

Université de Montréal

**Caractérisation des enzymes de restriction des lactococci
(bactéries lactiques)**

Par

Man Ngiep Hua

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Juillet 1999

© Man Ngiep Hua, 1999



W

4

U58

1999

v.122

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation des enzymes de restriction des *lactococci*
(bactéries lactiques)**

présenté par

Man Ngiep Hua

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick C. Hallenbeck
Dr George Szatmari
Dre Barbara Karska Wysocki
Dre Margaret Mamet
Dr Daniel Dubreuil

Mémoire accepté le : 29 octobre 1999

SOMMAIRE

L'industrie laitière occupe actuellement une place importante dans l'économie mondiale. Au Canada, elle se situe au second rang dans le domaine agroalimentaire. En 1997 seulement, ce secteur a rapporté plus de 7.8 milliards de dollars. Dans cette industrie, les lactocoques (*Lactococcus lactis*) sont couramment utilisés comme levain pour la production du fromage, du babeurre fermenté, du kéfir, de la crème sure et du beurre. Mais vu l'incapacité de conserver les environnements de travail totalement stérile, les infections de cette espèce par les bactériophages sont fréquentes et causent un sérieux problème. À ce jour, quatre mécanismes de défense naturelle contre les phages ont été identifiés chez *L. lactis* : inhibition de l'adsorption du phage, inhibition de l'injection d'ADN phagique, les systèmes d'infection avortée et les systèmes de restriction et modification (R-M). Les systèmes R-M semblent être le mode d'action préconisé par *L. lactis* pour lutter contre les phages. Le genre *Lactococcus* utilisé dans la transformation du lait représenterait donc une excellente source, encore peu exploitée, de nouvelles endonucléases de restriction. Le présent travail consiste à caractériser les enzymes de restriction chez *L. lactis* afin (1) d'isoler de nouvelles endonucléases qui seront d'une grande utilité pour la communauté scientifique et (2) d'améliorer les souches employées dans l'industrie laitière.

Les souches *Lactococcus* industrielles isolées et purifiées antérieurement dans notre laboratoire ont été étudiées pour la production d'enzymes de restriction. Les souches *L. lactis* ssp. *lactis* M19, *L. lactis* ssp. *cremoris* H24 et *L. lactis* ssp. *cremoris* G2, identifiées dans le passé dans notre laboratoire, encodent chacune un enzyme de restriction désigné respectivement *LlaMI*, *LlaHI* et *LlaGI*. L'enzyme de restriction *LlaMI* reconnaît la séquence 5'-CCNGG-3' et représente, à notre connaissance, le premier isoschizomère ou néoschizomère de *ScrFI*. Contrairement à *ScrFI*, les résultats ont démontré que cet enzyme est remarquablement tolérant aux sels (NaCl et KCl). L'endonucléase *LlaHI*, qui reconnaît la séquence palindromique 5'-GCTAGC-3', est un isoschizomère ou néoschizomère de *LlaGI* et *NheI*. La restriction des substrats d'ADN dans les conditions utilisées suggère que les enzymes *LlaMI* et *LlaHI* appartiennent à la classe des endonucléases de restriction type-II. *LlaGI*, le premier isoschizomère de *NheI* isolé chez les bactéries lactiques, a été identifié dans notre laboratoire avant le début de la présente étude. Nos résultats ont suggéré non seulement que *LlaGI* possède une forte activité de restriction (110 000 U par mg de protéine), mais aussi qu'il est plus stable que son homologue *NheI* dans les conditions de force ionique élevée. Les masses moléculaires estimées de *LlaMI*, *LlaHI* se situent entre 30 kDa et 60 kDa alors que celle de *LlaGI* se retrouve entre 50 kDa et 66 kDa. La purification partielle de *LlaMI* et *LlaHI* de même que celle presque complète de *LlaGI* ont été réalisées par chromatographie liquide à basse

pression. Nous avons obtenu au moins 750 U par g de cellules humides de *LlaGI*.

Les résultats de ce travail ont également démontré que les enzymes de restriction identifiés dans notre laboratoire, grâce à leur stabilité, représentent une alternative intéressante aux endonucléases de restriction existantes. De plus, les souches M19, H24 et G2, dotées de leurs systèmes R-M, pourraient être utilisées seule ou en association avec d'autres lactocoques résistants afin de réduire les pertes dues aux infections phagiques dans l'industrie laitière.

MOTS CLÉS : *Lactococcus lactis*; Endonucléases de restriction; Résistance aux phages; Purification.

TABLE DES MATIÈRES

I.	IDENTIFICATION DU JURY	ii
II.	SOMMAIRE	iii
III.	TABLE DES MATIÈRES	vi
IV.	LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	ix
V.	LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xii
VI.	DÉDICACE	xiii
VII.	INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
	1. <i>Lactococcus lactis</i>	2
	1.1 Classification	2
	1.2 Applications industrielles	3
	1.2.1 Fermentation et conservation des aliments	3
	1.2.2 Industrie laitière	3
	2. Critères de sélection des lactocoques	5
	3. Résistance aux bactériophages	6
	3.1 Défenses naturelles	6
	3.2 Inhibition de l'adsorption phagique	9
	3.3 Inhibition de l'injection de l'ADN phagique	11
	3.4 Infection abortive	12
	3.5 Systèmes de Restriction et Modification (R-M)	13
	4. Systèmes R-M	14
	4.1 Enzymes de restriction	14
	4.2 Fonction biologique des systèmes R-M	15
	4.3 Types de système R-M	18
	4.3.1 Système R-M type-I	18

4.3.2	Système R-M type-II	19
4.3.3	Système R-M type-III et d'autres systèmes R-M	20
4.3.4	Systèmes R-M chez les <i>lactococci</i>	22
5.	Les systèmes R-M type-II	25
5.1	Distribution	25
5.2	Mécanismes de reconnaissance et de clivage	26
5.3	Mécanismes de régulation	28
6.	La recherche de nouveaux enzymes de restriction	33
6.1	Approche classique	33
6.2	Approche synthétique	34
7.	Application des enzymes de restriction	35
7.1	Industrie biotechnologique	35
7.2	Industrie agroalimentaire	36
8.	Objet de la présente étude	37
VIII.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	38
•	Souches, milieux de culture, substrats d'ADN, enzymes de restriction et solutions	39
•	Croissance des lactocoques	40
•	Électrophorèse sur gel pour l'analyse de l'ADN	41
•	Électrophorèse sur gel pour l'analyse des protéines	41
•	Isolement d'ADN plasmidique	41
•	Dosage de protéines	42
•	Chromatographie en phase liquide à l'aide du Système « Econo system » de BioRad	42

• Préparation d'extrait acellulaire	44
• Étude de l'activité endonucléasique	45
• Isolement préliminaire de <i>LlaMI</i> et <i>LlaGI</i>	47
• Caractérisation de <i>LlaMI</i> , <i>LlaHI</i> et <i>LlaGI</i>	48
• Purification de <i>LlaMI</i> , <i>LlaHI</i> et <i>LlaGI</i>	50
• Liste des tampons	55
IX. RÉSULTATS	59
• Criblage des souches à la recherche de l'activité de restriction	60
• Isolement, caractérisation et purification de <i>LlaMI</i>	63
• Caractérisation et purification de <i>LlaHI</i>	76
• Isolement, caractérisation et purification de <i>LlaGI</i>	83
X. DISCUSSION	103
XI. CONCLUSION	117
XII. RÉFÉRENCES	118
XIII. REMERCIEMENTS	135

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Cycle d'infection phagique et mécanismes de résistance naturelle retrouvés chez les lactocoques.	8
Figure 2:	Structure du complexe <i>EcoRI</i> -ADN.	27
Figure 3:	Système de chromatographie liquide à basse pression "Econo System" de BioRad.	43
Figure 4:	Identification de l'activité de restriction dans l'extrait brut de <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> M19 et <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> H24.	62
Figure 5:	Isolement de <i>LlaMI</i> à l'aide du système de chromatographie liquide à basse pression (BioRad Econo System).	64
Figure 6:	Comparaison des profils de restriction de différents substrats d'ADN double brin par <i>NciI</i> , <i>ScrFI</i> et <i>LlaMI</i> (partiellement purifié).	65
Figure 7:	Effet de la concentration du sel (NaCl et/ou KCl) sur l'activité de restriction de <i>LlaMI</i> et <i>ScrFI</i> .	69
Figure 8:	Détermination de la masse moléculaire de <i>LlaMI</i> sur tamis moléculaire Séphacryl S-300 HR.	71
Figure 9:	Purification de <i>LlaMI</i> : Étape 1.	73
Figure 10:	Purification de <i>LlaMI</i> : Étape 2.	75
Figure 11:	Comparaison des profils de restriction de différents substrats d'ADN double brin par <i>NheI</i> , <i>LlaHI</i> et <i>LlaGI</i> (partiellement purifié).	77
Figure 12:	Détermination de la masse moléculaire de <i>LlaHI</i> sur gel Séphacryl S-300 HR.	78

Figure 13:	Comparaison des profils plasmidiques de <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> G2 et <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> H24.	79
Figure 14:	Purification de <i>Lla</i> HI : Étape 1.	81
Figure 15:	Purification de <i>Lla</i> HI: Étape 2.	82
Figure 16:	Analyse électrophorétique de <i>Lla</i> GI sur gel SDS- polyacrylamide 10 %	84
Figure 17:	Analyse de l'activité de <i>Lla</i> GI sur λ / <i>Hind</i> III.	86
Figure 18:	Détermination des conditions de réaction optimales pour l'activité de <i>Lla</i> GI.	87
Figure 19:	Purification de <i>Lla</i> GI: Étape 1.	89
Figure 20:	Purification de <i>Lla</i> GI: Étape 2.	90
Figure 21:	Analyse électrophorétique sur gel SDS-polyacrylamide 10 % des fractions provenant de la purification de <i>Lla</i> GI.	91
Figure 22:	Analyse électrophorétique sur gel SDS-polyacrylamide 10 % des fractions protéiques provenant de la chromatographie sur gel Séphacryl-S300 HR.	93
Figure 23:	Identification de l'activité nucléasique non-spécifique dans la préparation de <i>Lla</i> GI obtenue après deux étapes de chromatographie.	94
Figure 24:	Schéma de purification de <i>Lla</i> GI en trois étapes.	96
Figure 25:	Analyse de l'activité de restriction de <i>Lla</i> GI purifié.	97
Figure 26:	Identification de l'activité nucléasique non-spécifique dans la préparation de <i>Lla</i> GI obtenue après trois étapes de chromatographie.	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Aliments fermentés dérivés de produits carnés, de fruits, de légumes, de grains et de produits apparentés.	4
Tableau 2:	Classification des endonucléases de restriction basée sur leurs structures et propriétés enzymatiques.	16
Tableau 3:	Principaux systèmes R-M caractérisés chez <i>L. lactis</i> .	23
Tableau 4:	Schéma simplifié de l'organisation génétique de chacun des systèmes R-M type-II caractérisé chez les lactococci.	30
Tableau 5:	Liste des souches <i>L. lactis</i> investiguées pour la production d'endonucléase de restriction.	61
Tableau 6:	Séquences de reconnaissance potentielles de <i>LlaMI</i> .	67
Tableau 7:	Marqueurs de protéine.	72
Tableau 8:	Rendement et index de purification de <i>LlaGI</i> après trois étapes de chromatographie successives.	101

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdoMet	S-Adénosyl-1-Méthionine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
bp	Paire de bases
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
λ	Lambda
M, mM	Molaire, millimolaire
MBP	Protéine fixant le maltose (``Maltose binding protein``)
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluoride
RPM	Tours par minute (``Rotations per Minute``)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane-Hydrochloride
UV	Ultraviolet

*À mes parents,
pour leur soutien.*

INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Lactococcus lactis*

1.1 Classification

Le genre *Lactococcus* fait partie du groupe (communément appelé) des bactéries lactiques. Il inclut les membres *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, et *Lactococcus xylosoe*. Selon la classification de Bergey (**Holt et coll., 1994**), les lactocoques se définissent comme : coques, Gram positifs, hétérotrophes (i.e. requiert une source de carbone organique : sucres), et catalase-négative. Les principales caractéristiques qui les distinguent des autres coques Gram positifs sont leur propriété de fermentation des sucres et leur température de croissance. En effet, ce groupe fermente les sucres en produisant principalement de l'acide lactique (homofermenteur) et il possède une température de croissance optimale entre 25°C et 35°C (mésophile) (**Champagne, 1998**). Ces bactéries non-pathogènes retrouvées généralement dans l'environnement sont rarement présentes dans les isolats cliniques tel l'urine, le sang et les plaies (**Mackey et coll., 1993**). Cependant, certaines souches peuvent être considérées comme des pathogènes opportunistes peu virulents (**Aguirre et coll., 1993**).

1.2 Applications industrielles

1.2.1 Fermentation et conservation des aliments

Les bactéries lactiques sont couramment utilisées dans la transformation et la conservation des aliments. La croissance de ces microorganismes occasionne des modifications (chimiques et/ou physiques) qui, non seulement permettent à un produit d'être conservé plus longtemps, mais lui confère également une nouvelle saveur agréable. Les bactéries lactiques constituent donc un groupe de microorganismes important pour l'industrie agroalimentaire. De nos jours, ces bactéries sont exploitées dans la fermentation de plusieurs aliments : légumes, fruits, produits carnés, poissons etc. (**Tableau 1**). Enfin, *Lactococcus lactis* représente l'espèce la plus utilisée pour le traitement du lait et des produits laitiers.

1.2.2 L'industrie laitière

L'industrie laitière occupe actuellement une place importante dans l'économie mondiale. Au Canada, elle se situe

Aliments	Ingédients crus	Micro-organismes fermentants	Régions
Jambon fumé, Saucissons, Salamis	Produits carnés	<i>Pediococcus cerevisiae</i> et <i>Lactobacillus plantarum</i>	Monde entier
Sauce de poisson	Poissons	<i>Bacillus</i>	Asie
Izushi	Poissons	<i>Lactobacillus</i>	Japon
Katsudoushi	Poissons	<i>Aspergillus glaucus</i>	Japon
Bière, vin et autres boissons alcoolisées	Céréales, fruits	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. ellipsoideus</i> et <i>S. carlsbergensis</i> , et <i>L. delbrueckii</i>	Occident
Café	Grains de café	<i>Erwinia dissolvens</i> et <i>Saccharomyces sp.</i>	Brésil, Inde et Hawaï
Choucroute	Choux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> et <i>L. plantarum</i>	Monde entier
Olives	Olives vertes	<i>L. mesenteroides</i> et <i>L. plantarum</i>	Monde entier
Cornichons	Concombres	<i>Pediococcus cerevisiae</i> et <i>L. plantarum</i>	Monde entier
Sauce de soja	Grains de soja	<i>Aspergillus oryzae</i> et <i>A. sojae</i>	Asie

Tableau 1. Aliments fermentés dérivés de produits carnés, de fruits, de légumes, de grains et de produits apparentés.

Tableau modifié de Prescott et coll. (1995)

au second rang dans l'industrie agroalimentaire. En 1982, plus de 15 % des recettes en agriculture, soit 2.87 milliards de dollars, provenaient de la production laitière; en 1997 ce même secteur a rapporté plus de 7.8 milliards de dollars (**Agriculture Canada**).

Dans cette industrie, *L. lactis* est couramment utilisé comme levain dans la production du fromage, du babeurre fermenté, du kéfir, de la crème surie et du beurre. Ce levain est souvent composé de plusieurs souches de la même espèce (**Loones, 1994**). Ces associations sont très complexes et doivent présenter des propriétés particulières tant nutritionnelles que techniques.

2. Critères de sélection des lactocoques pour la fermentation du lait et des produits laitiers

Les lactocoques sont de plus en plus employés comme levain pour la fermentation du lait et des produits laitiers car ils nous permettent de créer de nouveaux produits sûrs, sains et savoureux. L'obtention d'un produit de qualité n'est pas une mince tâche car il faut savoir combiner astucieusement un certain nombre de souches susceptibles de donner le produit final désiré (**Bigret, 1994**). Ce processus de sélection est laborieux et demande beaucoup de

patience. En effet, on peut retrouver dans certains levains plus de 100 souches de bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes (**Loones, 1994**).

La texture, la saveur et l'arôme du produit sont des propriétés importantes à satisfaire afin de répondre aux exigences du marché et aux attentes du consommateur. Les critères techniques tel le temps de génération, l'activité protéolytique et la résistance aux bactériophages permettent aux industries d'augmenter leur productivité et leur rendement. Les bactériophages sont reconnus depuis longtemps comme étant la principale cause de perte occasionnée à l'industrie laitière (**Daly et coll., 1996**). Par conséquent, le levain préconisé dans l'industrie laitière est composé de souches résistantes aux bactériophages.

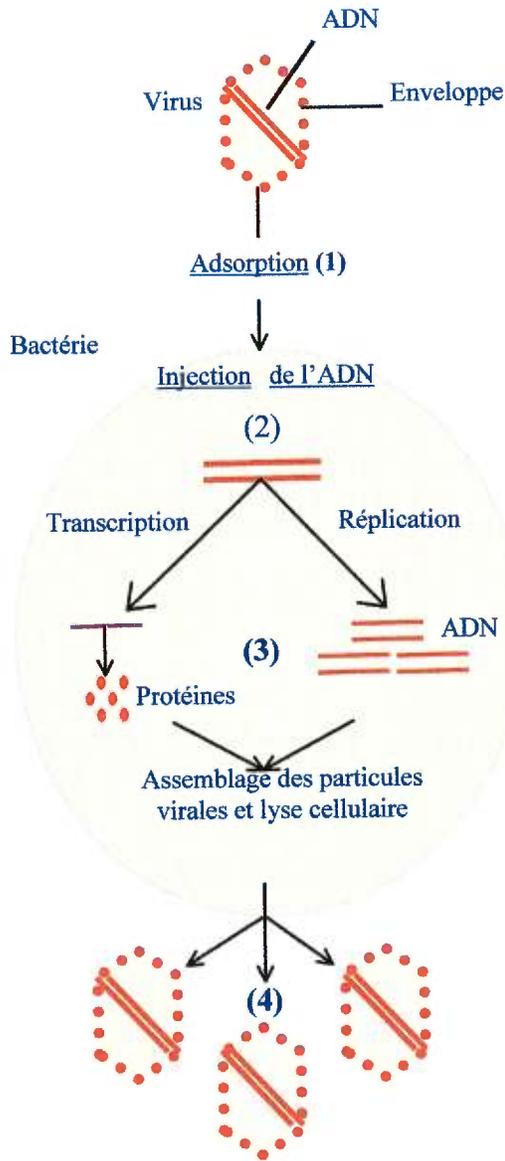
3. Résistance aux bactériophages

3.1 Défenses naturelles

Le processus de fermentation adopté par l'industrie laitière se fait dans un environnement non-stérile, entraînant ainsi des infections fréquentes par les bactériophages qui se traduit inévitablement par une diminution du rendement. Les phages les plus couramment rencontrés dans cette industrie appartiennent aux espèces 936, P335 et C2 (**Ermel**

et coll., 1994; *Jarvis et coll.*, 1991; *Moineau et coll.*, 1992 et 1996; *Powell et coll.*, 1989; *Prevots et coll.*, 1990). Toutefois, certaines souches peuvent posséder plus d'un mécanisme de défense, résultant en une résistance particulière face aux bactériophages (***Durmaz et coll.*, 1992; Sanders et coll., 1983**). L'utilisation des différentes techniques de la biologie moléculaire a permis de comprendre et d'identifier ces divers mécanismes de protection. Jusqu'à ce jour, quatre mécanismes de défense naturelle contre les phages, classés selon leur mode d'action, ont été identifiés chez les lactocoques: l'inhibition de l'adsorption, l'inhibition d'injection de l'ADN, l'infection abortive et les systèmes de Restriction et Modification (R-M) (***Daly et coll.*, 1996; Dinsmore et coll., 1995; *Garvey et coll.*, 1995**) (Figure 1).

