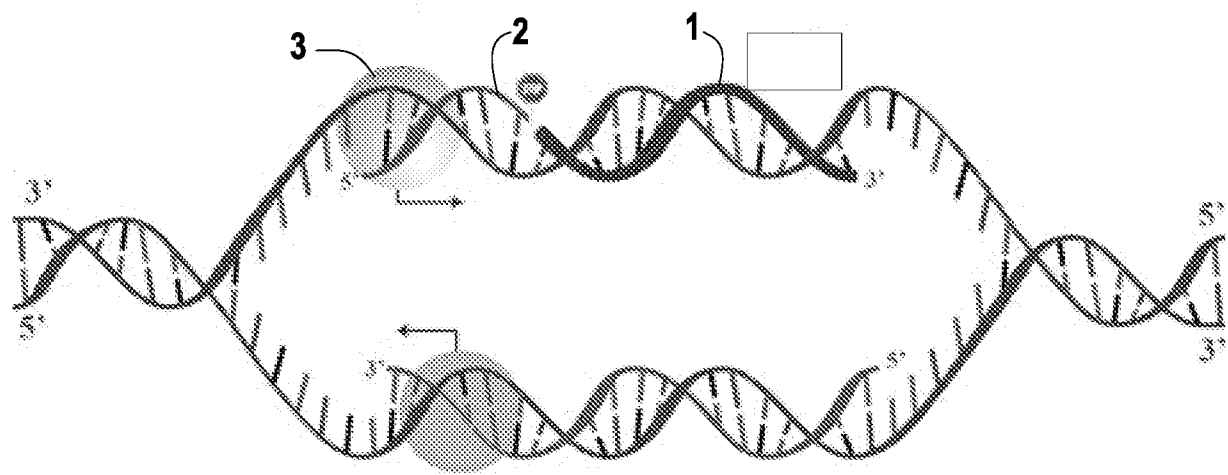


FIG.5

3/11

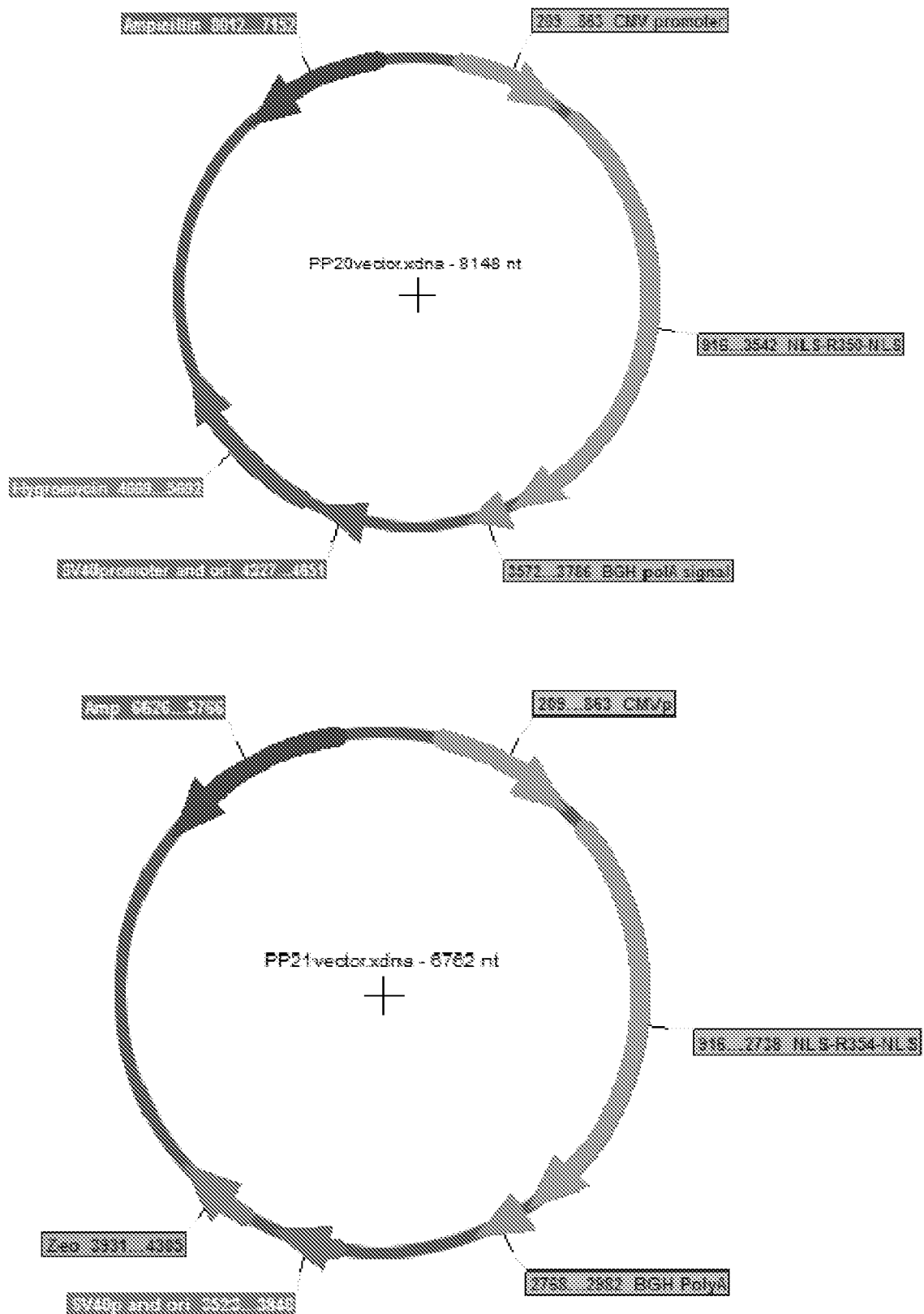


FIG.6

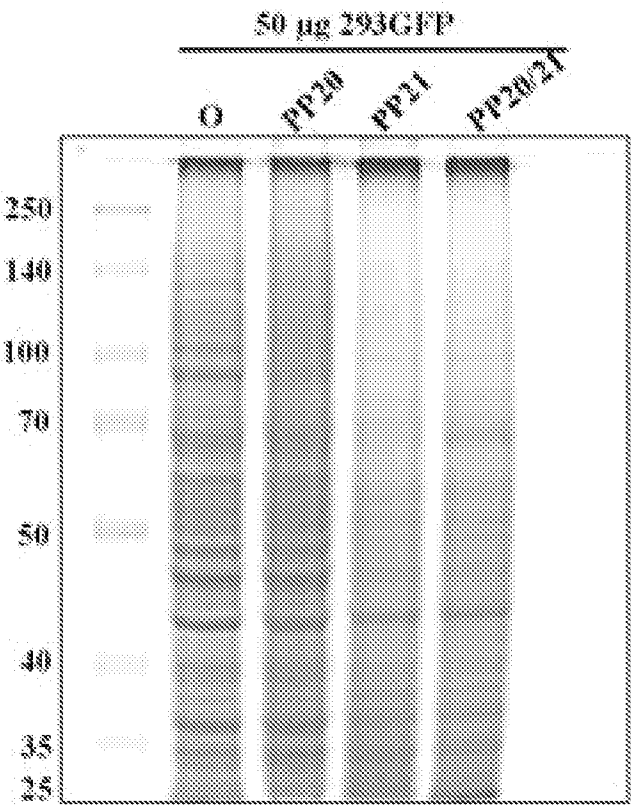


FIG.7A

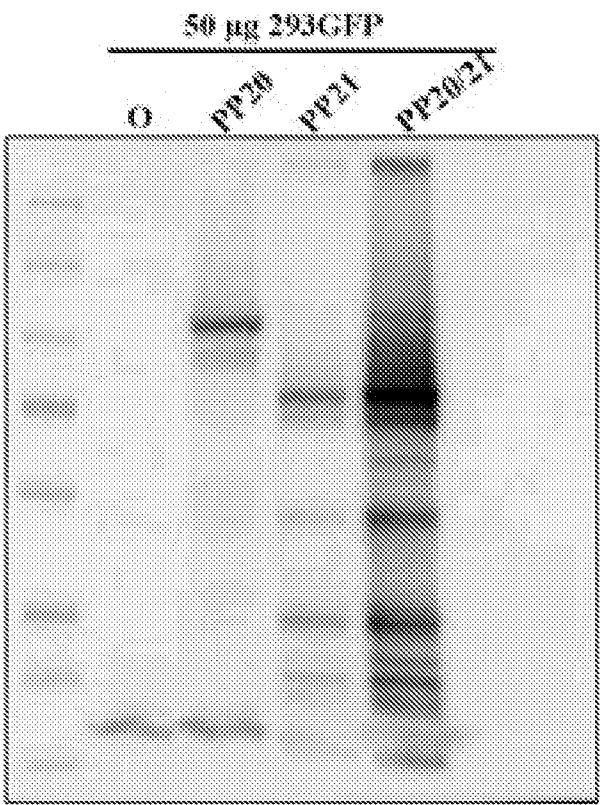


FIG.7B

5/11

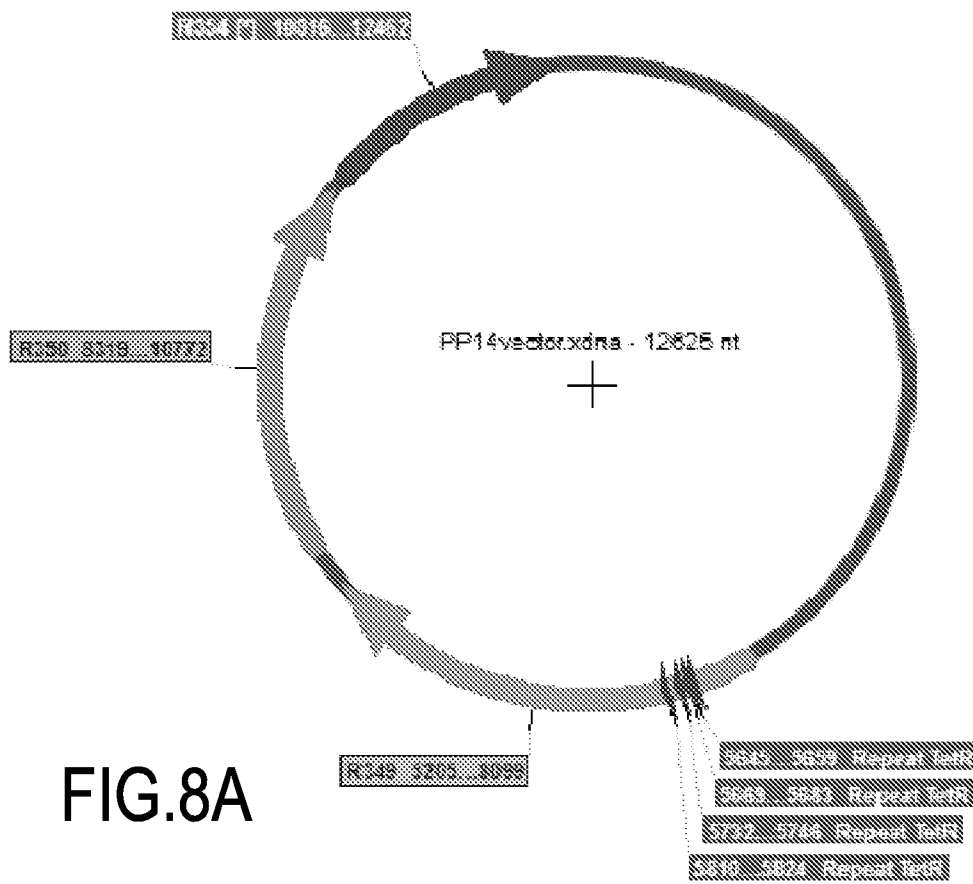


FIG.8A

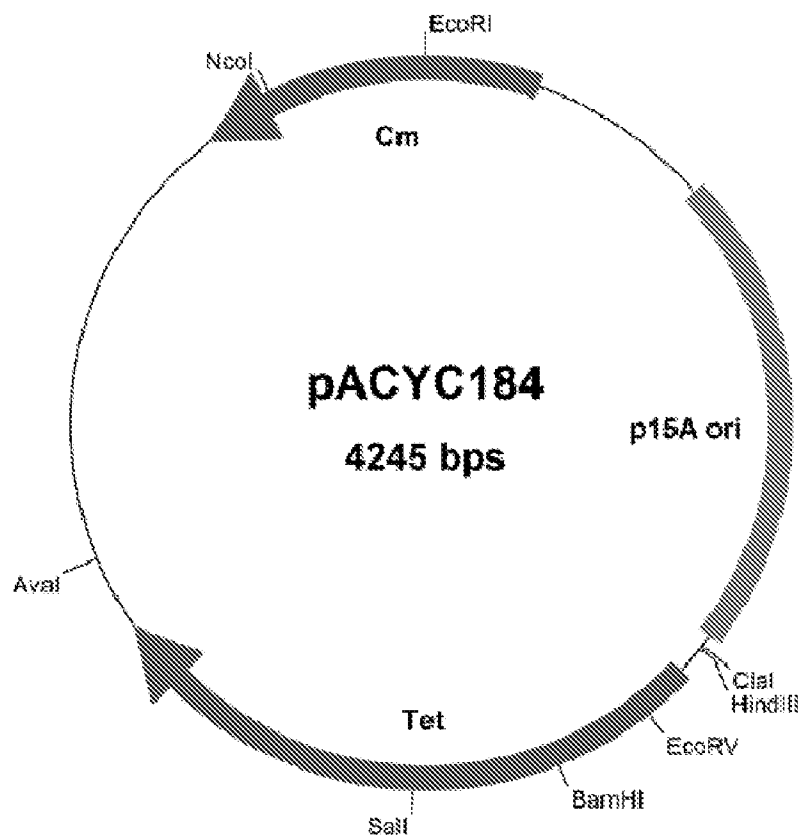


FIG.8B

6/11

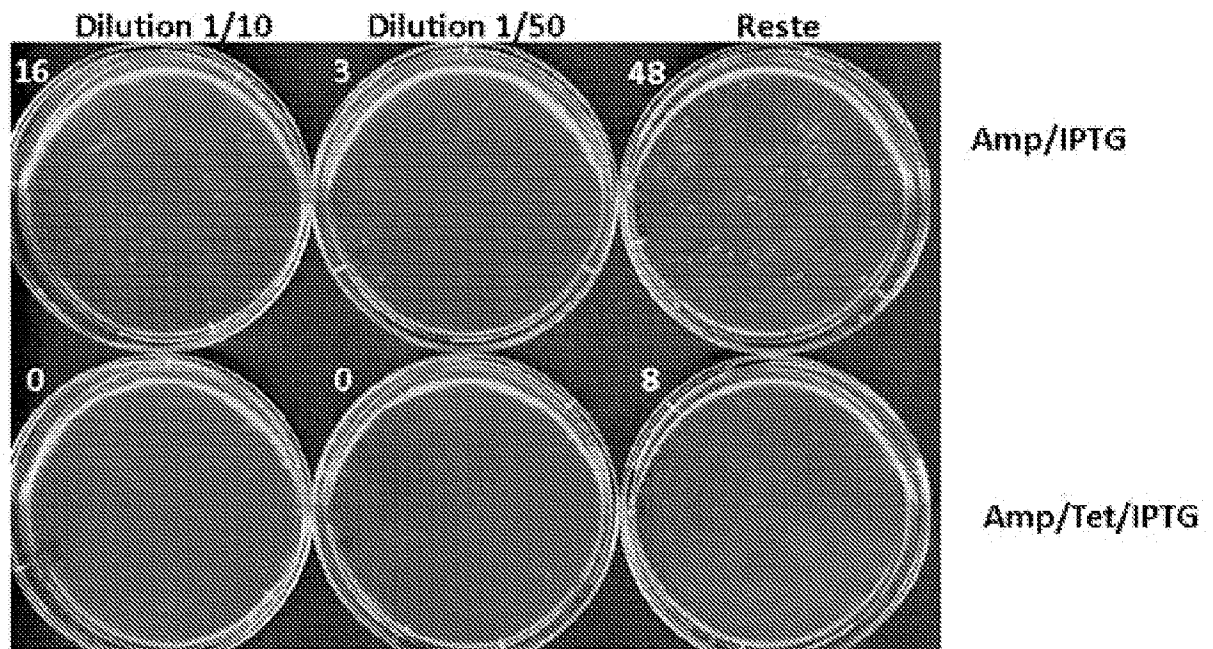


FIG.9

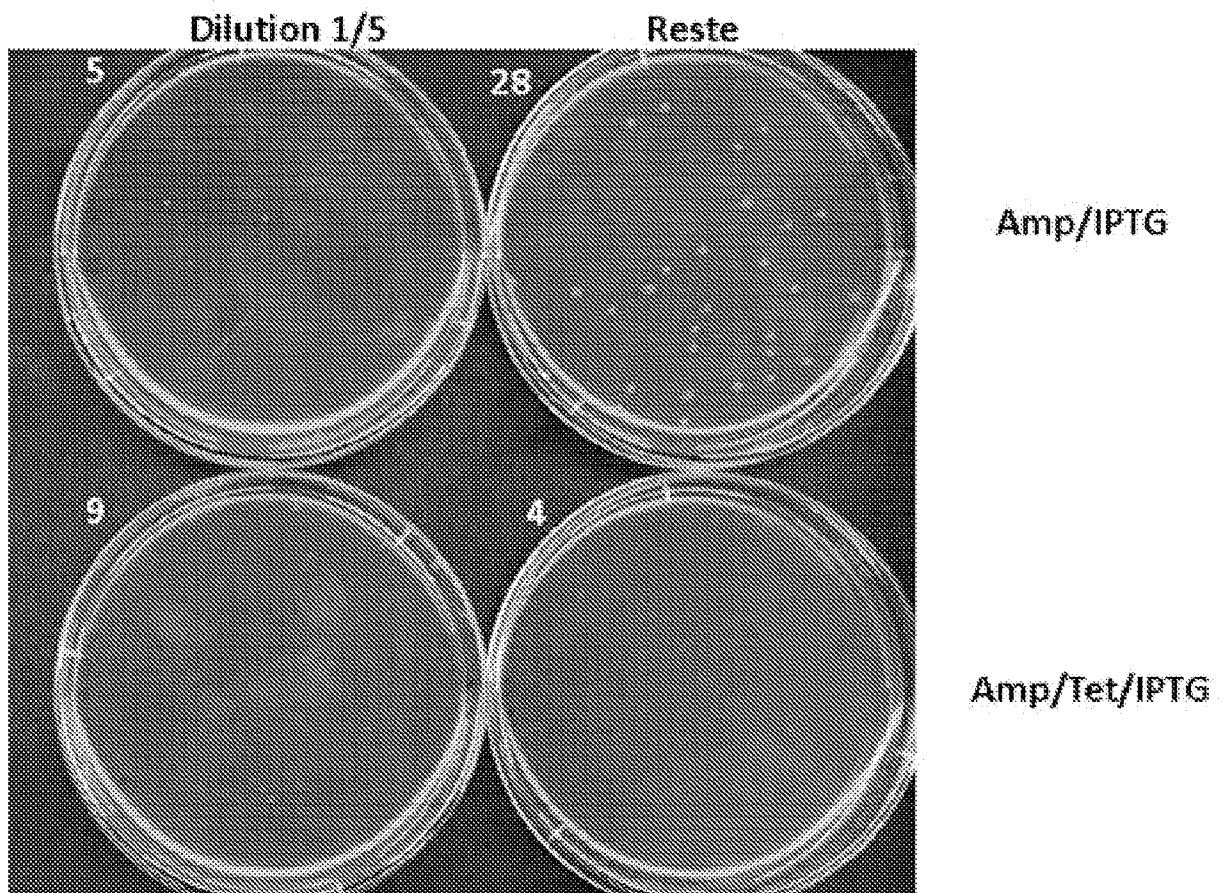


FIG.10

7/11

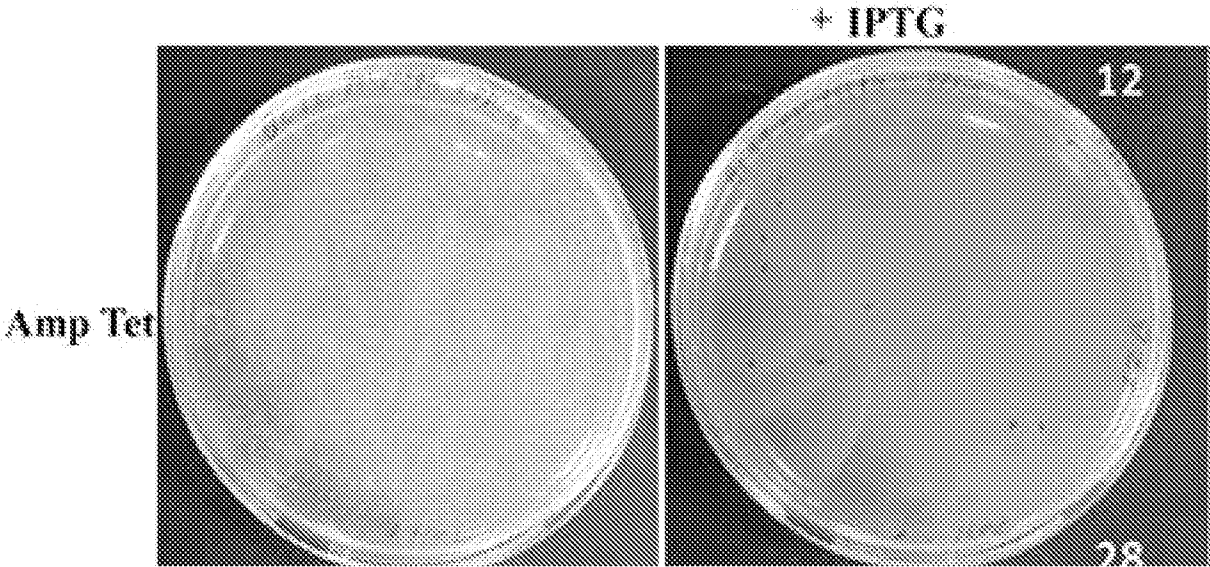


FIG.11

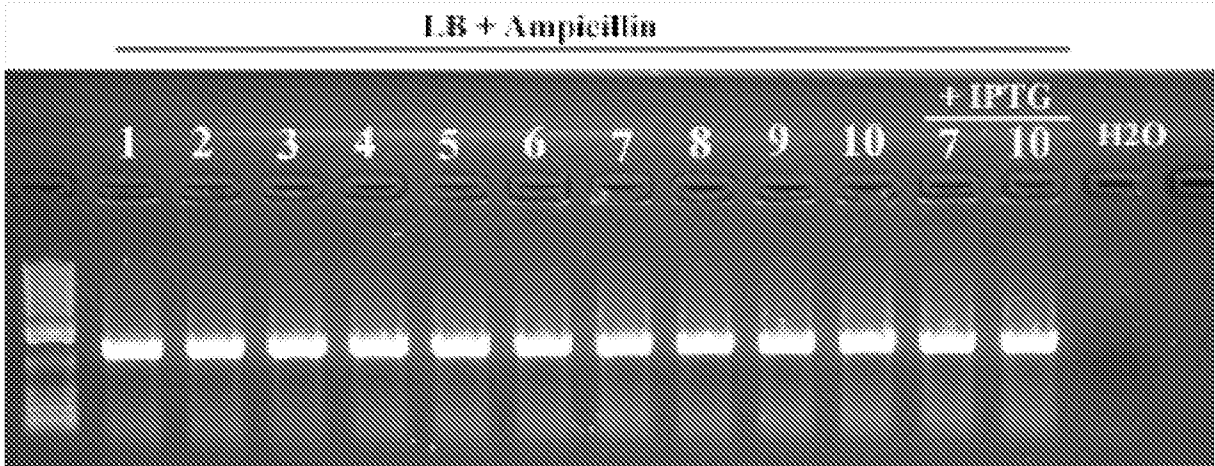


FIG.12

8/11

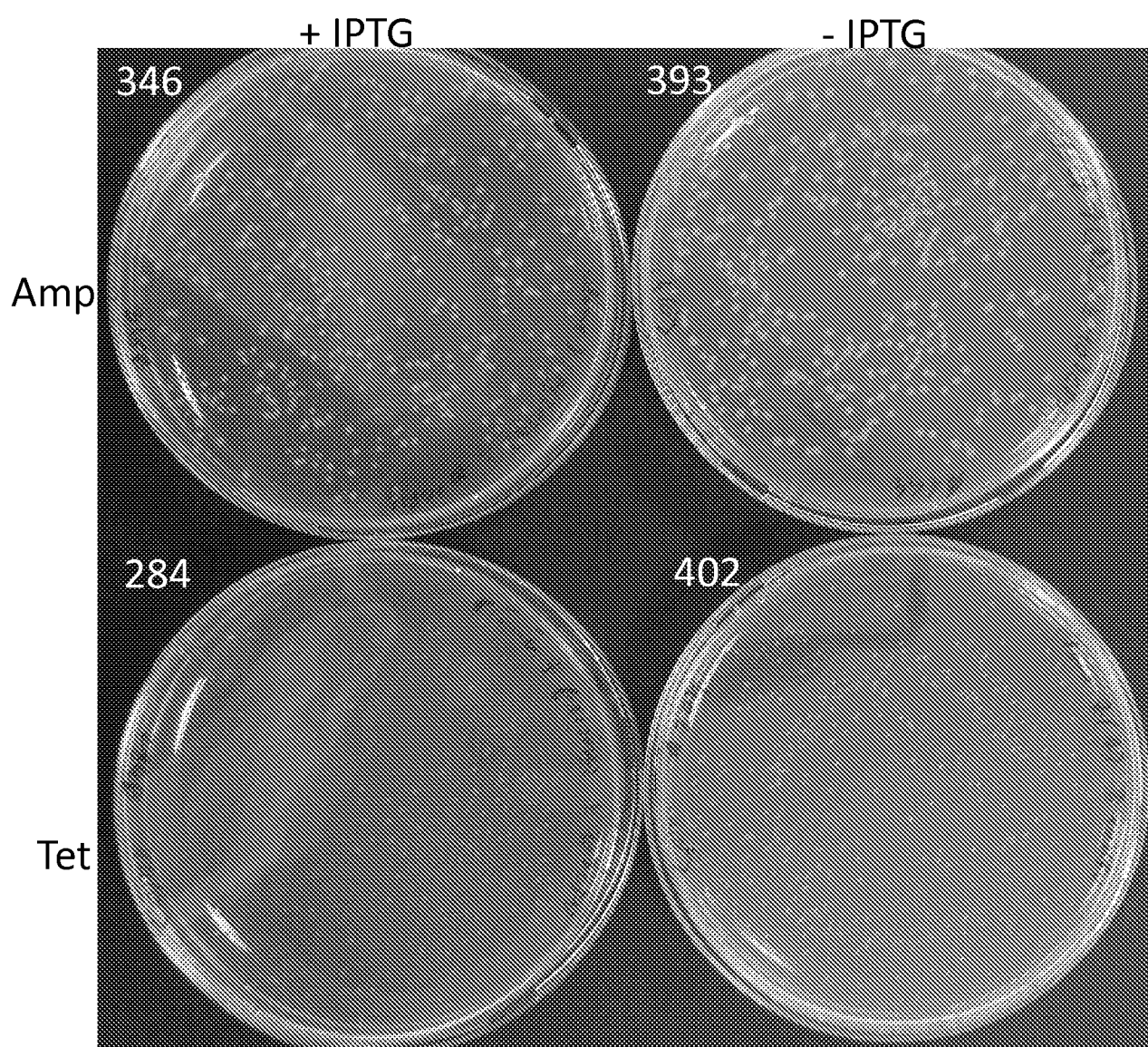


FIG.13

9/11