Cycle d'infection normale



Mécanismes de résistance

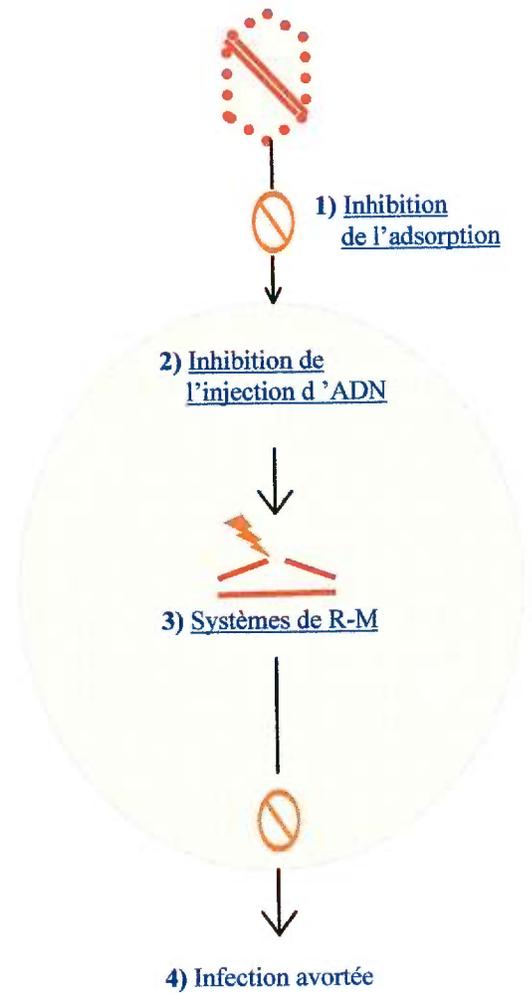


Figure 1. Le cycle d'infection phagique et les mécanismes de résistance naturelle retrouvés chez les lactocoques

3.2 Inhibition de l'adsorption phagique

L'infection phagique débute toujours par l'attachement de la particule virale à la surface bactérienne. Par conséquent, l'inhibition de l'adsorption phagique constitue la première ligne de défense développée par les lactocoques contre les phages. L'adsorption du phage fait intervenir des molécules spécifiques qui sont soit à la surface du bactériophage (ligands) soit à la surface bactérienne (récepteurs). Donc, la réduction de l'adsorption peut être expliquée par une diminution et/ou une défectuosité des récepteurs ou par la présence d'éléments qui interfèrent avec ces mêmes récepteurs. En effet, l'analyse des mutants qui présentaient une diminution de l'adsorption des bactériophages révèle l'implication des composants d'hydrate de carbone de la paroi cellulaire. De plus, l'absence des sucres comme le galactose, le rhamnose ou le glucose dans l'acide lipotéichoïque explique la faible adsorption phagique chez *L. lactis* ssp. *cremoris* KH (Valyasevi *et coll.*, 1990), *L. lactis* ssp. *lactis* C2 (Valyasevi *et coll.*, 1994), *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F7/2 et *L. lactis* ssp. *cremoris* Wg2-1 (Schäfer *et coll.*, 1991). Également, d'autres éléments de la membrane bactérienne ont été identifiés comme facteur essentiel pour l'attachement de ces virus. Par exemple, *L. lactis* ssp. *lactis* M13 possède une lipoprotéine à sa surface qui sert de récepteur au phage

M13 (**Oram, 1971**). Enfin, Valyasevi *et coll.* (**1991**) ont décrit une composante sensible à la protéinase K sur la membrane de *L. lactis* ssp. *lactis* C2 et nécessaire pour l'infection phagique.

D'autre part, une abondance en sucre dans la paroi peut rendre une surface bactérienne plus hydrophile et plus épaisse dissimulant ainsi les récepteurs requis pour l'infection. Chez *L. lactis* ssp. *cremoris* 398, l'augmentation en hydrate de carbone dans la paroi bactérienne à laquelle s'ajoute la perte d'une protéine membranaire de 21kDa lui confèrent le phénotype de résistance aux phages (**Gopal et coll., 1993**). Par ailleurs, d'autres systèmes d'inhibition de l'adsorption encodés par les plasmides seraient également associés aux sucres qui composent la paroi cellulaire. *L. lactis* ssp. *cremoris* SK110, portant le plasmide sK11G, possède une surface faiblement chargée et plus hydrophile. L'examen plus approfondi de la surface de cette souche révèle la présence marquée du galactose dans la paroi, empêchant ainsi l'adsorption du phage sK11G (**de Vos et coll., 1984; Sijtsma et coll., 1988, 1990a et 1990b**). Similairement, le plasmide pCI528 retrouvé chez *L. lactis* ssp. *cremoris* UC503 confère une résistance à une variété de phages différents en masquant les récepteurs par une paroi épaisse (**Lucey et coll., 1992**).

3.3 Inhibition de l'injection de l'ADN phagique

Quelques cas décrivant le phénomène de l'inhibition de l'injection du génome phagique dans la cellule ont été rapportés chez le genre *Lactococcus*. En effet, chez les souches résistantes *L. lactis* MG1614 (Hill, 1993) et *L. lactis* ssp. *lactis* C2 (Valyasevi *et coll.*, 1991), bien que l'adsorption des phages se fasse normalement à leur surface, l'ADN viral ne peut être décelé par la suite. Plus récemment, un mécanisme de défense précoce affectant l'entrée de l'ADN phagique a été associé au plasmide pNP40 (Garvey *et coll.*, 1996). Nous ne connaissons pas encore tous les mécanismes qui régissent ce phénomène, toutefois il semble que les particules virales soient attachées de manière non-spécifique à la surface de la bactérie. Les déterminants spécifiques de la membrane cellulaire, tel les protéines, sont directement impliqués dans la pénétration de l'ADN du phage dans la cellule et dans le déroulement du cycle lytique (Monteville *et coll.*, 1994; Valyasevi *et coll.*, 1991). Il a été suggéré que seul l'adsorption irréversible (spécifique) du phage à la surface bactérienne peut mener à une infection (Watanabe *et coll.*, 1977).

3.4 Infection abortive

Le phénomène de l'avortement d'une infection phagique représente sans doute un des mécanismes les plus complexes et encore peu compris. Sont inclus dans la catégorie ``infection abortive`` (IA) tous les événements, survenus après l'adsorption et la pénétration de l'ADN (excluant les systèmes de restriction et modification), qui entraînent un arrêt de la prolifération virale (**Sing et coll., 1990**). Les mécanismes de IA peuvent agir à différents stades de l'infection. Ils sont typiquement exprimés par les plasmides et curieusement, comme conséquence, causent la mort des cellules bactériennes (**Klaenhammer, 1989**).

Malgré la découverte et la caractérisation de plusieurs systèmes IA, ABiA et ABiC de *L. lactis* ssp. *lactis* ME2 (**Durmaz et coll., 1992**; **Hill et coll., 1989a**) et ABi-416 de *L. lactis* ssp. *lactis* IL416 (**Cluzel et coll., 1991**), le mécanisme par lequel ces systèmes freinent la prolifération demeure encore obscur. D'autres systèmes IA non-caractérisés encodés par les plasmides ont été également rapportés (**Froseth et coll., 1988**; **Jarvis, 1992**; **M^cKay et coll., 1989**; **Ward et coll., 1992**). Cependant les déterminants qui interfèrent avec la prolifération virale restent encore à être compris.

3.5 Systèmes de restriction et modification (R-M)

Les systèmes de restriction et modification (R-M) sont les mécanismes de résistance les plus souvent rencontrés chez les lactocoques (Hill, 1993). Ils constituent une défense à la fois simple et efficace qui n'a point besoin de systèmes de régulation et d'expression complexes dans la cellule. De plus, les systèmes R-M sont les mieux compris parmi les mécanismes de défense naturelle, sans doute parce qu'ils sont faciles à détecter.

Les systèmes R-M sont composés d'enzymes qui ont la capacité de couper et/ou de modifier l'ADN. Les enzymes de restriction ou endonucléases clivent l'ADN étranger à des sites spécifiques tandis que le génome de la cellule productrice est protégé par l'action d'une méthylase qui a comme cible la même séquence. Les systèmes R-M sont généralement encodés par les plasmides (Bickle *et coll.*, 1993) et cette localisation simplifie grandement la compréhension ainsi que la caractérisation de ces systèmes. Les différents éléments qui constituent ces systèmes seront décrits plus en détail dans la prochaine section de ce mémoire.

4. Systèmes R-M

4.1 Les enzymes de restriction

Le phénomène de restriction et modification des bactériophages a été décrit en 1952 par Luria et Human (1952) et ensuite en 1953 par Bertani et Weigle (1953). Ces derniers ont constaté qu'un lysat du phage λ , préparé à partir de *E. coli* C, se propageait faiblement sur *E. coli* K-12. Les explications de cette observation au niveau moléculaire ont été données quelque vingt ans plus tard par Roberts (1976) et par Arber (1979). Ce mécanisme se nomme la restriction. En effet, la souche *E. coli* C, qui ne possède pas de système R-M, produit des phages non-modifiés, donc non-protégés contre l'activité de restriction présente chez *E. coli* K-12. Cependant, les quelques rares particules phagiques qui ont échappé à l'activité de restriction présente chez *E. coli* K-12 ont été modifiées et ont engendré des descendants qui ont crû avec la même efficacité chez l'un ou l'autre hôte. Lors de la restriction, deux liens phosphodiester de l'ADN double brin sont clivés par une endonucléase ou enzyme de restriction à l'intérieur ou à l'extérieur de la séquence de reconnaissance. La modification, quant à elle, consiste en l'ajout d'un groupement méthyl par une méthyltransférase ou enzyme de modification dans la même séquence de reconnaissance pour

protéger l'ADN de l'hôte contre la restriction (**Cheng, 1995**). La résistance des bactériophages à l'activité de restriction survient donc seulement après que l'ADN phagique ait été méthylé. Il existe aujourd'hui deux systèmes de restriction et modification : d'une part, le système classique, où l'ADN est protégé de l'endonucléase par méthylation (**Bickle *et coll.*, 1993; Wilson, 1991b**), d'autre part, le système méthylation-dépendante, où la restriction requiert un substrat modifié dans la séquence de reconnaissance (**Lacks *et coll.*, 1977; Raleigh, 1992**). Les systèmes de restriction et modification classiques, au nombre de quatre, sont classés en fonction des structures et des propriétés enzymatiques des endonucléases de restriction impliquées (**Tableau 2**).

4.2 Fonction biologique du système R-M

Depuis leur découverte, les enzymes de restriction ont suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. En effet, ils sont devenus un outil indispensable de la biologie moléculaire. Ils représentent une des classes d'enzymes, sinon les enzymes, les plus utilisés dans les laboratoires de biochimie. D'importants progrès dans le domaine du clonage ainsi que dans la compréhension de la structure et de l'expression des gènes ont été réalisés grâce à l'utilisation de ces

Type	Structure	Cofacteur(s)	Séquence de reconnaissance	Clivage
Type I	Pentamère (R ₂ M ₂ S ₁)	ATP, AdoMet Mg ²⁺	Asymétrique, interrompue en moyen par 7bp	Extérieur, distance non-définie
Type II	Homodimère	Mg ²⁺	Palindromique, 4-8bp	Intérieur du site de reconnaissance
Type IIS	Monomère	Mg ²⁺	Asymétrie, 4-7bp	Extérieur, distance définie
Type IIe	Homodimère	Mg ²⁺ , ADN	Palindromique, 4-8bp	Intérieur du site de reconnaissance
Type III	Hétérodimère	ATP (non-hydrolysé) Mg ²⁺ , AdoMet* ADN*	Asymétrique, non-interrompue	Extérieur, distance définie
Type IV	Monomère	Mg ²⁺ , AdoMet*	Asymétrique, 6bp	Extérieur, distance définie

Tableau 2. Classification d'endonucléases de restriction basée sur leurs structures et propriétés.

(*) Cofacteur non-essentiel favorisant la réaction

Tableau modifié de Pingoud et Jeltsch (1997)

enzymes. Cependant, la fonction biologique des systèmes R-M au sein de la bactérie est encore mal comprise. Nos notions sont basées principalement sur deux observations importantes mais aussi paradoxales. Premièrement, les systèmes R-M sont communs et très répandus chez les procaryotes (**Roberts *et coll.*, 1998**). Cependant, ces systèmes ne sont essentiels ni pour la croissance bactérienne ni pour la synthèse et la réparation d'acides nucléiques (**Price *et coll.*, 1986**). Ces observations suggèrent que les systèmes R-M ont été conservés, vu leur rôle plutôt bénéfique dans l'évolution des microorganismes.

La fonction la plus évidente du système R-M est sans doute la résistance aux bactériophages (**Price *et coll.*, 1986; Trevors, 1995**). Selon Price et Bickle (**1986**), le système R-M des procaryotes peut être comparé au système immunitaire des organismes évolués. En plus d'agir dans la défense contre les bactériophages, ces systèmes permettent également de cliver l'ADN étranger afin de permettre les réarrangements génétiques dans la cellule hôte (**Arber, 1979; Price *et coll.*, 1986; Trevors, 1995**). En outre, pour appuyer cette hypothèse, il a été observé que des bris dans l'ADN, créés par les enzymes de restriction, peuvent promouvoir la recombinaison génétique (**Clyman *et coll.*, 1992; Eddy *et coll.*, 1992; Schiestl *et coll.*, 1991**).

4.3 Types de système R-M (Tableau 2)

4.3.1 Système R-M type-I

La complexité du système R-M type-I n'a pas encore été égalée jusqu'à ce jour. Il dispose d'enzymes comportant cinq sous-unités protéiques (S_1 :spécificité; M_2 :modification; R_2 :restriction) provenant de produits des gènes *hsdS*, *hsdM* et *hsdR* (pour 'host specificity for DNA') (**Bickle et coll., 1993; Pingoud et coll., 1997; Wilson, 1991b**). Cet enzyme multifonctionnel qui reconnaît les séquences d'ADN asymétriques et interrompues en général par 6-8 paires de bases (**Bickle et coll., 1993**) a été identifié principalement chez les *Enterobacteriaceae*. Les mécanismes de clivage et de reconnaissance des endonucléases de type-I ne sont pas encore complètement élucidés. La modification requiert la présence de S-adénosyl-l-méthionine (AdoMet) et survient dans la séquence de reconnaissance tandis que la restriction a lieu à une distance indéfinie de la séquence spécifique (**Mernagh et coll., 1998**). Le clivage nécessite de l'ATP qui sera hydrolysé suite à la coupure de l'ADN (**Bickle et coll., 1993; Dreier et coll., 1996**). Le mécanisme de régulation de l'endonucléase et de la

méthyltransférase est incertain, mais il a été observé que la méthylation survient avant la restriction dans la cellule (**Prakash-Cheng et coll., 1993**). Le mécanisme de régulation post-traductionnelle proposé par Kulik *et coll.* (1996) ainsi que Dryden *et coll.* (1997) est le plus plausible puisqu'une méthylase monofonctionnelle composée de deux sous-unités, *hsdS* et *hsdM*, a pu être isolée (**Bickle et coll., 1993**). Le système R-M type I se sous-divise en quatre familles, désignées par type IA, IB, IC, ID et classées selon l'homologie génétique (**Bickle et coll., 1993**).

4.3.2 Système R-M type-II

La restriction et la modification du système R-M type-II (R-M/II) sont catalysées par deux enzymes distincts. Les endonucléases de type-II sont composées de deux sous-unités identiques (homodimère), et n'ont besoin ni de l'ATP ni de l'AdoMet pour catalyser la réaction. Seul les ions bivalents, préférentiellement du Mg^{2+} mais aussi du Mn^{2+} , sont nécessaires pour le clivage. La méthyltransférase, elle, requiert de l'AdoMet comme cofacteur pour la modification. Les endonucléases de type-II reconnaissent typiquement les séquences palindromiques de 4-8 paires de bases (bp). Les activités de restriction et de

modification ont lieu à l'intérieur de la séquence de reconnaissance (**Roberts et coll., 1993**).

Certains systèmes R-M/II présentent des propriétés différentes et par conséquent forment de nouveaux sous-groupes. Entre autres, le type-IIe est constitué d'endonucléases qui nécessitent simultanément deux séquences de reconnaissance. Par exemple, *EcoRII* est activé allostériquement en s'attachant à une deuxième séquence de reconnaissance (effecteur) (**Krüger et coll., 1995**). Les deux séquences doivent cependant être à proximité l'une de l'autre. Un deuxième sous-groupe, type-IIs, est composé d'enzymes monomériques qui clivent à une distance définie à l'extérieur du site de reconnaissance asymétrique (**Skowron et coll., 1993; Szybalski et coll., 1991**). Enfin, le mécanisme de reconnaissance et de fixation semblent être différents du type-II classique (**Aggarwal et coll., 1998**).

4.3.3 Système R-M type-III et autres systèmes R-M identifiés récemment

Les endonucléases de type-III sont multifonctionnelles et comparables aux enzymes de type-I, mais ne sont formées que de

deux sous-unités protéiques, R (restriction) et M (modification). Alors que la modification n'exige que la sous-unité M, l'activité de restriction requiert la coopération des deux sous-unités protéiques (**Pingoud *et coll.*, 1997**). L'ATP est nécessaire pour la restriction, mais ne sera pas hydrolysé comme c'est le cas chez les enzymes de type-I (**Krüger *et coll.*, 1983; Saha *et coll.*, 1998**). La modification a lieu à l'intérieur du site de reconnaissance en présence de l'AdoMet tandis que le clivage de l'ADN est à environ 25bp en aval du même site. Peu d'endonucléases de type-III ont été caractérisées; les plus étudiées sont *EcoP1I* et *EcoP15I* (**Saha *et coll.*, 1998**). La plupart des systèmes de type-III proviennent de la famille *Pasteurellaceae* et *Enterobacteriaceae*. Dernièrement, d'autres systèmes de R-M ont été détectés et partiellement caractérisés. Entre autres, le système de type-IV, *Eco571*, où la coupure de l'ADN est stimulée par l'AdoMet et est ATP-indépendante (**Janulaitis *et coll.*, 1992a et 1992b**). De même, le système type-*BcgI* clive, en présence de l'AdoMet, à une distance précise des deux côtés de la séquence de reconnaissance, résultant ainsi en une excision d'un court fragment d'ADN (**Kong *et coll.*, 1994; Sears *et coll.*, 1996**).

4.3.4 Systèmes R-M chez les *lactococci* (lactocoques)

Les lactocoques, à travers l'évolution, ont développé des mécanismes qui leur permettent de lutter contre les bactériophages, notamment les systèmes R-M. En général, ces systèmes chez les lactococci sont encodés par les éléments mobiles (i.e. plasmides) (**Tableau 3**) et sont de type-II (**Hill, 1993**).

Paradoxalement, le premier indice de la présence des systèmes de R-M chez les lactocoques a été la découverte de *ScrFI* (**Fitzgerald et coll., 1982**), une endonucléase de type-II isolée chez *L. lactis* subsp. *cremoris* UC503 et encodée exceptionnellement par le chromosome (**Davis et coll., 1993**). Cette endonucléase reconnaît spécifiquement la séquence 5'-CC/NGG-3', où N représente A, T, G ou C et ``/`` indique la position du clivage. Sa séquence nucléotidique complète est maintenant connue (**Davis et coll., 1993; Twomey et coll., 1997**).

Enzyme	Souche	Locus	Site	Remarque	Référence
Type-I					
Non-désigné	<i>L. lactis</i> souche IL1403	pIL1403	non-déterminé		Schouler, 1998a et 1998b
Type-II					
<i>LiaI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W9	pFW094	5'-GATC-3'	Séquencé et cloné	Nyengaard, 1993 et 1995
<i>LiaBI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W56	pJW563	5'-C/TRVAG-3'	Séquencé et cloné	Nyengaard, 1993, 1995 et 1996
<i>LiaCI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W15	pAW153	5'-A/AGCTT-3'	Séquencé et cloné	Nyengaard, 1995; Madsen, 1998a; Josephsen, 1998
<i>LiaDI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W39	non-déterminé	non-déterminé		Nyengaard, 1995
<i>LiaDII</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W39	pHW393	5'-GC/NGC-3'	Séquencé et cloné	Madsen, 1998b
<i>LiaGI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> G2	non-déterminé	5'-G/CTAGC-3'	Cette étude	
<i>LiaHI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> H	non-déterminé	5'-CCTAGC-3'	Cette étude	
<i>LiaMI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> M19	non-déterminé	5'-CCNGG-3'	Cette étude	
<i>ScrFI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> UC503	Chromosome	5'-CC/IGG-3'	Séquencé et cloné	Fitzgerald, 1982; Davis, 1993; Twomey, 1993 et 1997
<i>Lia497I</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> NCDO497	non-déterminé	5'-CCWGG-3'		Mayo, 1991
<i>LiaDCHI (LiaII)</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> DCH-4	pSRQ700	5'-GATC-3'	Séquencé et cloné	Moineau, 1995
<i>LiaKR2I</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> KR2	pKR223	5'-GATC-3'	Séquencé et cloné	Twomey, 1998
Type-III					
<i>LiaFI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LL42-1	pND801	non-déterminé	Séquencé et cloné	Su, 1999
Type non-classé					
<i>LiaI</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ME2	pTR2030	non-déterminé	Séquencé et cloné	Klaenhammer, 1985; Hill, 1991; O'Sullivan, 1995 et 1998

Tableau 3. Les principaux systèmes R-M caractérisés chez *L. lactis*. **N**, tous les nucléotides; **R**, purine; **Y**, pyrimidine; **W**, A ou T. Lorsque le site de clivage est connu, il est indiqué par "r".

Un certain nombre de gènes de structure des endonucléases et des méthylases ont été séquencés et clonés. En effet, l'enzyme *LlaI*, encodé par le plasmide pTR2030 chez *L. lactis* ssp. *lactis* ME2, a été la première endonucléase séquencée (**Hill et coll., 1991; O'Sullivan et coll., 1995**). D'autres séquences nucléotidiques ont suivi : *LlaBI* (**Nyengaard et coll., 1993, 1995 et 1996**), *LlaCI* (**Josephsen et coll., 1998; Madsen et coll., 1998a; Nyengaard et coll., 1995**), *LlaDII* (**Nyengaard et coll., 1995; Madsen et coll., 1998b**), *LlaDCHI* (désigné antérieurement : *LlaII*; **Moineau et coll., 1995**), et *LlaKR2I* (**Twomey et coll., 1998**). De plus, les systèmes partiellement caractérisés sont *LlaAI* (**Nyengaard et coll., 1993 et 1995**) et *Lla497I* (**Mayo et coll., 1991**) (**Tableau 3**). Enfin, deux systèmes encodés par les plasmides naturels pIL103 et pIL107, encore non-caractérisés, ont été détectés chez *L. cremoris* souche IL964 (**Gautier et coll., 1987**).

En dépit du nombre de systèmes R-M identifiés, un seul cas de système R-M de type-I a été isolé chez *L. lactis* souche IL1403 (**Schouler et coll., 1998b**) et il représente seulement le troisième de sa catégorie à être découvert chez les Gram positifs (**Schouler et coll., 1998a**). Également, plus récemment, Su et

coll. (1999) ont découvert le premier système R-M type-III chez *L. lactis*. Vraisemblablement, ce système est non seulement le premier caractérisé chez le genre *Lactococcus*, mais aussi chez une bactérie Gram positif.

5. Les systèmes R-M de type-II

5.1 Distribution

Grâce à leur spécificité et à leur simplicité, les systèmes R-M/II sont de loin les plus étudiés et les plus utilisés. À ce jour, il existe plus de 2500 endonucléases identifiées et de ce nombre, plus de 100 ont été séquencées et clonées (**Roberts *et coll.*, 1998**). Cependant, plusieurs endonucléases isolées sont des isoschizomères (i.e. enzymes qui reconnaissent et clivent au même endroit) ou des néoschizomères (i.e. enzymes qui possèdent la même séquence de reconnaissance mais qui clivent à une position différente) d'enzymes de restriction déjà identifiés (**Pingoud *et coll.*, 1997**).

5.2 Mécanismes de reconnaissance et de clivage

Les endonucléases de type-II reconnaissent particulièrement les séquences de 4-8 nucléotides (**Bickle *et coll.*, 1993**). Elles ont joué un rôle majeur dans le développement de la technologie de l'ADN recombinant et par conséquent, ont fait l'objet de nombreuses études dont le but était d'élucider et comprendre leur fonctionnement (**Aggarwal, 1995; Anderson, 1993; Bickle *et coll.*, 1993; Kessler *et coll.*, 1990; Jeltsch *et coll.*, 1996a; M^cCelland *et coll.*, 1994; Wilson, 1991b**).

Pour jouer efficacement son rôle d'agent de défense, un enzyme de restriction doit pouvoir localiser rapidement une séquence de reconnaissance sur l'ADN étranger. Ce processus doit être fait avant la modification par son homologue, la méthylase. Le mécanisme global de reconnaissance par les enzymes de type-II se ferait en trois étapes (**Pingoud *et coll.*, 1997**). D'abord, pour localiser le site de reconnaissance, l'endonucléase se fixe d'une façon aléatoire sur l'ADN. Cette association non-spécifique résulte en un complexe enzyme-ADN relâché (**Figure 2a**). L'interface entre l'enzyme et l'ADN renferme une grande quantité d'eau (**Sidorova *et coll.*, 1996**), ce qui facilite les déplacements potentiels de l'endonucléase. Ensuite, il y a diffusion

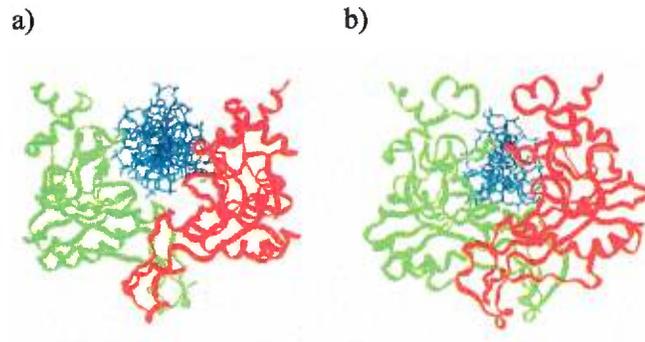


Figure 2. Structure du complexe *EcoRI*-ADN. **a)** Complexe non-spécifique: *EcoRI* (vert et rouge) se fixant sur une séquence non-spécifique (bleu). **b)** Complexe spécifique: *EcoRI* se fixant à la séquence spécifique.

Tiré de Pingoud *et coll.* (1997).

linéaire de l'enzyme sur l'ADN jusqu'au site de reconnaissance. Cette localisation d'une cible par diffusion a été décrite en outre pour le répresseur *lac* (Winter *et coll.*, 1981) et pour d'autres enzymes de restriction (Ehbrecht *et coll.*, 1985; Jeltsch *et coll.*, 1996b; Terry *et coll.*, 1985). Puis, lorsque le site spécifique a été atteint, il y a formation du complexe spécifique. Les liens électrostatiques entre les acides aminés et les nucléotides du site se renforcent. Cette interaction peut être observée indirectement par une perte de molécules d'eau dans l'interface du complexe enzyme-substrat (Sidorova *et coll.*, 1996) (Figure 2b). La formation du complexe est presque immédiatement suivie par la coupure de l'ADN, en présence des ions divalents (préférentiellement Mg^{2+} ou alternativement Mn^{2+}).

5.3 Mécanismes de régulation

La régulation, par l'expression de la méthylase avant l'endonucléase de restriction, est surtout nécessaire lors de l'acquisition d'un nouveau système R-M/II dans la cellule. Or, des études sur la physiologie cellulaire suggèrent que cette régulation est également nécessaire pour les systèmes qui sont déjà présents, en particulier lors de la division cellulaire (i.e. phase logarithmique) et lors des situations de stress (O'Sullivan *et coll.*, 1998b; Tao *et coll.*, 1991). Bien que nos

connaissances actuelles ne nous permettent pas de tout comprendre sur les mécanismes de régulation, des évidences suggèrent l'existence d'un mécanisme passif basé sur la composition protéique et l'organisation des gènes. D'abord, la plupart des méthyltransférases sont actives sous forme de monomères, tandis que les endonucléases de restriction sont des homodimères (**Pingoud et coll., 1997**). L'activité de restriction nécessite donc une accumulation de sous-unités protéiques. D'autre part, les approches génétiques des dernières années ont permis, grâce à la connaissance de l'organisation des gènes, d'émettre des hypothèses sur les relations potentielles entre l'expression et la régulation de ces systèmes. Chez les lactocoques, les gènes qui composent les systèmes sont liés et organisés en tandem ou en orientation opposée (**Tableau 4**). Cette organisation est typique pour les systèmes R-M/II retrouvée chez les procaryotes (**Wilson, 1991a et 1991b**). Entre autres, dans le système *LlaDCHI*, deux gènes M sont positionnés en avant du gène R (**Moineau et coll., 1995**) alors que dans celui de *ScrFI*, le gène R est inséré entre deux gènes M (**Davis et coll., 1993; Twomey et coll., 1993 et 1997**). Il est donc évident que cette disposition des gènes priorise l'expression de la méthylase et assure ainsi une protection adéquate de la cellule hôte.

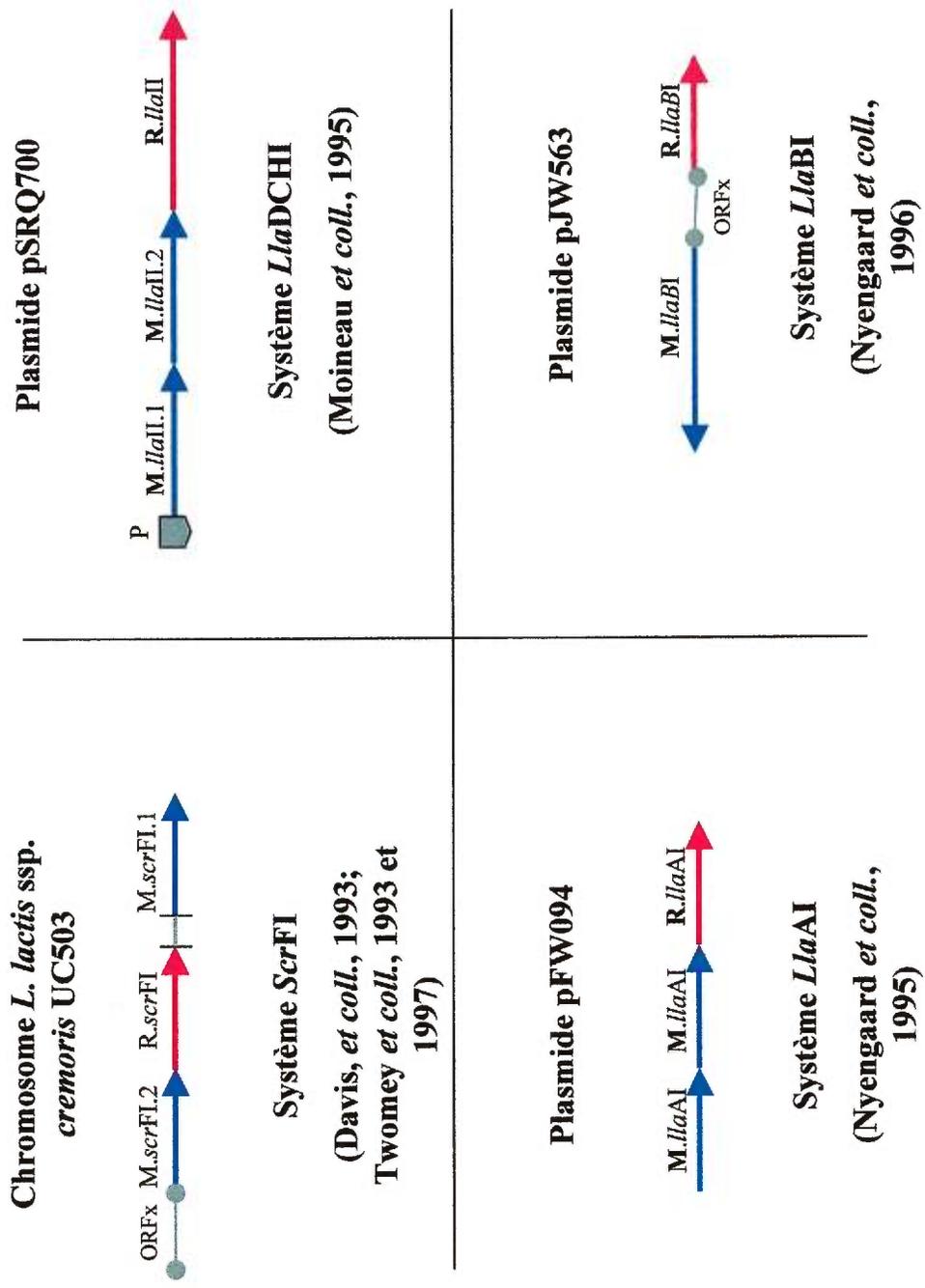


Tableau 4. Présentation simplifiée de l'organisation génétique de chacun des systèmes R-M type-II caractérisé chez les *Lactococci*. Les flèches en rouge représentent l'endonuclease et celles en bleu, la méthylase. Le locus qui encode le système est donné et les références correspondantes sont entre parenthèses.

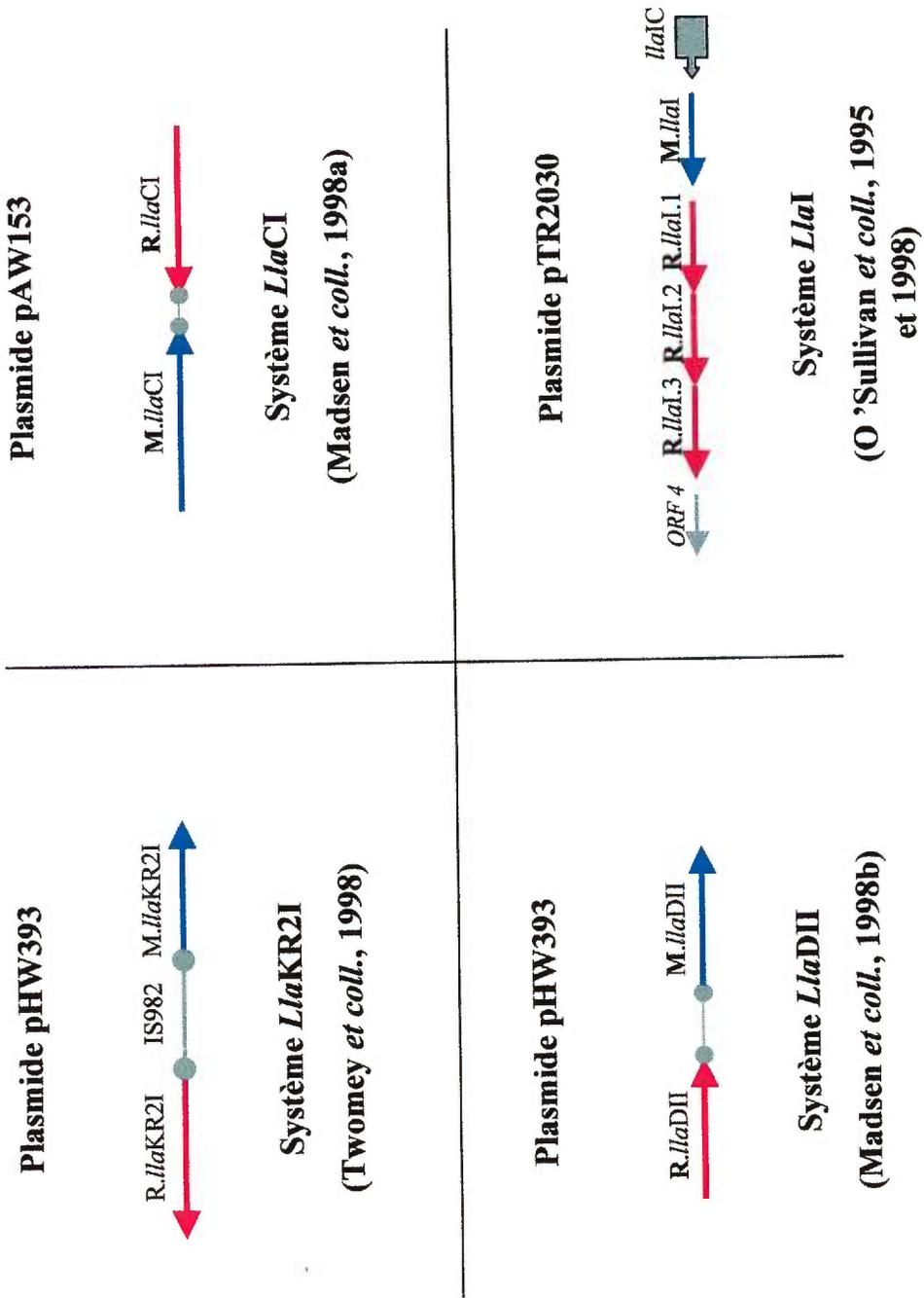


Tableau 4. Suite...