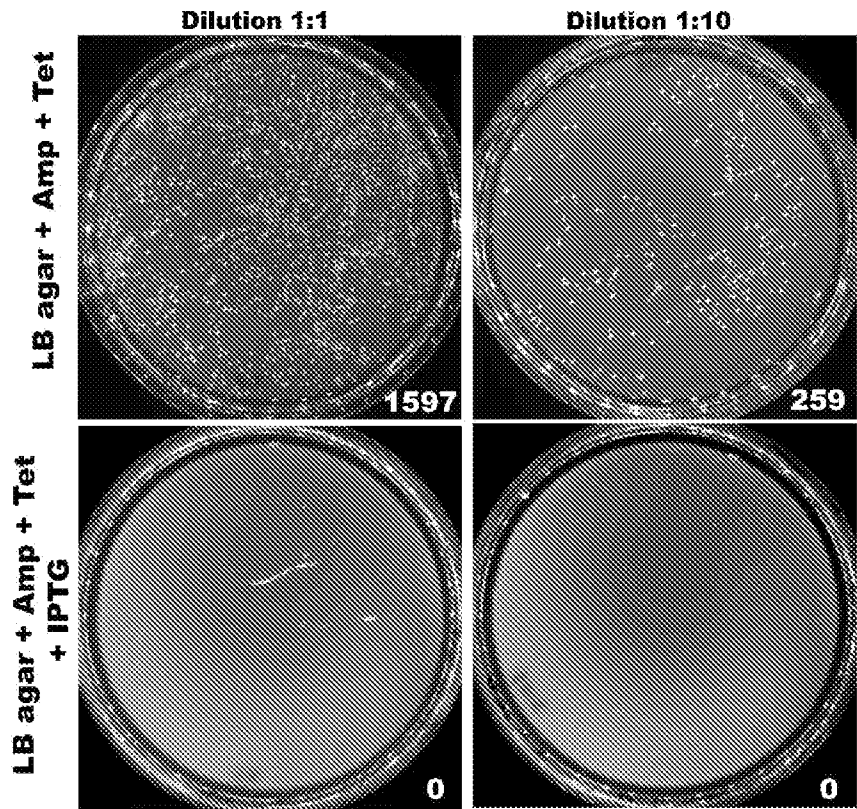


FIG.14

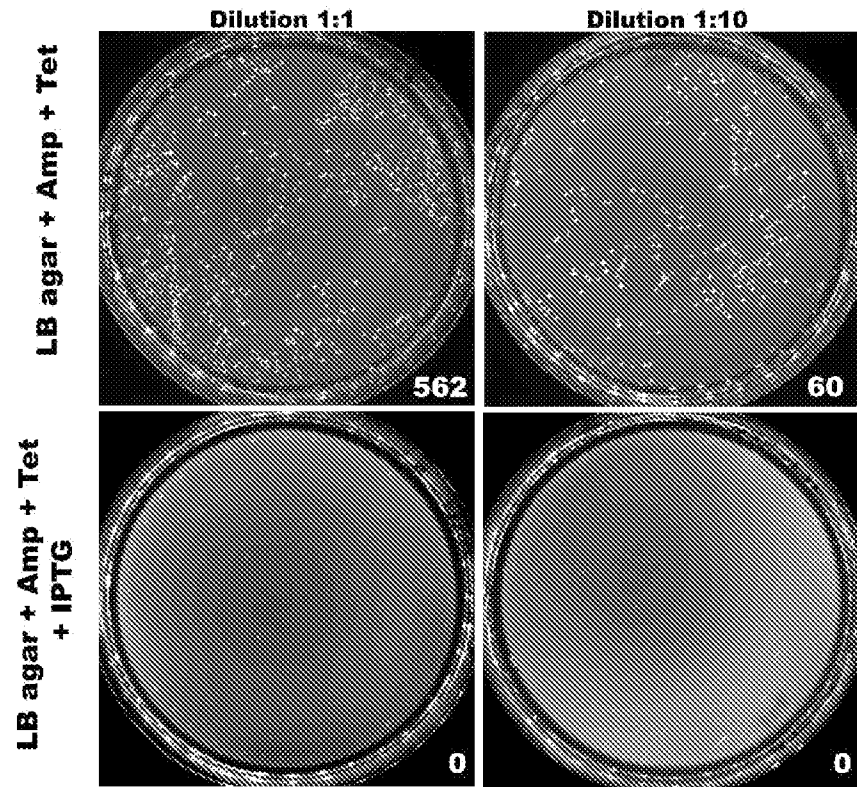


FIG.15

10/11

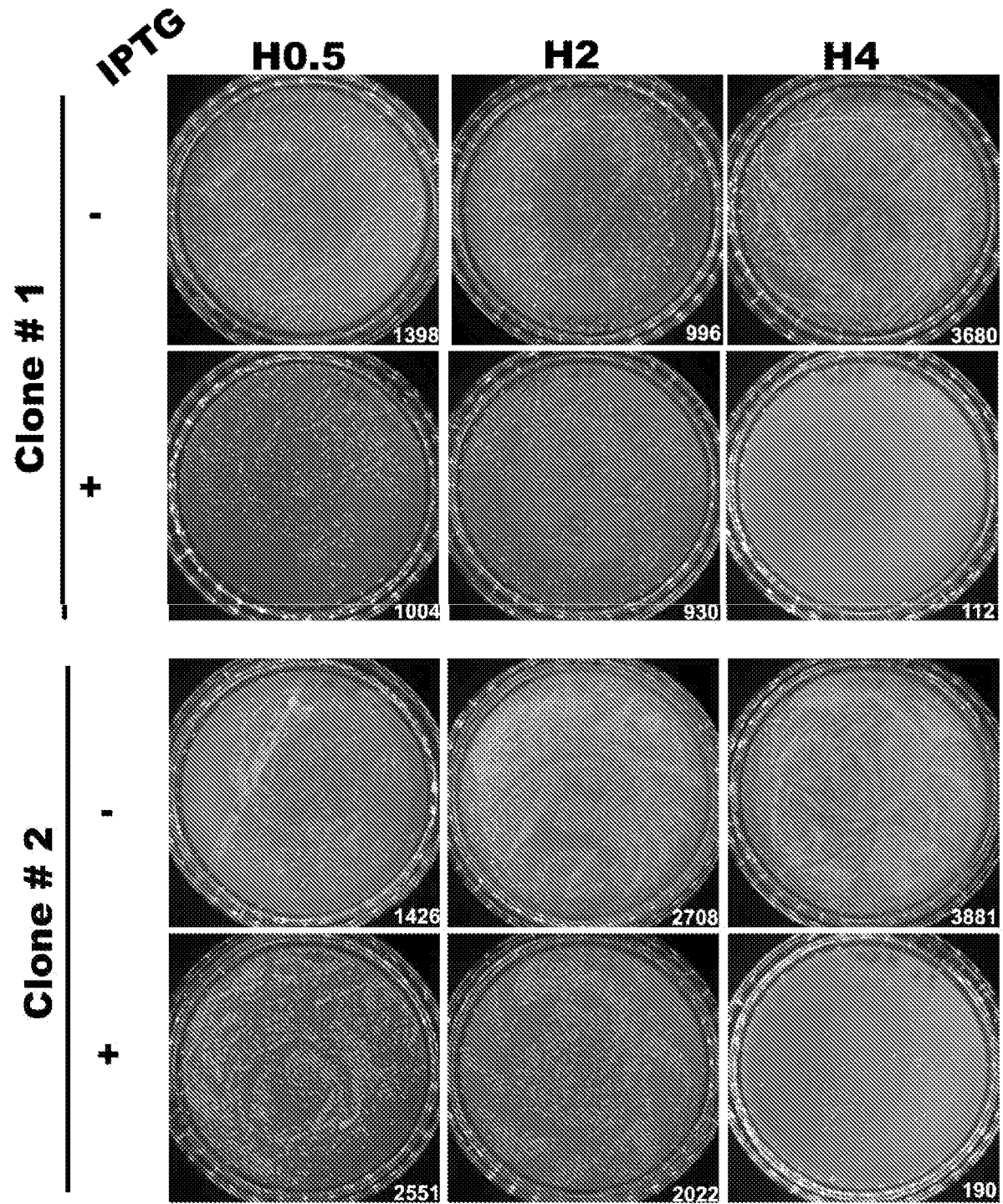


FIG.16

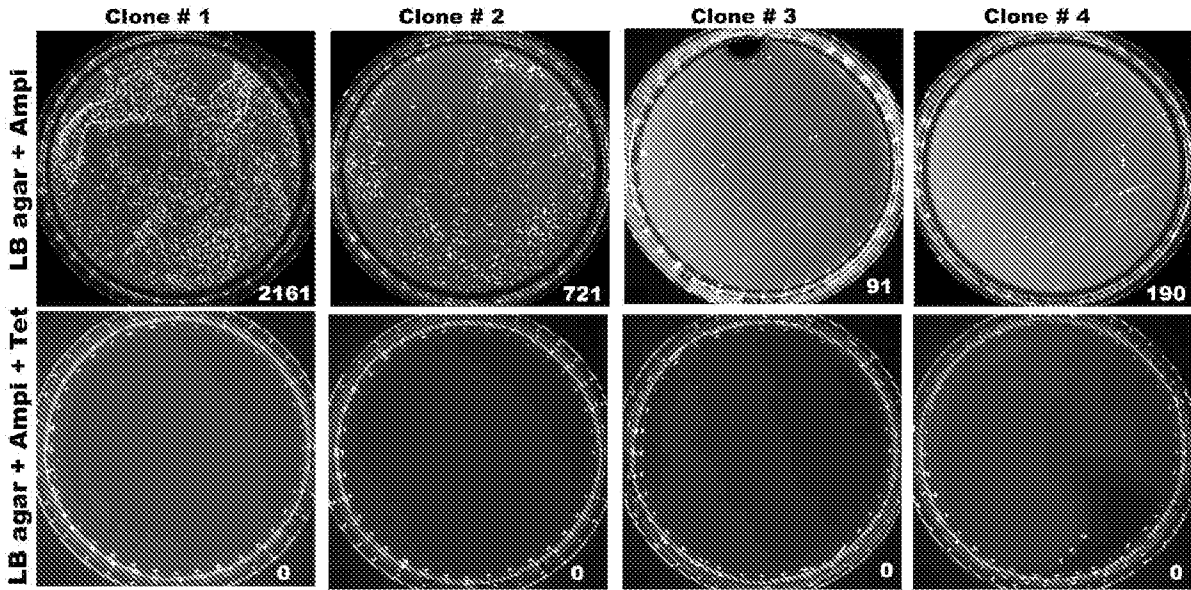


FIG.17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/051372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/10(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANTHONY LEVASSEUR ET AL. "MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage" <i>NATURE</i> , London, Vol. 531, No. 7593, 29 February 2016 (2016-02-29), pages 249-252 DOI: 10.1038/nature17146 ISSN: 0028-0836, XP055553919 cited in the application the whole document	1-3
Y	Chao Dou ET AL. "Structural and Mechanistic Analyses Reveal a Unique Cas4-like Protein in the Mimivirus Virophage Resistance Element System" <i>iScience</i> , United States, 25 May 2018 (2018-05-25), pages 1-10, Retrieved from the Internet: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004218300336/pdf?md5=8f43599b625d13afdbbb26a7173795a4&pid=1-s2.0-S2589004218300336-main.pdf DOI: 10.1016/j.isci.2018.04.001 XP055553947 see abstract, figures 1, 4 and pages 2-6	1-3
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 September 2019		Date of mailing of the international search report 24 September 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Vix, Olivier Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Callaway Ewen. "CRISPR-like 'immune' system discovered in giant virus : Nature News & Comment" 29 February 2016 (2016-02-29), Retrieved from the Internet: https://www.nature.com/news/crispr-like-immune-system-discovered-in-giant-virus-1.19462#/related-links [retrieved on 2019-02-08] XP055554104 see pages 1-3	1-3
Y	MERIE BEKLIZ ET AL. "MIMIVIRE, un système de défense chez mimivirus qui illustre l'hypothèse de la Reine Rouge" <i>M/S MEDECINE SCIENCES.</i> , FR, Vol. 32, No. 10, 01 October 2016 (2016-10-01), pages 818-819 DOI: 10.1051/medsci/20163210009 ISSN: 0767-0974, XP055555948 the whole document	1-3
Y	WO 2013098244 A1 (UNIV WAGENINGEN [NL]) 04 July 2013 (2013-07-04) the whole document	1-3
Y	TUHIN K. GUHA ET AL. "Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9" <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES</i> , Vol. 18, No. 12, 29 November 2017 (2017-11-29), page 2565 DOI: 10.3390/ijms18122565 XP055554937 see abstract and pages 3-7	1-3
Y	EUGENE V KOONIN ET AL. "Polintons, virophages and transpovirons: a tangled web linking viruses, transposons