Le mode de régulation n'est cependant pas aussi évident dans les systèmes où les gènes R et M sont en orientation opposée ou encore, lorsque le gène R est localisé en avant du gène M. Les indices de régulation active modulée par un peptide ont été décrits chez *Proteus vulgaris* (Tao *et coll.*, 1992), chez *Bacillus amyloliquefaciens* (Brooks *et coll.*, 1991) et chez *Escherichia coli* (Rimseliene *et coll.*, 1995). Chacun de ces systèmes possède un gène, désigné C (contrôle), qui régule positivement l'activité de restriction et négativement l'activité de modification dans la cellule. L'inactivation de ce gène résulte en une perte de l'activité de restriction alors qu'une complémentation en *trans* la restitue (Brooks *et coll.*, 1991; Ives *et coll.*, 1992; Rimseliene *et coll.*, 1995; Tao *et coll.*, 1991 et 1992). Par ailleurs, l'examen détaillé de quelques autres systèmes R-M/II indique l'existence d'un petit cadre de lecture ouvert (ORF : 'Open Reading Frame'), lié aux gènes R et M, qui participe aussi probablement à l'activité de régulation (Siksnys *et coll.*, 1994; Wilson, 1991b). De leur côté, Tao *et coll.* (1991) ont démontré que plusieurs de ces petits ORF codent pour les protéines régulatrices similaires à celle du système *PvuII*. De plus, dans le système *LlaBI* (Nyengaard *et coll.*, 1996), un ORF (ORFx) qui encode un peptide homologue à *pvuIIW* empêche l'association des sous-unités de l'endonucléase (Adams *et coll.*, 1995).

D'autres mécanismes de régulation active au niveau transcriptionnel et traductionnel ont été proposés (**Madsen *et coll.*, 1998a et 1998b; Moineau *et coll.*, 1995; Nyengaard *et coll.*, 1995; O'Sullivan *et coll.*, 1998a; Twomey *et coll.*, 1997**). Cependant, ces sujets sortent du cadre de la présente étude et ne seront donc pas discutés dans ce mémoire.

6. La recherche de nouvelles endonucléases

6.1 Approche classique

Les propriétés particulières des enzymes de restriction de type-II ont suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. Par conséquent, différents *taxa* de bactéries ont été investigués pour la production d'enzymes de restriction. En dépit du nombre impressionnant d'enzymes isolés, il existe encore beaucoup de séquences spécifiques pour lesquelles aucun enzyme de restriction n'a pu être identifié. De ce fait, plusieurs groupes continuent toujours à cribler différentes espèces bactériennes dans le but de trouver de nouveaux enzymes.

6.2 Approche synthétique

La création de nouvelles enzymes par ingénierie fascine depuis toujours les chercheurs. La complexité de ces enzymes représente sans doute un défi de taille qui ne laisse personne indifférent. Contrairement à d'autres enzymes se fixant à l'ADN, il existe peu de similarité, au niveau nucléotidique, entre les endonucléases de restriction (**Heitman, 1993**). En fait, les homologues sont seulement rencontrés chez les isoschizomères (**Barany et coll., 1992; Kapfer et coll., 1991; Stephenson et coll., 1989; Wilson, 1991a; Xu et coll., 1992 et 1995**). Les structures cristallographiques de *EcoRI* (**Aggarwal, 1995; Kim et coll., 1990**), *EcoRV* (**Kostrewa et coll., 1995; Winkler et coll., 1993**), *PvuII* (**Cheng et coll., 1994**), et *BamHI* (**Newman et coll., 1995**) démontrent que ces enzymes utilisent chacun une stratégie unique dans la reconnaissance de l'ADN. Ces résultats témoignent de la grande diversité structurale des endonucléases de type-II. Grâce aux structures cristallographiques, on a pu observer les relations étroites entre les acides aminés (aa) et les bases azotées de la séquence de reconnaissance (**Aggarwal et coll., 1995; M^cClarín et coll., 1986**). Alors, il a été suggéré qu'en altérant ces aa, on pourrait créer de nouvelles spécificités. Toutefois les mutations des aa de *EcoRI* (**Alves et coll., 1989; Flores et coll., 1995; Geiger et coll., 1989; Hager et coll., 1990; Heitman et**

coll., 1990; Jeltsch *et coll.*, 1993; Osuna *et coll.*, 1991) et *EcoRV* (Thielking *et coll.*, 1991; Wenz *et coll.*, 1994) n'ont donné que des enzymes inactifs. Par la suite, des résultats plus encourageants ont été obtenus lors des études réalisées sur *FokI*, une endonucléase de type-II_s. Effectivement, les expériences de fusion entre le domaine catalytique de *FokI* et le domaine de fixation à l'ADN de Gal4 (Kim *et coll.*, 1998) ou de Ubx (Kim *et coll.*, 1994) ont donné des enzymes chimériques actives. L'ingénierie de nouveaux enzymes de restriction ne fait que débiter. Une meilleure compréhension des interactions entre l'endonucléase et son substrat nous permettra sans doute d'atteindre notre but dans un futur rapproché.

7. Applications des enzymes de restriction

7.1 Industrie biotechnologique

Les enzymes de restriction sont utilisés dans presque tous les laboratoires de recherche, tant dans le domaine de la microbiologie que celui de la biologie moléculaire ou de la biochimie. En effet, ils sont employés dans différentes techniques du génie génétique. De ce fait, plusieurs centaines d'endonucléases avec différentes spécificités sont vendues commercialement.

7.2 Industrie agroalimentaire

Les bactériophages constituent une sérieuse menace pour l'industrie laitière. Effectivement, l'infection virale provoque une baisse ou une inhibition de la production d'acide par les lactococci (**Daly et coll., 1996**). Par conséquent, les manufacturiers emploient couramment les souches résistantes dans leur levain. Puisqu'aucune souche ne peut être parfaitement insensible aux bactériophages, leur exploitation est limitée à une courte période de temps. Face à ce problème, beaucoup d'efforts ont été investis dans la conception de souches de *L. lactis* améliorées convenant à une utilisation prolongée. Les études ont démontré que la résistance phagique augmente avec le nombre de systèmes de défense naturelle exprimés par les bactéries (**O'Sullivan et coll., 1998b**). La souche *L. lactis* ssp. *lactis* ME2 représente un bon exemple. Cette souche renferme deux systèmes R-M type-II, deux systèmes IA et un système d'inhibition d'adsorption. Cette combinaison de protection a permis à la souche ME2 d'être résistante à la plupart des phages (**Dinsmore et coll., 1995**). Donc, la caractérisation de nouveaux systèmes R-M nous donne la possibilité de créer des souches meilleures, possédant plusieurs niveaux de protection.

8. Objet de la présente étude

Cette étude consiste à cribler la collection de souches *L. lactis* industrielles de notre laboratoire dans le but d'identifier de nouvelles endonucléases de restriction. La caractérisation de ces enzymes a pour objet (1) de trouver de nouveaux enzymes de restriction possédant de nouvelles spécificités et qui seront donc d'une grande utilité pour l'industrie biotechnologique et (2) d'améliorer le choix des souches de *L. lactis* pour l'industrie laitière. En effet, le problème des infections phagiques n'est pas totalement résolu et demeure toujours la cause majeure des pertes de cette industrie. Ultimement, nous voulons développer un protocole de purification visant à isoler les enzymes de restriction produits par *Lactococcus*. Compte tenu de l'intérêt économique des endonucléases de restriction, une purification adéquate d'un enzyme donné permettra sa commercialisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches, milieux de culture, substrats d'ADN, enzymes de restriction et solutions

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont énumérées dans le **Tableau 5 (voir Résultats, p.61)**. Les différentes souches de lactocoques provenaient de la collection du Dre B. Karska-Wysocki (Département de biochimie, Université de Montréal). *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* UC503 a été obtenu de New England BioLabs (NEB). En général, le milieu M17 (Oxoid) supplémenté de 1 % (masse/volume (m/v)) de lactose et 0.8 % (m/v) de glucose (GLM17) a été utilisé pour la croissance des lactocoques (**Terzaghi et coll., 1975**). Quand approprié, 12 g/L d'agar (Difco) ont été ajoutés au milieu GLM17 pour obtenir un milieu solide (GLM17agar). La décarboxylation de l'arginine a été étudiée avec le milieu ``Falkow decarboxylase broth`` (Difco) additionné de 0.5 % (m/v) L-arginine (Sigma). Les substrats d'ADN double brin non-méthylé et les enzymes des restriction provenaient soit de chez NEB, Sigma, Roche (antérieurement Boehringer Mannheim), Amersham Pharmacia Biotech (antérieurement Pharmacia), Life Science (antérieurement Gibco/BRL) et ont été utilisés selon les indications du fournisseur. Les tampons ont tous été autoclavés et filtrés à travers une membrane de 0.22 µm avant l'utilisation. Les membranes filtrantes de 0.45 µm

et de 0.22 μm en cellulose acétate, ont été achetées de la compagnie Nalgene. La composition des tampons utilisés lors de cette étude est détaillée aux pages 55-58.

Croissance des lactocoques

En général, la croissance des lactocoques était réalisée en aérobiose à 30°C durant 17 h à 20 h. Les précultures étaient préparées en inoculant 500 μl de cellules congelées dans 10 ml de milieu GLM17. Pour sa part, la culture est obtenue en inoculant avec 7 ml de préculture dans 400 ml de milieu GLM17. Lorsque le milieu ``Falkow decarboxylase broth`` est employé, 1 ml d'une préculture est lavé deux fois avec 1 ml du milieu Falkow et le culot est resuspendu avec 1 ml de ce même milieu. Par la suite, 50 μl de ce dernier sont transférés dans 5 ml de ce même milieu et incubés à 30°C pendant 48 h à 56 h.

La provision des différentes souches bactériennes utilisées dans cette étude a été obtenue en resuspendant une culture de nuit sur le milieu GLM17 agar avec 5 ml de milieu GLM17 contenant 10 % de glycérol. La suspension bactérienne a ensuite été congelée à -20°C.

Électrophorèse sur gel pour l'analyse de l'ADN

Les échantillons d'ADN ont été analysés sur gel d'agarose 0.4 % (m/v) ou 0.8 % (m/v). La migration s'est faite dans le tampon Tris-Borate-EDTA contenant 0.05 µg/ml de bromure d'éthidium et ce pendant 3 h à 5 h ou pendant toute la nuit (14 h-20 h). L'ADN a été visualisé et photographié sous rayons ultra-violets (UV, 300 nm).

Électrophorèse sur gel pour l'analyse des protéines

Les protéines ont été séparées sur les gels dénaturants SDS-polyacrylamide 10 %. La préparation des réactifs et du tampon d'électrophorèse a été faite conformément aux procédures fournies par BioRad (**Leammi, 1970**). Les protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie (**Sambrook et coll., 1989**) ou au nitrate d'argent (**Wray et coll., 1981**). Les marqueurs de poids moléculaire provenaient de NEB.

Isolement d'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est accomplie selon la méthode décrite par O'Sullivan et Klaenhammer (**1993**).

Dosage des protéines

La concentration de protéines dans une solution est déterminée par la coloration au bleu de Coomassie (**Bradford, 1976**). L'albumine sérique de bovin (BSA, Bio-Rad) a été employée comme standard.

Chromatographie en phase liquide à l'aide du système "Econo System" de Bio-Rad

Le système "Econo System" de BioRad est un système automatisé utilisé pour la chromatographie liquide à basse pression (**Figure 3**). Parmi les principaux composants de ce système, on retrouve d'abord une pompe péristaltique programmable pouvant livrer un débit de 0.1 à 40 ml/min, ensuite un moniteur UV équipé de deux filtres interchangeable (254 nm et 280 nm), d'une lampe UV à mercure et d'une cellule d'écoulement ("Flow cell") de 2 mm de long, aussi un moniteur de gradient, enfin une imprimante et un collecteur de fraction.

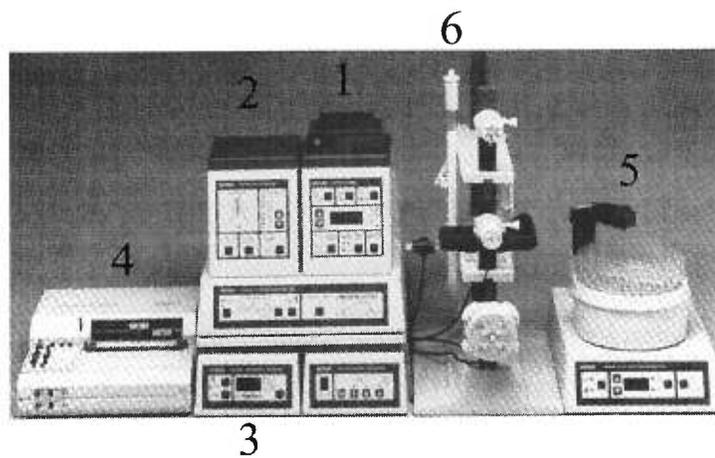


Figure 3 : Système de chromatographie liquide à basse pression « Econo System » de BioRad. 1) Pompe. 2) Moniteur UV. 3) Moniteur de gradient. 4) Imprimante. 5) Collecteur de fraction. 6) Colonne.

La purification des différents enzymes de restriction identifiés dans notre laboratoire a été réalisée, en général, à l'aide du « Econo System », avec trois types de support. D'abord, les matrices Macro-Prep Q (Econo-Pac cartridge Q ou résine Macro-Prep Q, Bio-Rad), destinés à l'échange d'anions, sont composés de groupements chargés positivement qui permettent la séparation des protéines ayant une charge négative nette. Ensuite, les supports d'héparine couplés à l'agarose (Hitrap Heparin, Pharmacia ou Affi-Prep heparin, Bio-Rad), appliqués notamment à la purification des protéases, endonucléases, facteurs de croissance, etc., sont utilisés pour fractionner les protéines en fonction de leur affinité pour l'héparine. Le support de type hydroxyapatite couplé aux billes de céramique (CHT-II, Bio-Rad) est employé pour la séparation des protéines en se basant sur les interactions entre les groupes polaires de la matrice (Ca^{2+} , PO_4^{3-}) et ceux des protéines. De son côté, la matrice Séphacryl-S300 HR (Pharmacia, grosseur de particules entre 25-75 μm) a été utilisée pour séparer les protéines en se basant sur leur masse moléculaire.

Préparation d'extrait acellulaire

Le protocole d'extraction protéique pour une culture de nuit par ultrason est une procédure qui a été mise au point dans notre laboratoire par la Dre B.

Karska-Wysocki. Afin de préserver le plus d'activité enzymatique possible, toutes les manipulations ont été effectuées à 4°C ou sur la glace.

Une culture de 400 ml de *L. lactis* a été centrifugée à 4000 rpm (Rotor HG4L, Sorvall) pendant 40min pour concentrer les cellules. Par la suite, ces dernières ont été lavées deux fois avec 20 ml de tampon A et remises en suspension dans un volume de tampon B suffisant pour obtenir une concentration protéique de 0.6 g/ml. Les bactéries ont été lysées par sonication (Branson, Sonifier[®] cell disruptor 185). Les impulsions, à la puissance entre 5 et 6, ont été émises à quinze reprises avec un repos d'une minute entre chaque pulsation de 20 secondes. Les débris insolubles ont été enlevés par centrifugation à 10 000 rpm (Rotor SS34, Sorvall) pendant 15 min et le surnageant a été conservé à -20°C.

Étude de l'activité endonucléasique

L'ADN non-méthylé des phages λ (Amersham Pharmacia Biotech), T7 (Sigma), Adenovirus-2 (Life Science), Φ x-174 (NEB) et PM₂ (Roche) ainsi que l'ADN non-méthylé des plasmides pBR322 (NEB) et Litmus 28 (NEB) ont été employés comme substrat pour la détection de l'activité de restriction. En général, un volume de 6 μ l de chaque dilution de l'extrait brut a été mis en présence de 0.5 μ g d'un substrat d'ADN double brin non-méthylé dans 30 μ l

de tampon C. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 1 h puis analysé par l'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'analyse de la présence d'activité nucléasique non spécifique dans les différentes préparations de *LlaGI* purifiés a été effectuée en incubant un excès d'enzymes avec 1 µg de substrat d'ADN dans 50 µl de tampon G2. La présence de nucléases contaminantes a été décelée en comparant le profil de digestion endonucléasique d'une heure à celui d'une nuit. Un patron altéré après la nuit indique la présence d'un niveau détectable de nucléases non-spécifiques (NEB, 1999). La présence d'endonucléases non-spécifiques a été déterminée en incubant, pendant 4 h, l'enzyme *LlaGI* avec l'ADN du phage Φ_X -174 RFI (forme superenroulée), qui ne possédait pas de site spécifique pour cette endonucléase. Une conversion de la forme RFI à la forme RFII (forme relâchée) indique la contamination avec les endonucléases non-spécifiques (NEB, 1999).

À moins d'indication contraire, une *unité* est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour digérer complètement 1 µg d'ADN de λ prédigéré par *HindIII* dans un volume de 50 µl, à 37°C, pendant 1 h.

Isolement préliminaire de *LlaMI* et *LlaGI*

Pour isoler l'enzyme *LlaMI*, l'extrait brut de la souche M19 a été dilué 4 fois avec le tampon C puis filtré à travers une membrane de 0.45 µm (Nalgene). Un ml de ce matériel a été appliqué, à un débit de 2 ml/min, sur 2 colonnes échangeuses d'anions (BioRad Econo-Pac Q cartridge, 1 ml) reliées en série (volume mort = 0.9 ml) et préalablement équilibrées avec le tampon D. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans le même tampon en 25 min. L'activité de restriction a été identifiée en incubant 6 µl de chacune des fractions avec 0.25 µg de l'ADN du phage λ non-méthylé, dans 30 µl de tampon C, à 37°C, pendant 1 h. Les tubes contenant l'enzyme spécifique ont été entreposés à -20°C.

Pour l'isolement de *LlaGI*, un volume d'un ml de l'extrait acellulaire de la souche G2 a été dilué 1:10 avec le tampon C et filtré à travers une membrane de 0.45 µm (Nalgene). Une méthode modifiée de Poch *et coll.* (1995) a été utilisée comme première étape de fractionnement. Brièvement, dix aliquots de 1 ml d'extrait brut ont été transférés dans 10 tubes eppendorfs de 1.5 ml. Un volume de 500 µl d'une résine échangeuse d'anions (BioRad, Macro-Prep Q) a été ajouté dans chaque tube. Le mélange a été incubé pendant 30 min, à 4°C, avec une légère agitation. Par la suite, les microtubes ont été

centrifugés pendant 15 min pour enlever le surnageant (les protéines non-adsorbées) et la résine a été lavée 2 fois avec le tampon E. Puis, l'enzyme a été élué en lot avec 2 x 500 µl de tampon E contenant 230 mM de NaCl. Dix ml de ce matériel ont été filtrés à travers une membrane de 0.45 µm et chargés, à 1 ml/min, sur une colonne héparine (Pharmacia, Hitrap heparin, 5 ml; volume mort = 2 ml) équilibrée auparavant avec le tampon E. Cette colonne a été lavée avec le tampon E puis les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 1 M) dans le même tampon en 120 min. La détection de l'activité de restriction a été réalisée en incubant 6 µl de chacune des fractions avec 0.125 µg de l'ADN du phage λ non-méthylé à 37°C, pendant 1h, dans 30 µl de tampon G. Les tubes contenant les fractions les plus actives ont été sélectionnés. L'enzyme *LlaGI* partiellement purifié a été concentré par dialyse contre du polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000) solide et conservé à -20°C avec 40 % de glycérol.

Caractérisation de *LlaMI*, *LlaHI* et *LlaGI*

À moins d'indication contraire, les études du profil de restriction des enzymes *LlaMI* et *LlaHI* ont été faites dans 30 µl de tampon C, en présence de 0.25 µg de substrat d'ADN. Pour sa part, l'activité de *LlaGI* a été investiguée soit dans 20 µl ou 30 µl de tampon G, en présence de 0.125 µg de substrat

d'ADN. La digestion standard est réalisée à 37°C pendant 1 h. Les séquences de reconnaissance de *LlaMI* et de *LlaHI* ont été déduites soit en comparant leur profil de digestion d'un substrat donné avec celui des autres enzymes ou à partir du nombre de fragments produits pour un substrat donné.

Les masses moléculaires de *LlaMI* et *LlaHI* ont été déterminées par chromatographie sur tamis moléculaire. Une colonne de Séphacryl S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech), 28 cm x 2 cm de diamètre (volume mort = 16 ml), équilibrée avec le tampon E contenant 100 mM de NaCl, a été calibrée avec les marqueurs de poids moléculaire (BioRad). Ensuite, 100 µl d'extrait acellulaire brut ont été chargés sur la colonne à un débit de 0.25 ml/min. L'élution des protéines a été faite avec le même tampon. Le volume exact d'élution de l'endonucléase a été déterminé.

La masse moléculaire de *LlaGI* a été estimée tant par ultrafiltration sur Microcon-50 (limite discriminatoire = 50 000 Da, Millipore) et Millipore-100 (limite discriminatoire = 100 000 Da, Millipore) que par chromatographie en phase liquide sur tamis moléculaire. L'ultrafiltration a été effectuée en centrifugeant, pendant 5 min, 500 µl d'une préparation d'enzymes partiellement purifié dilué 1:1 avec le tampon F. Le filtrat (la partie qui a traversé la membrane) et le concentré (la partie qui n'a pas traversé la membrane) ont été analysés pour la présence d'activité de restriction.

Parallèlement, une colonne de Séphacryl S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech), 28 cm x 1 cm de diamètre (volume mort = 12 ml), équilibrée avec le tampon F, a été d'abord calibrée avec 100 µl de marqueurs de poids moléculaire. Ensuite, 200 µl de *LlaGI* partiellement purifiés contenant 200 µg de BSA (BioRad) ont été appliqués sur cette colonne et élués avec un débit de 6 ml/h dans le tampon F. Le volume exact d'éluion de *LlaGI* a été déterminé. La masse a été estimée à partir de la droite de régression linéaire simple (Scherrer, 1984).

Purification de *LlaMI*, *LlaHI* et *LlaGI*

Pour purifier *LlaMI*, l'extrait acellulaire (250 µl) a été dilué 4 fois avec le tampon C et filtré à travers une membrane de 0.45 µm avant d'être appliqué à 1 ml/min sur une colonne héparine (BioRad Econo-Pac heparin cartridge, 5 ml; volume mort = 2 ml) équilibrée avec le tampon D. Après lavage avec 15 ml de ce dernier tampon, les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans le tampon D en 35 min. Les fractions actives ont été réunies et chargées, à 1 ml/min, sur 2 colonnes Q reliées en série, équilibrées antérieurement avec le tampon D. Un gradient linéaire de 0 à 600 mM de NaCl, en 35 min, dans le même tampon a été utilisé pour éluer les

protéines. Les tubes qui contenaient l'enzyme de restriction ont été gardés à -20°C .

Similairement, l'extrait acellulaire de *L. lactis* ssp. *cremoris* H24 a été purifié par deux étapes successives de chromatographie liquide à basse pression. Brièvement, l'extrait (250 μl) a été dilué 1:3 avec le tampon D et filtré à travers une membrane de 0.45 μm . Un débit de 1 ml/min a été utilisé pour charger 1 ml de l'échantillon sur la colonne d'héparine (BioRad, Econo-Pac heparin cartridge, 5 ml; volume mort = 2 ml), préalablement équilibrée avec le tampon D. Puis cette colonne a été lavée avec 15 ml de tampon D. Un gradient linéaire, en 50 min, de 0 à 1 M de NaCl, dans le même tampon, a été appliqué sur la colonne pour éluer les protéines. Les fractions actives ont été identifiées, diluées 10 fois avec le tampon d'élution et appliquées sur 2 colonnes Q (BioRad, Econo-Pac Q cartridge, 1 ml) reliées en série (volume mort = 0.9 ml), équilibrées préalablement avec le tampon D. L'élution des protéines (un gradient de NaCl : 0-0.25 M en 10 min, 0.25-0.3 M en 20 min, 0.3-0.7 M en 20 min) a été exécutée dans le tampon D à un débit de 1 ml/min. Les fractions ont été analysées et celles qui montraient une activité de restriction sont conservées à -20°C .

La purification de *LlaGI* a été tentée en premier lieu par chromatographie en deux étapes puis en trois étapes successives. D'abord, une

colonne mesurant 19 cm x 1 cm de diamètre (volume mort = 7 ml), contenant de la résine Macro-Prep Q (BioRad), a été équilibrée avec la tampon E. L'extrait acellulaire de G2, dilué 1:2 (800 µl d'extrait dans 1.6 ml de tampon E) et filtré à travers une membrane de 0.22 µm, a été chargé à 30 ml/h sur la colonne Q. Ensuite, cette dernière a été lavée avec 60 ml de tampon E. Puis, l'enzyme a été élué avec un gradient linéaire de KCl, 0 à 1 M en 10 h. Les fractions qui contenaient l'activité endonucléasique ont été appliquées, avec un débit de 30 ml/h, sur une colonne héparine (Pharmacia, Hitrap heparin, 5 ml; volume mort = 2 ml) préalablement équilibrée avec la tampon E. La colonne a été lavée avec le tampon E jusqu'à ce que l'absorbance du liquide élué de la colonne revienne à la ligne de base. Les protéines fixées ont été éluées de la matrice avec un gradient de KCl, 0 à 1 M en 140 min, dans le tampon E. Les fractions qui possédaient une activité de restriction ont été concentrées par dialyse contre le PEG 6000. Par la suite, ce matériel a été dialysé contre 1 L de "tampon de dialyse" pendant 2.5 h à 4°C. La solution finale a été analysée sur gel SDS-polyacrylamide. Enfin, les protéines ont été visualisées par coloration au nitrate d'argent.

Un nouveau protocole impliquant trois étapes chromatographiques a été développé. La chromatographie est exécutée successivement sur les colonnes Q, hydroxyapatite et héparine. Avant l'utilisation, toutes les colonnes ont été équilibrées avec le tampon H. L'extrait brut de la souche G2, 1 ml, est dilué

1:1 avec le tampon H et filtré à travers une membrane de 0.22 μm pour enlever les particules en suspension. L'échantillon a été d'abord chargé sur une colonne contenant de la résine Q, 27 cm x 1 cm (volume mort = 9 ml), à un débit de 30 ml/h. Ensuite, la colonne a été lavée et les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl, 0 à 1 M en 800 min, dans le tampon H avec le même débit. Le volume total du gradient est de 400 ml. Les fractions (6 ml/tube) ont été collectées à toutes les 12 min et celles qui possédaient une activité de restriction ont été rassemblées et diluées 1:3 avec le tampon H. Cette solution a été chargée sur la colonne d'hydroxyapatite (Bio Rad, Econo-Pac CHT-II cartridge, 5 ml; volume mort = 2 ml) à un débit de 2 ml/min. Après lavage de la colonne avec 15 ml de phosphate de potassium 10 mM, pH 7.6, l'enzyme a été élué, à 30 ml/h, de la colonne avec un gradient linéaire de 10-500 mM de phosphate de potassium, pH 7.6 en 10 h. Le volume total récolté était de 300 ml. Les fractions (6 ml/tube) ont été collectées à toutes les 12 min. Subséquemment, les fractions actives ont été appliquées sur la colonne héparine (Pharmacia Hitrap Heparin, 5 ml; volume mort = 2 ml) à un débit de 2 ml/min. La colonne a ensuite été lavée avec 15 ml de tampon H et l'enzyme a été éluée, à 30 ml/h, avec un gradient linéaire de 0-1 M de NaCl dans le tampon H en 10 h. Les fractions actives ont été réunies et concentrées à l'aide de Centricon Plus-20 (Amicon, High-Flux polyethersulfone, limite discriminatoire = 8000 Da). Du glycérol a été ajouté à la préparation finale

pour obtenir une concentration de 20 % (v/v). *LlaGI* purifié a été entreposé à –
20°C.

LISTE DES TAMPONS

Tampon A

Tris-HCl	50 mM
EDTA	1 mM
β -mercapthoethanol	7 mM
pH	7.0

Tampon B

Tris-HCl	50 mM
EDTA	1 mM
β -mercapthoethanol	7 mM
PMSF	1 mM
NaN_3	1 mM
NaCl	200 mM
Glycérol	10 % (v/v)
pH	7.0

Tampon C

Tris-HCl	10 mM
MgCl_2	10 mM
NaCl	50 mM
*PMSF	1 mM
pH	7.5

* Phénylméthylsulfonylfluoride (inhibiteur de protéases)

LISTE DES TAMPONS (suite)

Tampon D

Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
pH	7.5

Tampon E

Tris-HCl	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Glycérol	10 % (v/v)
pH	8.0

Tampon F

Tris-HCl	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	150 mM
PMSF	1 mM
Glycérol	10 % (v/v)
pH	8.0

LISTE DES TAMPONS (suite)

Tampon G

Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	7.5 mM
DTT	1 mM
KCl	100 mM
pH	7.5

Tampon G2

Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	7.5 mM
DTT	1 mM
KCl	100 mM
pH	8.0

Tampon H

Tris-HCl	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Glycérol	10 % (v/v)
pH	7.5

LISTE DES TAMPONS (suite)

Tampon de Dialyse

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
KCl	50 mM
Glycérol	40 % (v/v)
pH	8.0

Tampon Tris-Borate-EDTA

Tris base	89 mM
Acide Borique	89 mM
EDTA	2,5 mM

RÉSULTATS

Criblage des souches à la recherche de l'activité de restriction

Au total, huit souches de *Lactococcus lactis* de notre collection ont été investiguées pour la production d'endonucléases de restriction (**Tableau 5**). Les extraits acellulaires de deux des huit souches étudiées démontrent une activité de restriction sur l'ADN du phage λ (ADN de λ). L'hydrolyse de ce substrat par l'extrait protéique de *L. lactis* ssp. *lactis* M19 et celui de *L. lactis* ssp. *cremoris* H24 à des sites spécifiques suggère fortement la présence d'endonucléases de restriction de type-II. Par conséquent, en accord avec la nomenclature des enzymes de restriction proposée par Smith et Nathans (**1973**), les enzymes site-spécifiques produits par les souches M19 et H24 ont été désignés *LlaMI* et *LlaHI*, respectivement. La **figure 4** présente le profil de digestion de l'ADN λ par ces enzymes. Le caractère distinct de ces deux profils indique que *LlaMI* et *LlaHI* reconnaissent des séquences nucléotidiques différentes. En effet, le nombre de fragments de clivage de l'ADN λ généré par *LlaMI* était de loin supérieur au nombre généré par *LlaHI*.

SOUCHES (<i>L. lactis</i> :)	ACTIVITÉ ENDONUCLÉASIQUE	SITE DE RECONNAISSANCE
<i>ssp. cremoris</i> 2(2)Lc	-	-
<i>ssp. cremoris</i> D165(25)	-	-
<i>ssp. lactis</i> M19	+	CCNNGG
<i>ssp. cremoris</i> Y(12)	-	-
souche Y(11)	-	-
souche M(20)	-	-
souche D62(22)	-	-
<i>ssp. cremoris</i> H24	+	GCTAGC
<i>ssp. cremoris</i> G2 ^a	+	G/CTAGC

^a Souche identifiée antérieurement dans notre laboratoire (Karska-Wysocki, 1995)

Tableau 5. Liste des souches *L. lactis* investiguées pour la production d'endonucléases de restriction. La présence de l'activité de restriction ainsi que la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme sont exposées. N, tous les nucléotides; “?” indique le site de clivage.

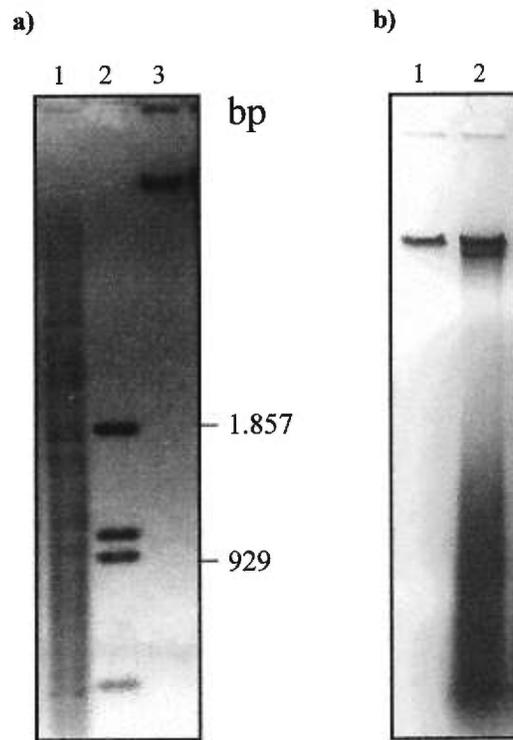


Figure 4. Identification de l'activité de restriction dans l'extrait acellulaire de *L. lactis* ssp. *lactis* M19 et *L. lactis* ssp. *cremoris* H24. Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4%. **a)** ADN λ en présence de l'extrait de la souche M19 (**puits 1**), ADN pBR32/*Bst*NI seul (**puits 2**) et λ (**puits 3**). **b)** ADN λ seul (**puits 1**) et en présence l'extrait de la souche H24 (**puits 2**).

Isolement, caractérisation et purification de *LlaMI*

L'enzyme *LlaMI* a été isolé par chromatographie liquide sur deux colonnes échangeuses d'anions (Bio-Rad, Econo-Pac Q cartridge, 1 ml). Le profil d'absorption (**figure 5a**) démontre une séparation grossière des protéines totales dans l'extrait. Toutefois, il semble que cette étape ait tout de même permis de séparer *LlaMI* des nucléases non-spécifiques (**Figure 5b**). L'enzyme site-spécifique, retrouvé principalement dans le premier pic, a été élué avec 200-320 mM de NaCl (fractions 12-21) alors que l'activité nucléasique non-spécifique, retrouvée surtout dans le deuxième pic, a été éluee avec 340-460 mM de NaCl (fractions 22-27).

Pour mieux caractériser cette activité de restriction, nous l'avons testée sur différents substrats. Le nombre de sites de clivage par *LlaMI* dans l'ADN des plasmides pBR322 (ADN pBR322) et Litmus 28 (ADN Litmus28) ainsi que dans celui des phages Φ x-174 prédigérés par *HaeIII* (ADN Φ x-174/*HaeIII*) et T7 (ADN T7) était approximativement ≥ 8 , > 5 , ≥ 1 et ≥ 9 respectivement (**Figure 6, puits 4,8,12,16**). Il est cependant difficile de déterminer le nombre exact de sites de clivage par *LlaMI* dans les substrats étudiés, car la digestion n'était pas complète. De plus, on peut remarquer que les profils de digestion de l'ADN de pBR322, de Litmus28, de Φ x-174/*HaeIII*, et de T7

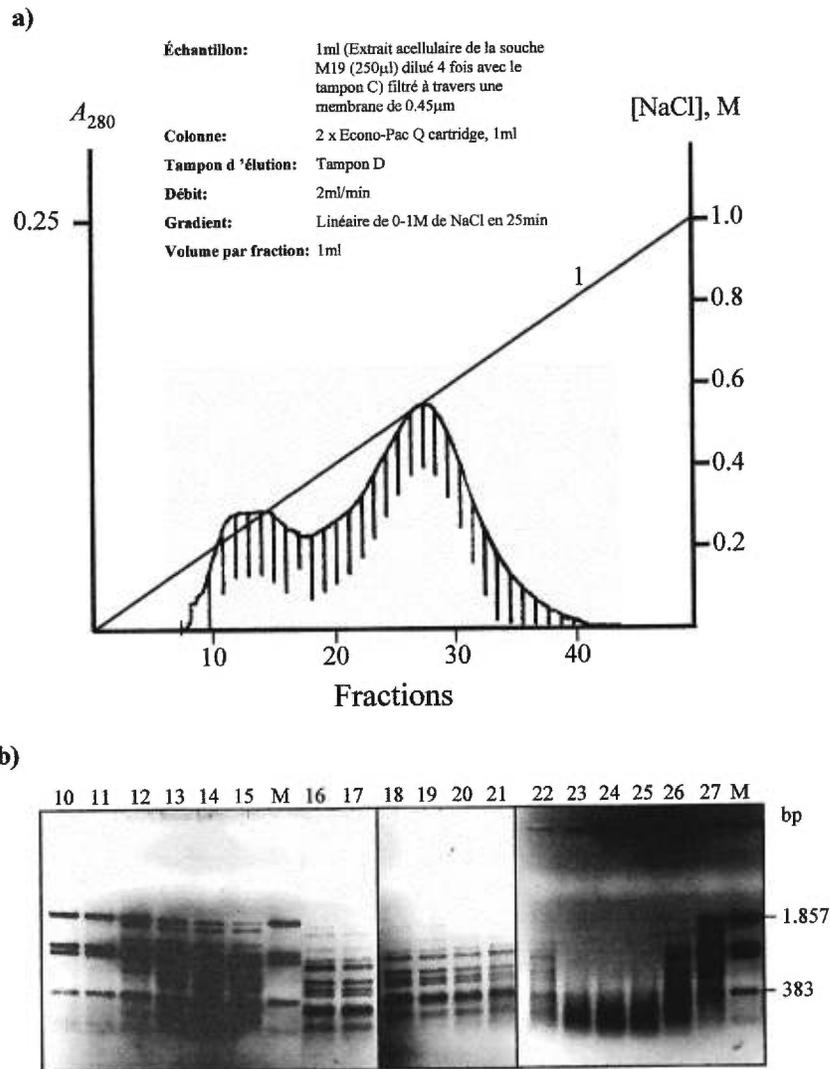


Figure 5. Isolement de *LlaMI* à l'aide du système de chromatographie liquide à basse pression (BioRad Econo System). **a)** Le profil d'élution de *LlaMI* durant la chromatographie sur deux colonnes Q; 1, Le gradient de sel. **b)** L'analyse de l'activité de *LlaMI* dans les fractions sur le substrat pBR322/*Bst*NI. M, pBR322/*Bst*NI seul.