and immunity" <i>CURRENT OPINION IN VIROLOGY</i> , United Kingdom, Vol. 25, 30 June 2017 (2017-06-30), pages 7-15 DOI: 10.1016/j.coviro.2017.06.008 ISSN: 1879-6257, XP055553939 pages 11-12 and figure 4	1-3
A	CLAVERIE JEAN-MICHEL ET AL. "CRISPR-Cas-like system in giant viruses: why MIMIVIRE is not likely to be an adaptive immune system" <i>VIROLOGICA SINICA, SPRINGER, DE</i> , Vol. 31, No. 3, 13 June 2016 (2016-06-13), pages 193-196, [retrieved on 2016-06-13] DOI: 10.1007/S12250-016-3801-X ISSN: 1674-0769, XP035991872 the whole document	1-15
A	MORGAN GAIA ET AL. "Zamilon, a Novel Virophage with Mimiviridae Host Specificity" <i>PLOS ONE</i> , Vol. 9, No. 4, 18 April 2014 (2014-04-18), page e94923 DOI: 10.1371/journal.pone.0094923 XP055554478 the whole document	1-15
A	BERNARD LA SCOLA ET AL. "The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus" <i>NATURE</i> , London, Vol. 455, No. 7209, 06 August 2008 (2008-08-06), pages 100-104 DOI: 10.1038/nature07218 ISSN: 0028-0836, XP055554483 the whole document	1-15
A	WO 2012139866 A1 (UNIV ZUERICH PROREKTORAT MNW [CH]; HENNET THIERRY [CH]; RUTSCHMANN CHR) 18 October 2012 (2012-10-18) the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/051372