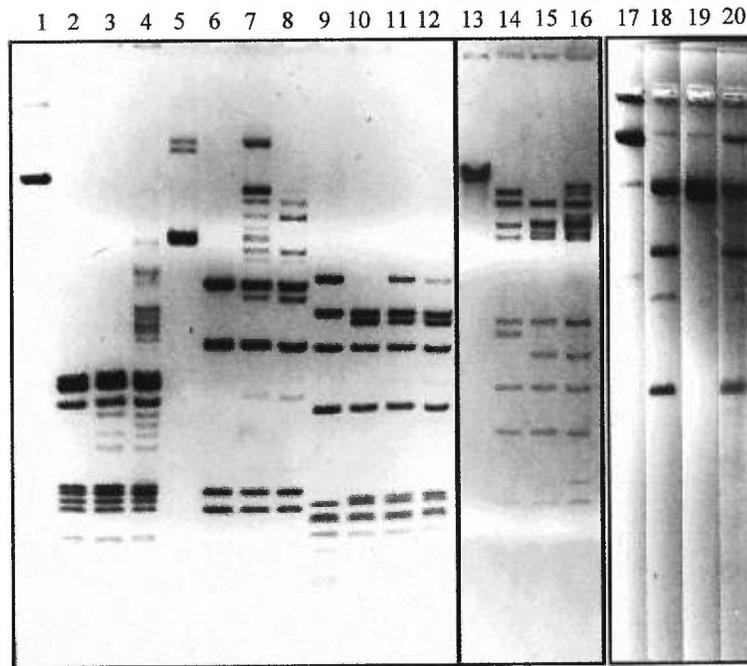


Figure 6. Comparaison des profils de restriction de différents substrats d'ADN double brin par *NciI*, *ScrFI* et *LlaMI*(partiellement purifié). Électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%. Respectivement, l'ADN pBR322, Litmus 28, ϕ x-174/*HaeIII*, T7 et ϕ x-174 RFII (**puits 1, 5, 9, 13 et 17**), digérés par *NciI* (**puits 2, 6, 10, 14 et 19**), digérés par *ScrFI* (**puits 3, 7, 11, 15 et 18**) et digérés par *LlaMI* (**puits 4, 8, 12, 16 et 20**).

par les enzymes *NciI*, *ScrFI* et *LlaMI* étaient presque identiques (**Figure 6, puits 1 à 16**). À partir de ces résultats, la recherche dans différents catalogues commerciaux a permis d'identifier 5 séquences palindromiques pouvant être reconnues par *LlaMI*. Ces séquences et leurs endonucléases correspondantes de même que les fréquences de clivage dans les substrats étudiés sont résumées dans le **tableau 6**. Une déduction logique nous a amenés rapidement à éliminer les séquences 5'-GGWCC-3' et 5'-GGNCC-3' car la fréquence de ces pentanucléotides dans l'ADN T7 (respectivement 54 et 79) ne correspondait pas au nombre de clivage par *LlaMI* (≥ 9) dans ce même substrat (**Figure 6, puits 16**). La séquence 5'-CCWGG-3' a également été écartée puisqu'elle ne se présente qu'à 7 reprises dans l'ADN pBR322 alors que ce substrat est clivé plus de 8 fois par *LlaMI* (**Figure 6, puits 4**). Les deux séquences restantes étaient très similaires. En effet, la séquence 5'-CCNNGG-3', reconnue par *ScrFI*, incluait la séquence 5'-CCSSGG-3', reconnue par *NciI*, puisque N représentait tous les nucléotides (A, T, C ou G) et S représentait seulement G ou C. Donc, si l'enzyme site-spécifique identifie la première séquence palindromique, il en fera autant avec la deuxième séquence. Par ailleurs, il a été démontré que l'ADN Φ x-174 possédait trois sites 5'-CCNNGG-3' et un seul site 5'-CCSSGG-3' (**Watson et coll., 1980**). Or, le profil de digestion de ce substrat par *LlaMI* était identique à celui de *ScrFI* (**Figure 6; puits 18 et 20**). Ces résultats confirment que *LlaMI* reconnaît effectivement la séquence

Séquence de reconnaissance	Enzyme	Souches productrices	Litmus 28	pBR322	T7	λ	$\Phi\chi$ -174/HaeIII
GGWCC	<i>Ava</i> II	<i>Anabaena variabilis</i>	2	8	54	35	1
CCWGG	<i>Bst</i> NI	<i>Bacillus stearothermophilus</i> N	5	7	2	71	2
CCSGG	<i>Nci</i> I	<i>Neisseria cinerea</i>	4	10	9	114	1
GGNCC	<i>Sau</i> 96I	<i>staphylococcus aureus</i> PS96	8	15	79	74	2
CCNGG	<i>Scr</i> FI	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> UC503	9	16	11	185	3

Tableau 6. Présentation des séquences de reconnaissance potentielles de *Lla*MI. Les endonucléases correspondantes et la fréquence des penta-nucléotides retrouvées dans les substrats étudiés sont données. (N) tous les nucléotides (A, T, G ou C), (S) G ou C, et (W) A ou T.

palindromique 5'-CCNGG-3'. Cependant, ces observations ne nous permettaient pas de dire si *LlaMI* était une isoschizomère ou une néoschizomère de *ScrFI*, une endonucléase de restriction produite par *L. lactis* ssp. *cremoris* UC503 (Twomey *et coll.*, 1993).

Nous avons ensuite étudié l'influence de la force ionique sur l'activité de *LlaMI*. Bien que *LlaMI* n'ait pas besoin de sel (NaCl ou KCl) pour hydrolyser l'ADN, son activité est cependant augmentée en présence de concentrations de sel de 0.5-1 M (résultats non-présentés). À des concentrations de 1 M, en plus d'accroître l'activité de restriction, le sel a un effet inhibiteur sur l'activité des nucléases non-spécifiques (**Figure 7a**). En effet, la chromatographie par échange d'anions utilisée pour l'isolement de *LlaMI* n'a pas éliminé toute activité nucléasique non-spécifique. Donc, lors d'une incubation prolongée (≥ 2 h) à faible force ionique (50 mM), le profil des fragments générés était flou (**Figure 7a, puit 4**). Par contre, avec le NaCl ou le KCl à 1 M, le profil des fragments générés demeurait net (**Figure 7a, puit 3**). Cependant, les concentrations de chlorure de sodium ou de potassium supérieures à 1 M causaient une diminution de l'activité de restriction (**Figure 7b**).

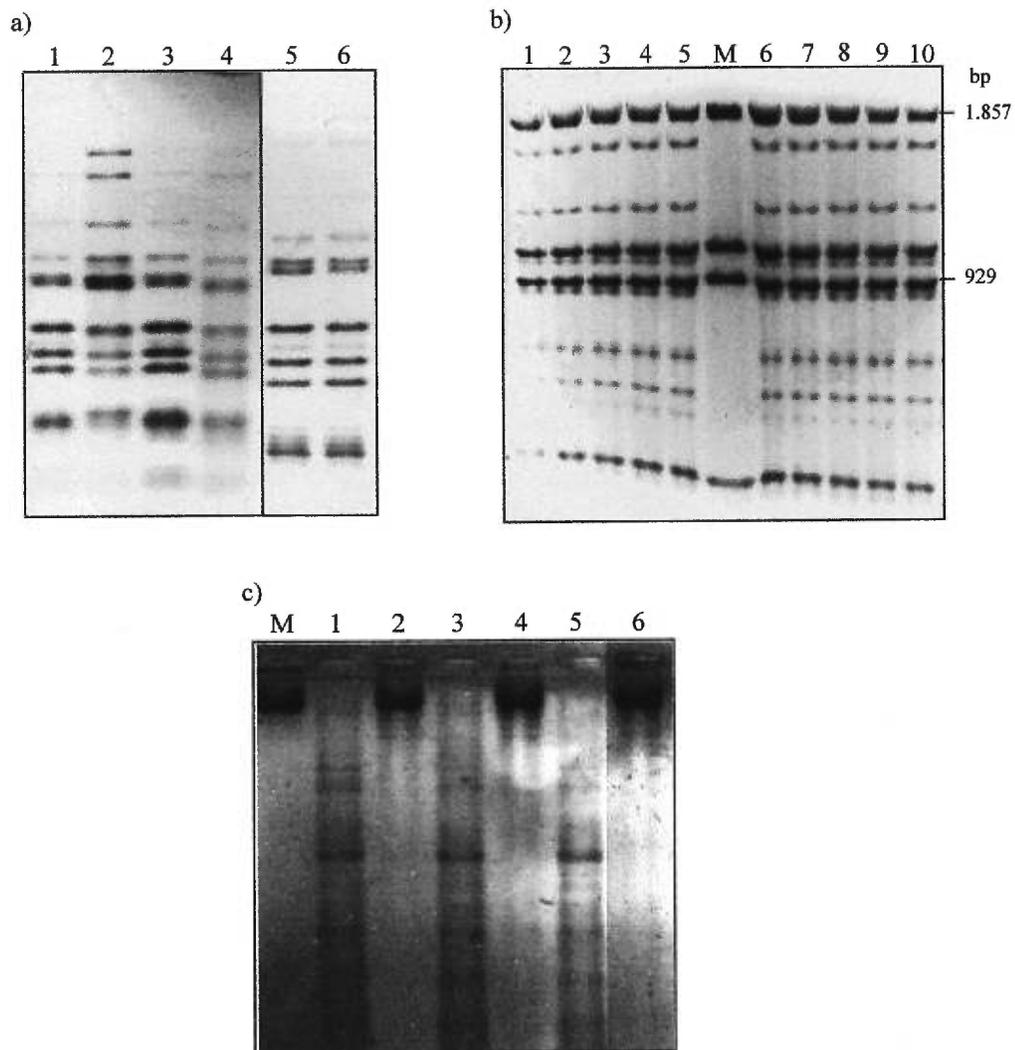


Figure 7. Effet de la concentration en sel (NaCl et/ou KCl) sur l'activité de restriction de *LlaMI* et *ScrFI*. Électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %. **a)** Activité de restriction de *LlaMI* sur l'ADN pBR322/*Bst*NI. Incubation 1h à 37°C dans le tampon C: **Puits 1.** Avec 1 M NaCl; **2.** Avec 0.05 M NaCl. Incubation 2 h: **Puits 3.** Avec 1 M NaCl; **4.** Avec 0.05 M NaCl. Incubation toute la nuit: **Puits 5.** Avec 1 M KCl; **6.** Avec 1 M de NaCl. **b)** Activité de restriction de *LlaMI* sur pBR322/*Bst*NI. Incubation 1 h à 37°C. **Puits:** Avec NaCl: **1.** 2 M; **2.** 1.8 M; **3.** 1.6 M; **4.** 1.4 M; **5.** 1.2 M; Avec KCl: **6.** 2 M; **7.** 1.8 M; **8.** 1.6 M; **9.** 1.4 M; **10.** 1.2 M; **M.** L'ADN pBR322/*Bst*NI seul. **c)** Activité de *ScrFI* partiellement purifié étudié sur l'ADN du phage λ dans le tampon C. **Puits:** Incubation 1 h: **1.** Avec 0.05 M NaCl; **2.** Avec 1 M NaCl; Incubation 2 h: **3.** Avec 0.05 M NaCl; **4.** Avec 1 M NaCl; Incubation 3 h: **5.** Avec 0.05 M NaCl; **6.** Avec 1 M NaCl; **M.** λ seul.

La masse moléculaire de *LlaMI* a été mesurée dans les conditions non-dénaturantes par filtration sur tamis moléculaire. Elle a été évaluée entre 30 kDa et 60 kDa (**Figure 8**). Bien que *ScrFI* et *LlaMI* reconnaissent la même séquence dans l'ADN, nous croyons que ces deux enzymes sont bien distincts. L'analyse des propriétés biochimiques des souches M19 et UC503 ainsi que la caractérisation de leur enzyme de restriction respectif (*LlaMI* et *ScrFI*) démontrent des différences majeures. Premièrement, les résultats de croissance sur le milieu 'Falkow decarboxylase broth' en présence de l'arginine ont indiqué que la souche UC503 était incapable de métaboliser ce substrat contrairement à la souche M19 (**Résultats non-présentés**). En plus, l'endonucléase *ScrFI*, isolée dans les mêmes conditions que l'enzyme *LlaMI*, ne possède pas la même tolérance aux sels que ce dernier. En accord avec les observations de Fitzgerald *et coll.* (1982) qui ont caractérisé *ScrFI*, les sels inhibent dramatiquement son activité de restriction à une concentration de 1 M (**Figure 7c, puits 2,4,6**). De plus, après une incubation prolongée (3 h), l'activité de *ScrFI* n'était guère augmentée (**Figure 7c, puit 6**).

Une purification plus poussée de *LlaMI* a été réalisée par chromatographie successive sur une colonne héparine (Bio-Rad, Econo-Pac heparin cartridge, 5 ml) puis sur deux colonnes Q (Bio-Rad, Econo-Pac Q cartridge, 1 ml). Le profil d'absorption de la chromatographie sur la colonne héparine (**Figure 9a**) semble peu différent de celui de la **figure 5a**, pourtant il

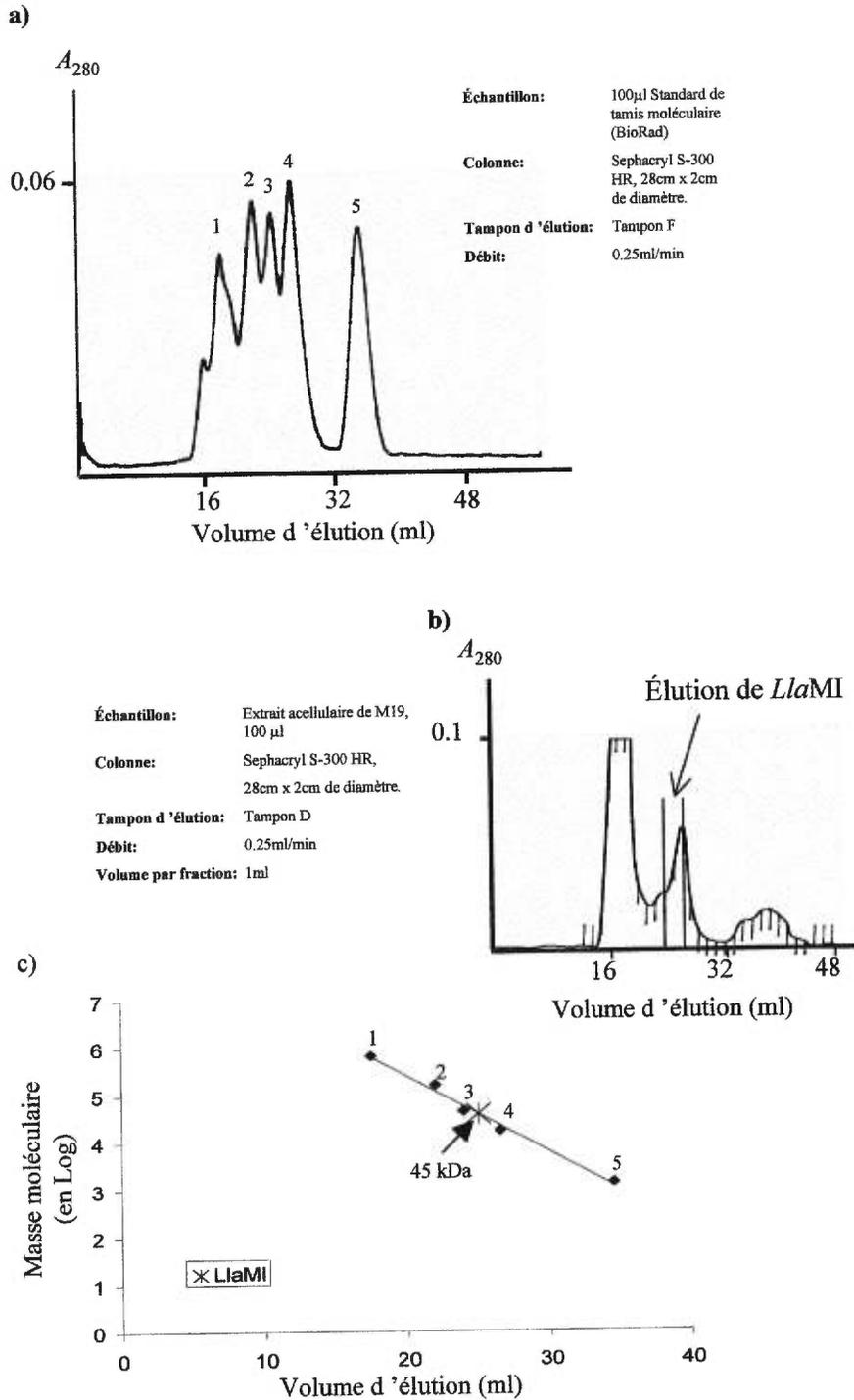


Figure 8. Détermination de la masse moléculaire de *LlaMI* sur gel Séphacryl S-300 HR. **a)** Le profil d'élution des marqueurs de masse moléculaire (Tableau 7a). **b)** Le profil d'élution de l'extrait de la souche M19. **c)** Estimation de la masse moléculaire de *LlaMI*.

a)

Protéine	Poids moléculaire (kDa)
1) Thyroglobuline	670
2) Gamma globuline	158
3) Ovalbumine	44
4) Myoglobine	17
5) Vitamine B12	1,35

b)

Protéine	Poids moléculaire (kDa)
Myosine	212
MBP- β -galactosidase*	158,19
β -Galactosidase	116,35
Phosphorilase b	97,18
Albumine sérique	66,4
Glutamique déshydrogénase	55,56
MBP2*	42,71
Lactate déshydrogénase	36,49
Triosephosphate isomerase	26,62
Inhibiteur de la trypsine	20,04-20,17
Lysozyme	14,31
Aprotinine	6,52
Chaîne A, B de l'insuline	2,34-3,40

* MBP = Maltose binding protein

Tableau 7. Marqueurs de protéine. **a)** Marqueurs de calibration pour colonne gel de filtration (BioRad). **b)** Marqueurs pour gel SDS-polyacrylamide (NEB, Broad Range).

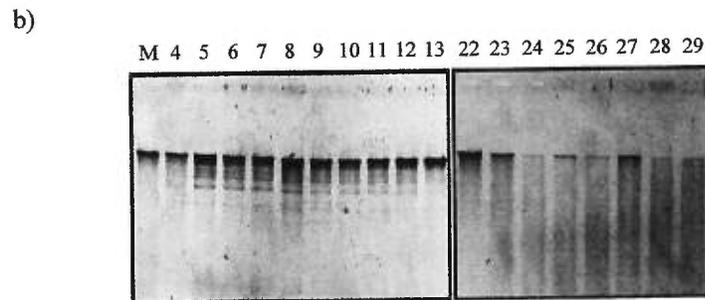
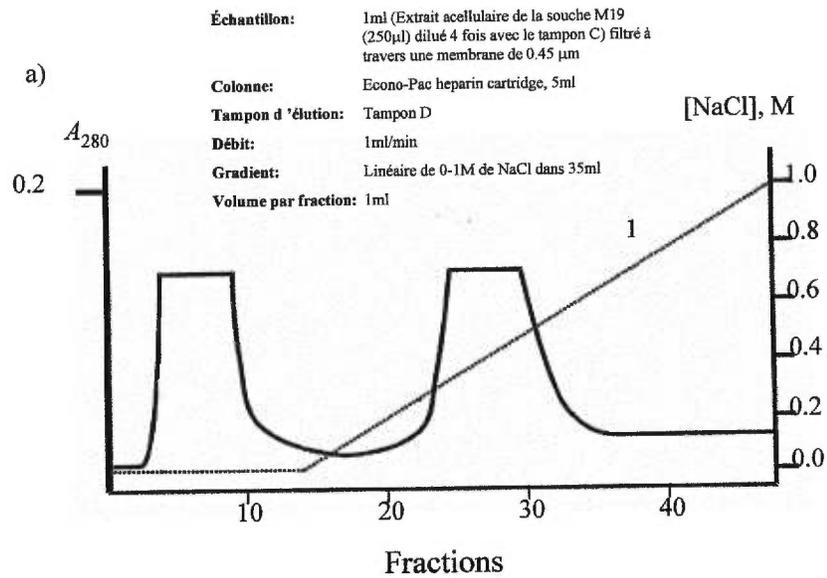


Figure 9. Purification de *LlaMI*: Étape 1. **a)** Profil d'élution de *LlaMI* durant la chromatographie sur la colonne héparine. **1.** Gradient de NaCl. **b)** Analyse de l'activité de *LlaMI* dans les fractions utilisant l'ADN de T7 comme substrat. M. ADN de T7 seul.

permet une meilleure séparation des protéines. Dans nos conditions expérimentales, *LlaMI* n'a pas été absorbé par la colonne héparine, mais a été récolté dans les fractions 4-13 (10 ml). L'activité nucléasique non-spécifique, éluée avec 200-380 mM de NaCl, a été identifiée dans les fractions 22-33 (**Figure 9b**). Les fractions actives (10 ml) ont été combinées et appliquées sur les colonnes Q. Cette fois-ci, le matériel a été efficacement adsorbé par la matrice. Le profil d'éluion de cette étape révèle un second fractionnement de différentes protéines présentes (**Figure 10a**). L'enzyme de restriction a été élué avec 210-250 mM de NaCl et a été retrouvé dans les fractions 13-15 (**Figure 10b**). Cependant, la digestion de l'ADN de T7 par l'enzyme *LlaMI* purifié était à peine détectable. Ceci résulte principalement de la faible concentration d'enzymes dans la solution. Par ailleurs, l'enzyme purifié était si instable que toutes les tentatives de concentration demeuraient vaines. De plus, sa concentration en protéines était si faible qu'il était impossible de visualiser les bandes sur gel SDS-polyacrylamide. Par conséquent, nous n'avons pas poursuivie les études sur cette préparation.

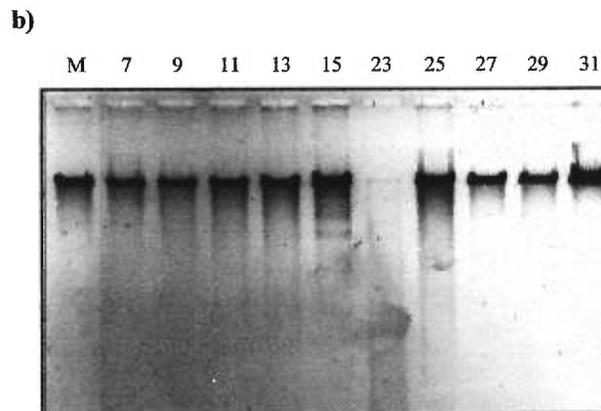
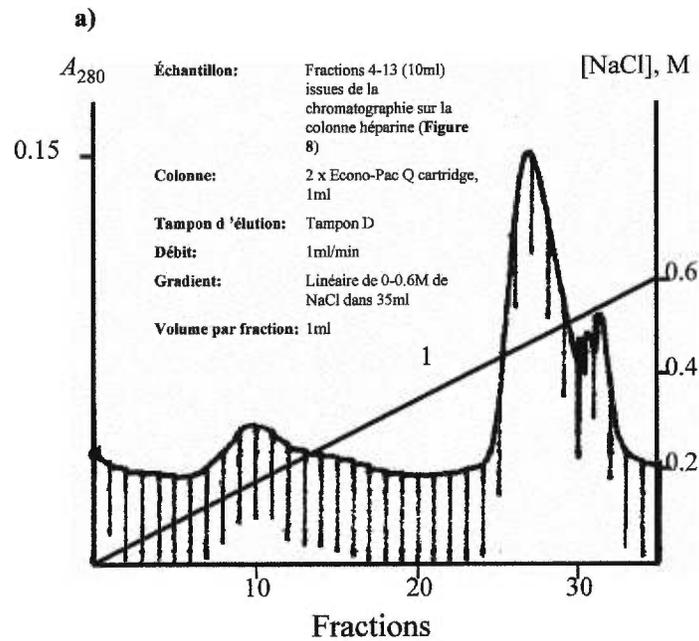


Figure 10. Purification de *LlaMI*: Étape 2. **a)** Profil d'élution de *LlaMI* durant la chromatographie sur deux colonnes Q. **1.** Gradient de NaCl. **b)** Analyse de l'activité de *LlaMI* dans les fractions sur l'ADN de T7. M. T7 seul.

Caractérisation et purification de *LlaHI*

Nous avons ensuite porté notre attention sur l'activité de restriction de *LlaHI* mise en évidence dans la souche H24. À partir des résultats présentés dans la **figure 11**, on pouvait déduire qu'il existe 1, 1, et 4 sites de clivage de *LlaHI* dans l'ADN T7, λ , et Adenovirus-2, respectivement (**Figure 11, puits 2,6,10**). Comme les patrons de digestion de ces substrats étaient identiques pour *LlaHI*, *LlaGI* et *NheI* (**Figure 11, puits 1-12**), nous pouvions alors supposer que ces enzymes reconnaissaient tous la même séquence palindromique 5'-GCTAGC-3'. Rappelons que l'enzyme de restriction *LlaGI* a été isolé antérieurement dans notre laboratoire (**Karska-Wysocki, 1995**) tandis que *NheI* est une endonucléase de restriction vendue commercialement. La masse moléculaire de *LlaHI* se situe entre 30 kDa et 60 kDa (**Figure 12**). D'autre part, l'analyse du profil plasmidique des souches H24 et G2 démontre que la souche H24 possède une dizaine de bandes alors que la souche G2 en a plus d'une quinzaine (**Figure 13**).

Une stratégie relativement simple de chromatographies successives sur la colonne héparine (Bio-Rad, Econo-Pac Heparin cartridge, 5 ml) (similairement au protocole de purification pour *LlaMI*) puis sur deux colonnes Q (Bio-Rad, Econo-Pac Q cartridge, 1 ml) reliées en série a été adoptée pour *LlaHI*. Les protéines totales ont été adsorbées sur la colonne héparine. Par la

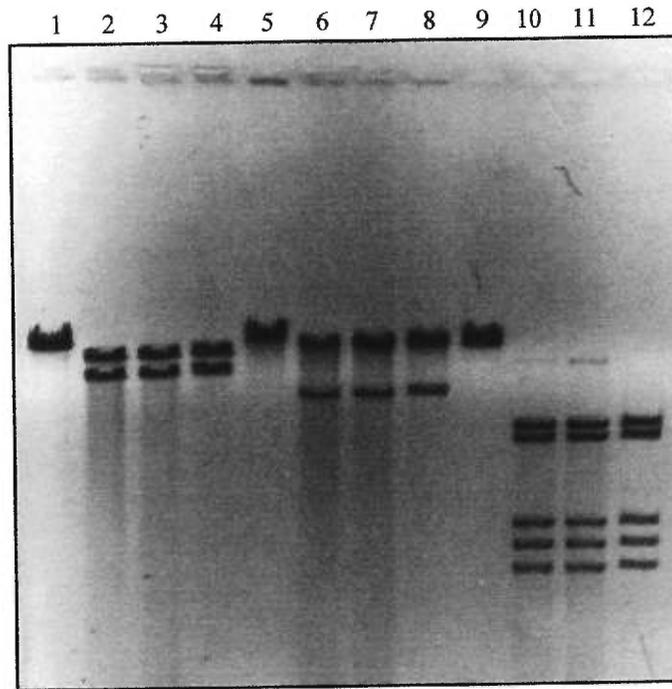


Figure 11. Comparaison des profils de digestion de différents substrats d'ADN par *NheI* (NEB), *LlaHI* (extrait acellulaire) et *LlaGI* (partiellement purifié). Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %. **Puits:** 1, 5, et 9. ADN T7, λ et Adeno-2 respectivement; 2, 6 et 10. ADN T7, λ et Adeno-2 digérés par *LlaHI* respectivement; 3, 7 et 11. ADN T7, λ et Adeno-2 digérés par *LlaGI* respectivement; 4, 8 et 12. ADN T7, λ et Adeno-2 digérés par *NheI* respectivement.

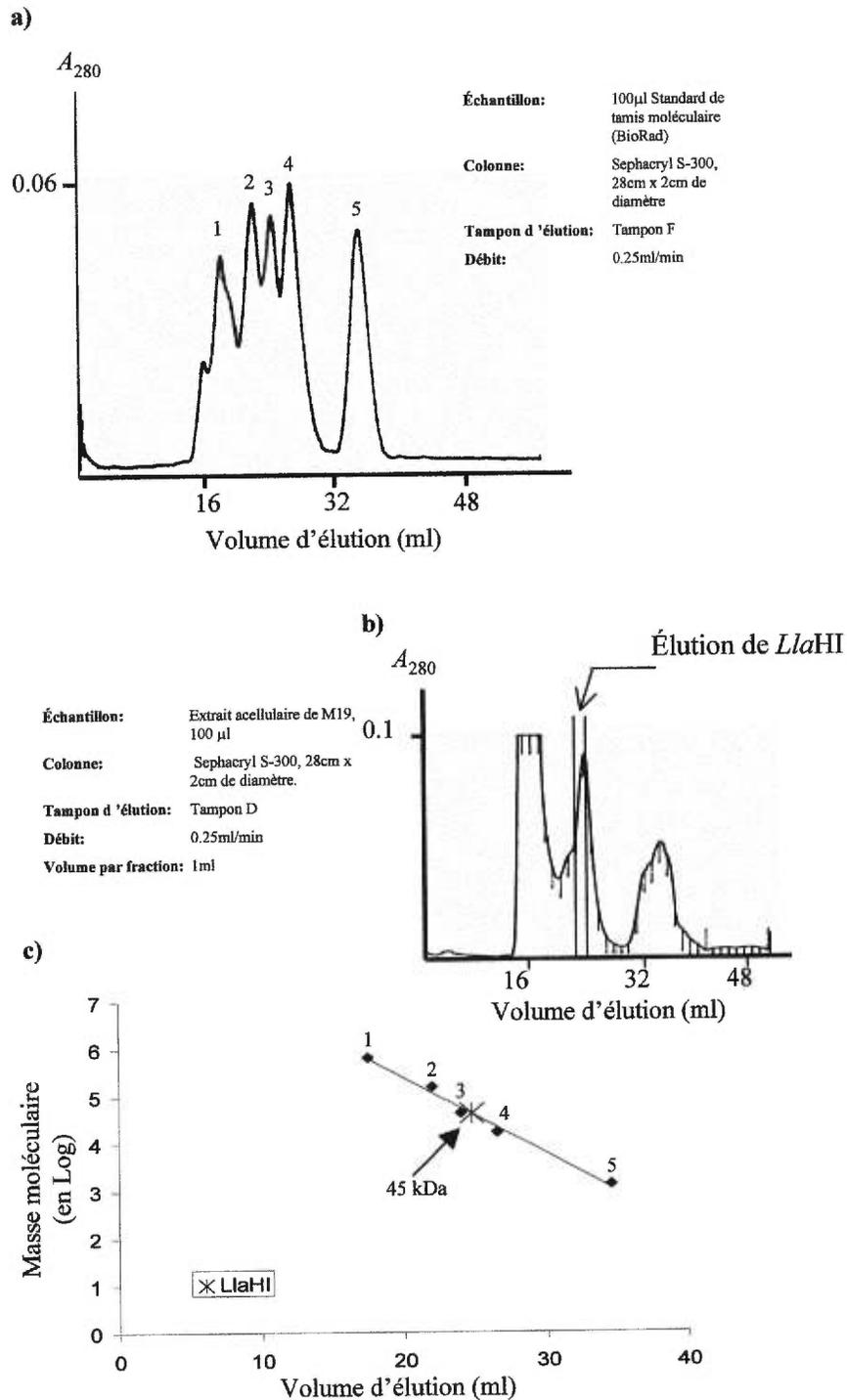


Figure 12. Détermination de la masse moléculaire de *LlaHI* sur gel Séphacryl S-300 HR. **a)** Le profil d'élution des marqueurs de masse moléculaire (Tableau 7a). **b)** Le profil d'élution de l'extrait de la souche H24. **c)** Estimation de la masse moléculaire de *LlaHI*.

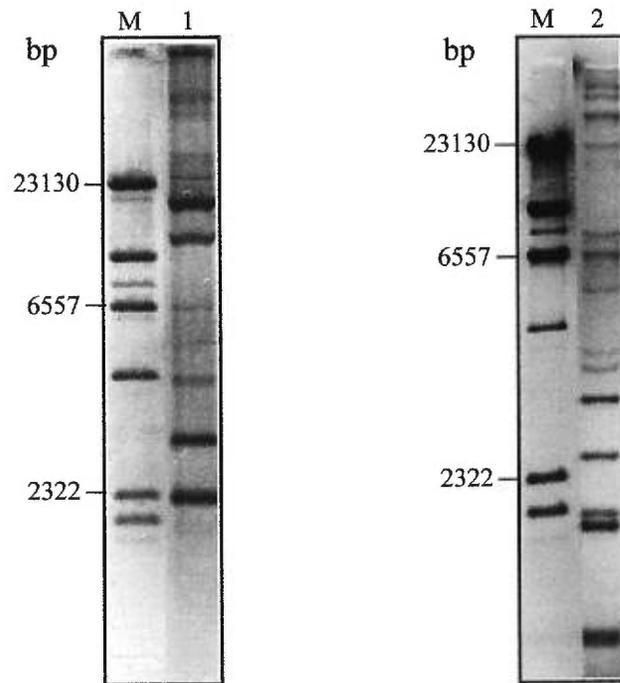


Figure 13. Comparaison des profils plasmidiques de *L. lactis* ssp. *cremoris* G2 et *L. lactis* ssp. *cremoris* H24. Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %. **Puits:** M. ADN λ /HindIII seul; ADN plasmidique de la souche H24 (1) et G2 (2).

suite, l'enzyme a été élué avec un gradient de NaCl (**Figure 14a**). Le profil d'éluion est presque'identique à celui de la **figure 9a**. Cependant, l'enzyme *LlaHI* a été efficacement adsorbé comparativement à *LlaMI*. Il a fallu une concentration de 440-540 mM de NaCl pour éluer l'enzyme. L'activité de restriction a été détectée dans les fractions 36-41 (**Figure 14b**). Ces dernières (6 ml) ont été diluées 10 fois puis appliquées sur les colonnes Q. La **figure 15** montre le profil d'éluion ainsi que l'analyse de l'activité enzymatique de *LlaHI*. L'activité de restriction a été décelée dans les fractions 13-17 correspondant à une éluion avec 220-240 mM de NaCl. *LlaHI*, issu de cette purification, est jugé exempt de nucléase non-spécifique puisqu'une incubation d'une nuit (24 h) a donné des fragments d'ADN nets (**Figure 15c; fractions 13 et 15**) contrairement à l'activité spécifique issue d'une seule étape de chromatographie (**Figure 15c; puit P**). Le profil légèrement altéré dans le puits P de la **figure 15c**, par comparaison avec celui de la **figure 15b**, résulte d'une activité nucléasique non-spécifique. L'enzyme *LlaHI* purifié a été gardé à -20°C , mais son activité a vite été perdue (<2 mois) lorsque conservé sans le glycérol (**résultats non-présentés**).

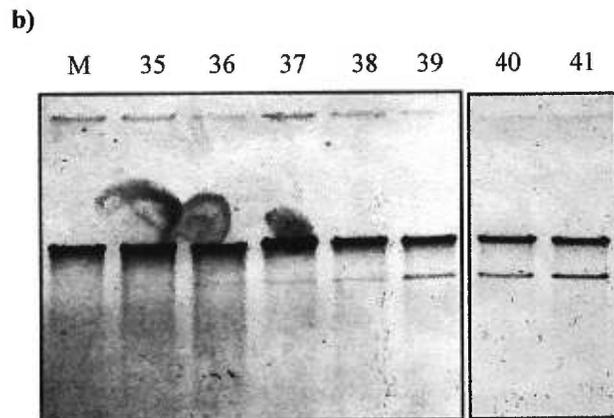
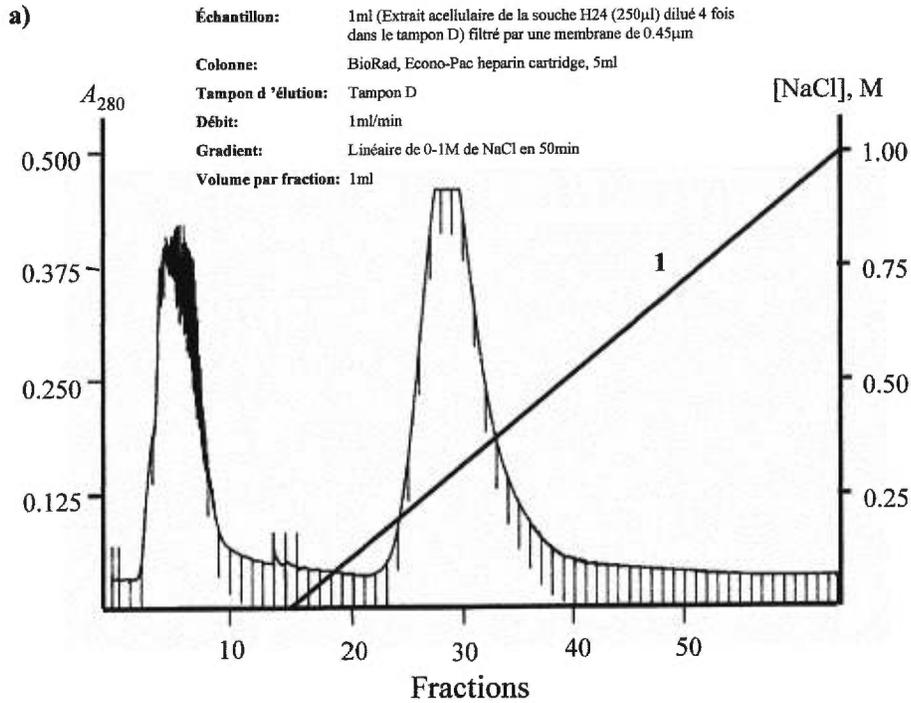


Figure 14. Purification de *Lla*HI: Étape 1. **a)** Profil d'élution de *Lla*HI durant la chromatographie sur la colonne héparine: 1. Gradient de NaCl. **b)** L'analyse de l'activité de restriction de *Lla*HI dans les différentes fractions sur l'ADN λ . **M.** ADN λ seul.