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2019/051372

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2013098244	A1	04 July 2013	AU	2012360975	A1	24 July 2014
				BR	112014016228	A2	25 September 2018
				CA	2862018	A1	04 July 2013
				CN	104321429	A	28 January 2015
				CN	105732816	A	06 July 2016
				CY	1120538	T1	10 July 2019
				DE	212012000234	U1	07 August 2014
				DK	3091072	T3	06 August 2018
				EP	2798060	A1	05 November 2014
				EP	3091072	A1	09 November 2016
				ES	2689256	T3	12 November 2018
				GB	2512246	A	24 September 2014
				GB	2534074	A	13 July 2016
				HU	E039617	T2	28 January 2019
				JP	6408914	B2	17 October 2018
				JP	2015503535	A	02 February 2015
				KR	20140115335	A	30 September 2014
				LT	3091072	T	27 August 2018
				MX	364830	B	08 May 2019
				PL	3091072	T3	31 January 2019
				RU	2014127702	A	20 February 2016
				SG	11201403713Q	A	30 July 2014
				SI	3091072	T1	28 September 2018
				US	2014294773	A1	02 October 2014
				US	2015024499	A1	22 January 2015
				US	2016186152	A1	30 June 2016
				US	2016186214	A1	30 June 2016
				US	2018119121	A1	03 May 2018
				WO	2013098244	A1	04 July 2013
				WO	2012139866	A1	18 October 2012
US	2014073575	A1	13 March 2014				
WO	2012139866	A1	18 October 2012				

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N15/10 C12N9/22 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ANTHONY LEVASSEUR ET AL: "MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage", NATURE, vol. 531, no. 7593, 29 février 2016 (2016-02-29), pages 249-252, XP055553919, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature17146 cité dans la demande le document en entier ----- -/-	1-3
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 septembre 2019		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/09/2019
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vix, Olivier

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	Chao Dou ET AL: "Structural and Mechanistic Analyses Reveal a Unique Cas4-like Protein in the Mimivirus Virophage Resistance Element System", iScience, 25 mai 2018 (2018-05-25), pages 1-10, XP055553947, United States DOI: 10.1016/j.isci.2018.04.001 Extrait de l'Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004218300336/pdf?md5=8f43599b625d13afdbbb26a7173795a4&pid=1-s2.0-S2589004218300336-main.pdf see abstract, figures 1, 4 and pages 2-6 -----	1-3
Y	Callaway Ewen: "CRISPR-like 'immune' system discovered in giant virus : Nature News & Comment", 29 février 2016 (2016-02-29), XP055554104, Extrait de l'Internet: URL:https://www.nature.com/news/crispr-like-immune-system-discovered-in-giant-virus-1.19462#/related-links [extrait le 2019-02-08] see pages 1-3 -----	1-3
Y	MERIEM BEKLIZ ET AL: "MIMIVIRE, un système de défense chez mimivirus qui illustre l'hypothèse de la Reine Rouge", M/S MEDECINE SCIENCES., vol. 32, no. 10, 1 octobre 2016 (2016-10-01), pages 818-819, XP055555948, FR ISSN: 0767-0974, DOI: 10.1051/medsci/20163210009 le document en entier -----	1-3
Y	WO 2013/098244 A1 (UNIV WAGENINGEN [NL]) 4 juillet 2013 (2013-07-04) le document en entier -----	1-3
Y	TUHIN K. GUHA ET AL: "Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 18, no. 12, 29 novembre 2017 (2017-11-29), page 2565, XP055554937, DOI: 10.3390/ijms18122565 see abstract and pages 3-7 -----	1-3
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EUGENE V KOONIN ET AL: "Polintons, virophages and transpovirons: a tangled web linking viruses, transposons and immunity", CURRENT OPINION IN VIROLOGY, vol. 25, 30 juin 2017 (2017-06-30), pages 7-15, XP055553939, United Kingdom ISSN: 1879-6257, DOI: 10.1016/j.coviro.2017.06.008 pages 11-12 et figure 4	1-3
A	----- CLAVERIE JEAN-MICHEL ET AL: "CRISPR-Cas-like system in giant viruses: why MIMIVIRE is not likely to be an adaptive immune system", VIROLOGICA SINICA, SPRINGER, DE, vol. 31, no. 3, 13 juin 2016 (2016-06-13), pages 193-196, XP035991872, ISSN: 1674-0769, DOI: 10.1007/S12250-016-3801-X [extrait le 2016-06-13] le document en entier	1-15
A	----- MORGAN GAIA ET AL: "Zamilon, a Novel Virophage with Mimiviridae Host Specificity", PLOS ONE, vol. 9, no. 4, 18 avril 2014 (2014-04-18), page e94923, XP055554478, DOI: 10.1371/journal.pone.0094923 le document en entier	1-15
A	----- BERNARD LA SCOLA ET AL: "The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus", NATURE, vol. 455, no. 7209, 6 août 2008 (2008-08-06), pages 100-104, XP055554483, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature07218 le document en entier	1-15
A	----- WO 2012/139866 A1 (UNIV ZUERICH PROREKTORAT MNW [CH]; HENNET THIERRY [CH]; RUTSCHMANN CHR) 18 octobre 2012 (2012-10-18) le document en entier -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2019/051372

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013098244 A1	04-07-2013	AU 2012360975 A1	24-07-2014
		BR 112014016228 A2	25-09-2018
		CA 2862018 A1	04-07-2013
		CN 104321429 A	28-01-2015
		CN 105732816 A	06-07-2016
		CY 1120538 T1	10-07-2019
		DE 212012000234 U1	07-08-2014
		DK 3091072 T3	06-08-2018
		EP 2798060 A1	05-11-2014
		EP 3091072 A1	09-11-2016
		ES 2689256 T3	12-11-2018
		GB 2512246 A	24-09-2014
		GB 2534074 A	13-07-2016
		HU E039617 T2	28-01-2019
		JP 6408914 B2	17-10-2018
		JP 2015503535 A	02-02-2015
		KR 20140115335 A	30-09-2014
		LT 3091072 T	27-08-2018
		PL 3091072 T3	31-01-2019
		RU 2014127702 A	20-02-2016
		SG 11201403713Q A	30-07-2014
		SI 3091072 T1	28-09-2018
		US 2014294773 A1	02-10-2014
		US 2015024499 A1	22-01-2015
		US 2016186152 A1	30-06-2016
		US 2016186214 A1	30-06-2016
		US 2018119121 A1	03-05-2018
		WO 2013098244 A1	04-07-2013
WO 2012139866 A1	18-10-2012	EP 2697370 A1	19-02-2014
		US 2014073575 A1	13-03-2014
		WO 2012139866 A1	18-10-2012