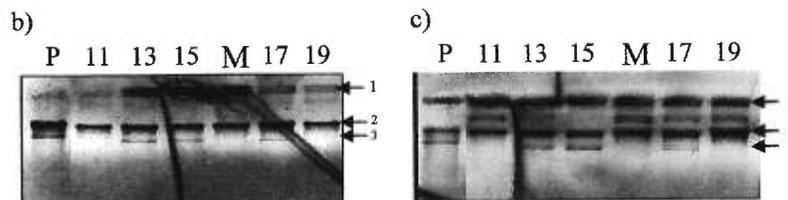
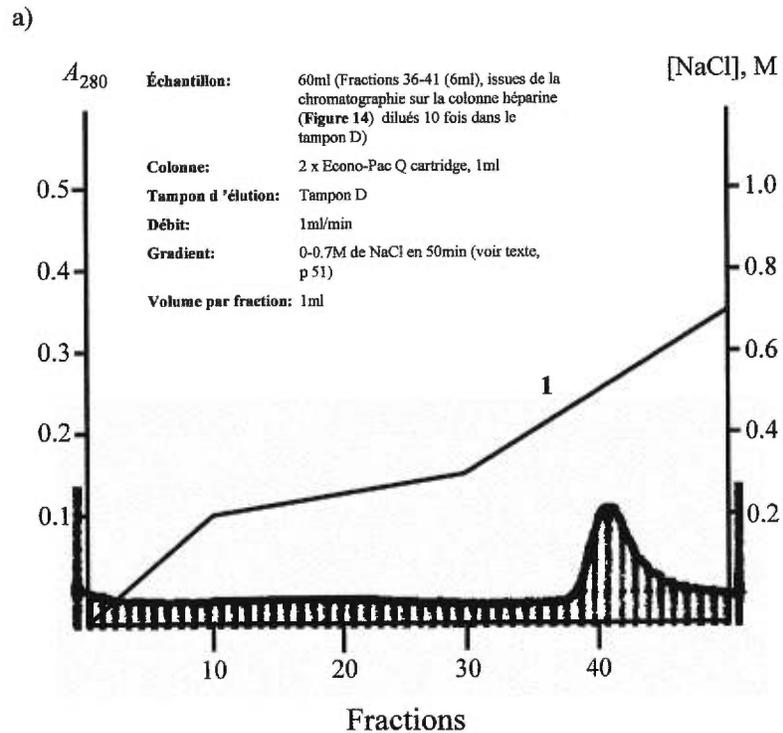


Figure 15. Purification de *Lla*HI: Étape 2. **a)** Profil d'éluion de *Lla*HI durant la chromatographie sur deux colonnes Q : 1) gradient de NaCl. **b)** La digestion de l'ADN λ par l'activité de *Lla*HI dans les fractions pendant 1h. **c)** La digestion de l'ADN λ par l'activité de *Lla*HI dans les fractions pendant toute la nuit. **P**, le mélange des fractions 36 à 41 issues de la purification sur la colonne héparine. **M**. ADN λ seul.

¹ Origine de migration; ² ADN λ ; ³ Fragment résultant de la digestion.

Isolement, caractérisation et purification de *LlaGI*

LlaGI est une endonucléase de restriction type-II classique. Il reconnaît la séquence hexa-palindromique 5'-G/CTAGC-3' et clive à la position indiquée par ``/`` (Karska-Wysocki *et coll.*, 1996). Cette endonucléase représente, à notre connaissance, le premier isoschizomère de *NheI* identifié chez les bactéries lactiques (Karska-Wysocki *et coll.*, 1995).

Dans un premier temps, pour continuer le travail de Barrette (1997), *LlaGI* a été isolé par deux étapes de fractionnement successives. Les protéines ont d'abord été séparées par échangeur d'anions (BioRad, résine Macro-Prep Q) suivant un protocole modifié de Poch *et coll.* (1995). L'enzyme de restriction a été élué avec 270 mM de NaCl. La fraction active (10 ml) a ensuite été appliquée sur la colonne héparine. L'endonucléase a été fixée efficacement sur cette matrice, avec seulement des traces dans l'éluat de lavage de la colonne. L'enzyme *LlaGI* a été élué avec 300-390 mM de NaCl (**Résultats non-présentés**). Les fractions actives combinées (16 ml) ont été concentrées par dialyse contre du polyéthylène glycol 6000 solide (PEG 6000). Un volume final de 500 µl a été récolté. L'analyse de la préparation sur gel SDS-polyacrylamide a révélé une bande majeure dans la région de 44 kDa (**Figure 16**). Cependant la présence d'autres bandes de faible intensité dans ce

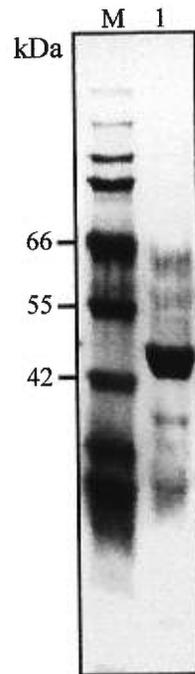


Figure 16. Analyse électrophorétique de *LlaGI* par SDS-PAGE. Électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 10 %. **Puits:** **M.** Marqueurs de poids moléculaire (**tableau 7b**); **1.** *LlaGI* purifié.

gel suggère l'existence de plusieurs protéines différentes dans la préparation obtenue.

Nous avons utilisé la méthode d'ultrafiltration sur les membranes (Microcon-50 et Millipore-100) pour estimer la masse moléculaire de *LlaGI*. L'analyse a démontré la présence d'activité de restriction tant dans la partie retenue par le Microcon-50 que dans la partie filtrée par le Millipore-100 (**Figure 17, puits 1 et 4**). Ces résultats suggèrent que la masse moléculaire de *LlaGI* devrait se situer entre 50 kDa et 100 kDa.

Cette préparation de *LlaGI* que nous avons pré-purifiée a été employée pour étudier les paramètres affectant son activité. Quoique *LlaGI* puisse être actif même à des pH acide, son activité optimale se situe entre un pH de 7.5 et 8.0 (**Figure 18a**). Tout comme les endonucléases de type-II, *LlaGI* requiert la présence d'ions Mg^{2+} (**Figure 18b**). L'activité maximale de restriction a été observée à concentrations de Mg^{2+} entre 5.0 mM et 7.5 mM. Par contre, le chlorure de sodium ou de potassium ne sont pas requis. Cependant, les concentrations de NaCl à 50-300 mM et KCl à 100-300 mM semblent augmenter l'activité endonucléasique (**Figure 18c et d**).

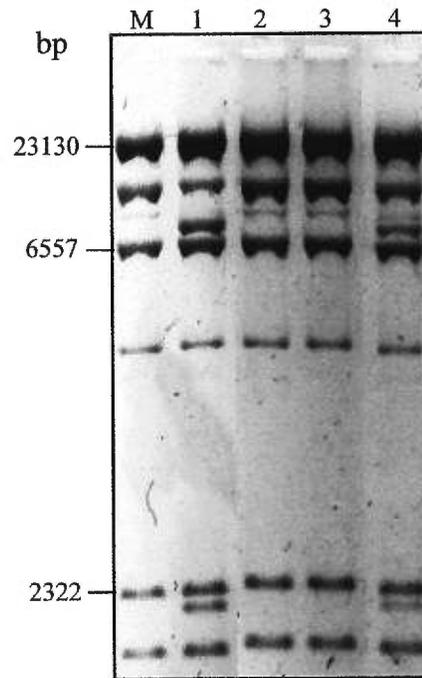


Figure 17. Analyse de l'activité de *LlaGI* sur l'ADN $\lambda/hindIII$. Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %. **Puits :** **1.** Fraction concentrée de microcon-50; **2.** Fraction filtrée de microcon-50; **3.** Fraction concentrée de millipore-100; **4.** Fraction filtrée de millipore-100; **M.** ADN $\lambda/hindIII$ seul.

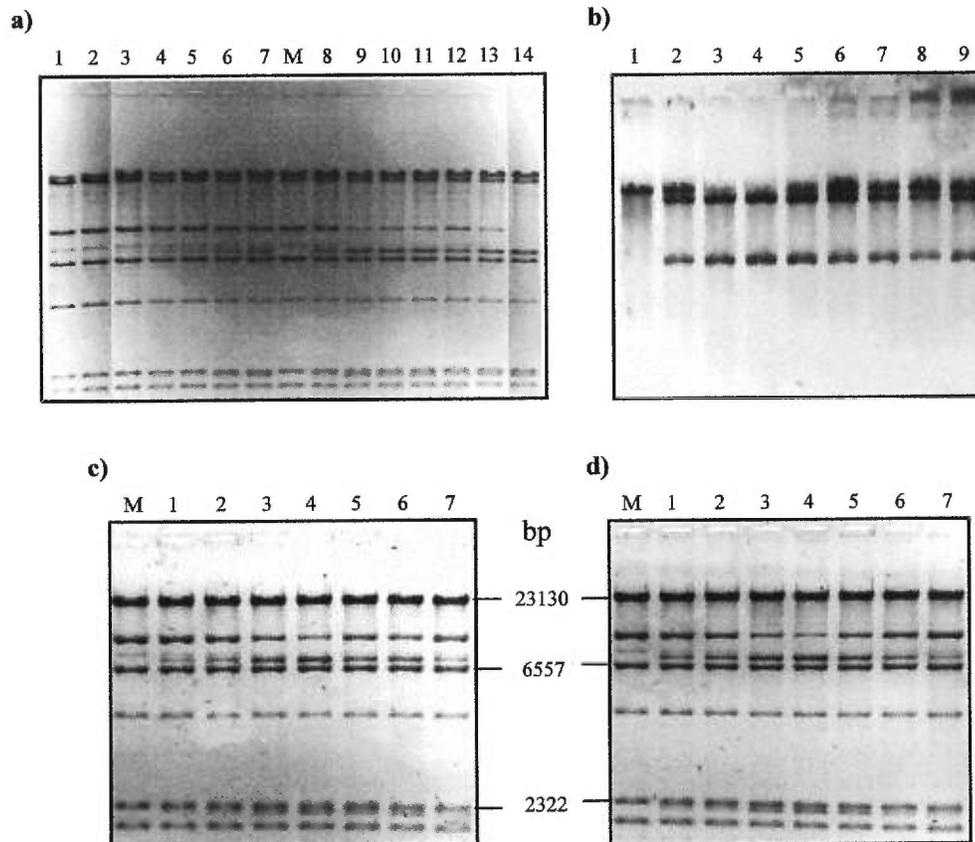


Figure 18. Détermination des conditions de réaction optimale pour l'activité de *LlaGI*.
a) Effet du pH sur l'activité de *LlaG* sur l'ADN λ /*hindIII*. **Puits:** Avec le tampon Citrate (10 mM): 1. pH4.0; 2. pH4.4; 3. pH5.0; 4. pH5.6; 5. pH6.0; Avec le tampon Phosphate (10 mM): 6. pH6.4; 7. pH7.0; Avec le tampon Tris (10 mM): 8. pH7.0; 9. pH7.5; 10. pH8.0; 11. pH8.5; 12. pH9.0; 13. pH9.5; 14. pH10.0; M. ADN λ /*hindIII* seul.
b) Dépendance du Mg^{2+} de *LlaGI* pour l'hydrolyse de l'ADN λ . **Puits:** 1. 0 mM; 2. 2.5 mM; 3. 5.0 mM; 4. 7.5 mM; 5. 10.0 mM; 6. 12.5 mM; 7. 15.0 mM; 8. 17.5 mM; 9. 20.0 mM. Effet de la concentration du NaCl (**c**) et du KCl (**d**) sur l'activité de restriction de *LlaGI* sur l'ADN λ /*hindIII*. **Puits:** 1. 0 mM; 2. 50 mM; 3. 100 mM; 4. 150 mM; 5. 200 mM; 6. 250 mM; 7. 300 mM; M. ADN λ /*hindIII* seul.

D'autre part, un premier protocole de chromatographies successives sur la colonne contenant de la résine Macro-Prep Q (Bio-Rad, 15 ml) et héparine (Amersham Pharmacia Biotech, Hitrap heparin, 5 ml), similaire à celui décrit plus tôt pour l'isolement de *LlaGI*, a été retenue pour purifier *LlaGI*. Le profil d'éluion présenté à la **figure 19a** montre un assez bon fractionnement des protéines dans l'extrait brut. La majorité des protéines ont été efficacement adsorbées par la matrice (**Figure 19a**). L'enzyme site-spécifique, retenu par la colonne Q, a été élué avec une concentration de KCl entre 195-250 mM. Les fractions 39-51 (39 ml) qui contenaient l'enzyme de restriction (**Figure 19b**) ont été chargées sur la colonne héparine. En dépit de la sensibilité de l'absorbance utilisé, le profil d'absorbance ne démontre que de très faibles pics (**Figure 20a**). L'endonucléase, éluée avec 340-450 mM de KCl avait cependant une très forte activité de restriction (**Figure 20b**). Les fractions les plus actives, de 21 à 29 inclusivement (18 ml), ont été réunies puis concentrées d'environ 18 fois par PEG 6000. Le volume final obtenu a été d'environ 700 μ l (470 U). Cette purification rapportait un excès de 800 unités (U) par g de cellules humides (1 U correspondant à la quantité d'enzymes requis pour digérer complètement 1 μ g d'ADN λ /*HindIII* à 37°C pendant 1h dans 50 μ l de tampon G). L'analyse de la préparation finale sur gel SDS-polyacrylamide a révélé une seule bande d'environ 50 kDa (**Figure 21; puit 3**). En fait, ces résultats sont identiques à ceux exposés dans la **figure 16**. Cependant, on peut remarquer que cette chaîne polypeptidique est également présente dans une

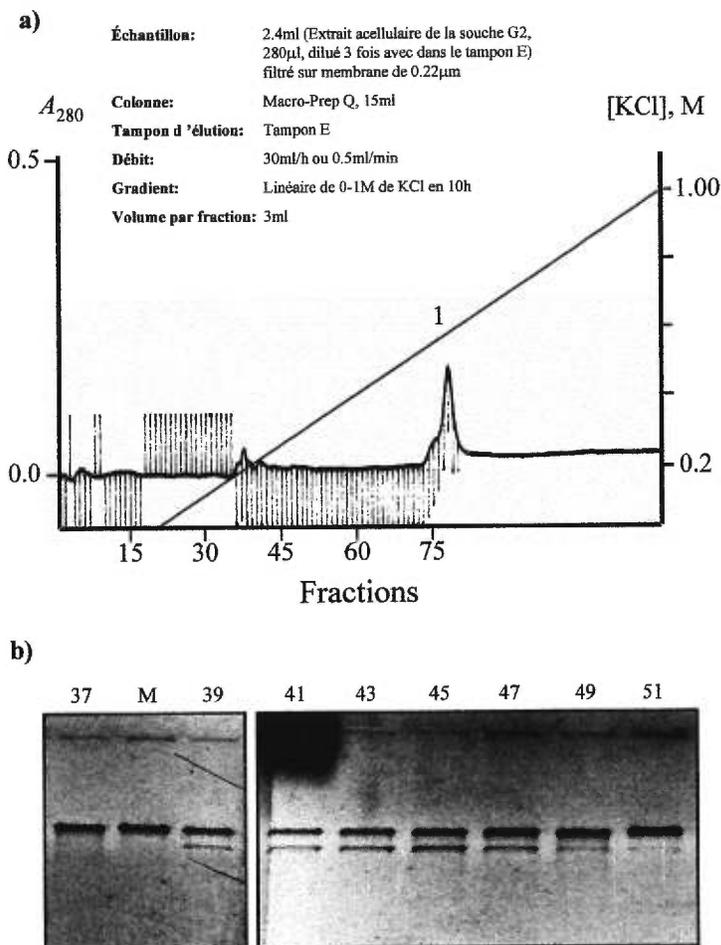


Figure 19. Purification de *LlaGI*: Étape 1. **a)** Profil d'éluion de l'endonuclease durant la chromatographie sur la colonne Macro-Prep Q, 1. Gradient de sel. **b)** Analyse de l'activité de restriction dans les fractions sur l'ADN λ . Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %. **M.** ADN de λ seul.

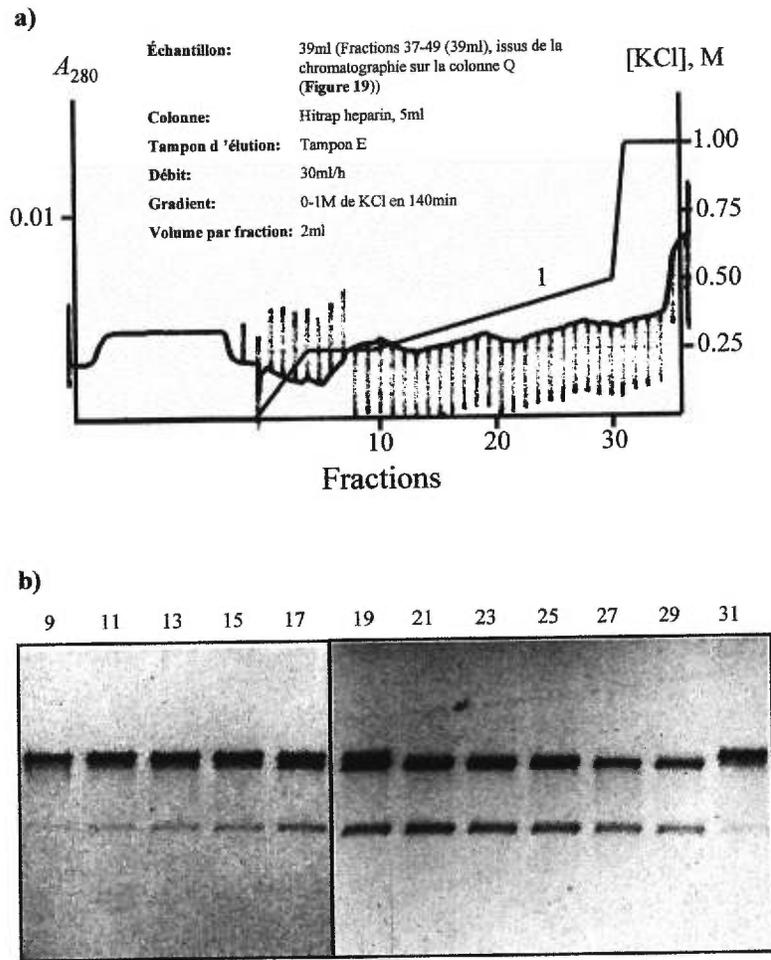


Figure 20. Purification de *LlaGI*: Étape 2. **a)** Profil d'éluion de l'endonucléase durant la chromatographie sur la colonne héparine. **1.** Gradient de sel. **b)** Analyse de l'activité de restriction dans les fractions sur l'ADN λ . Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %.

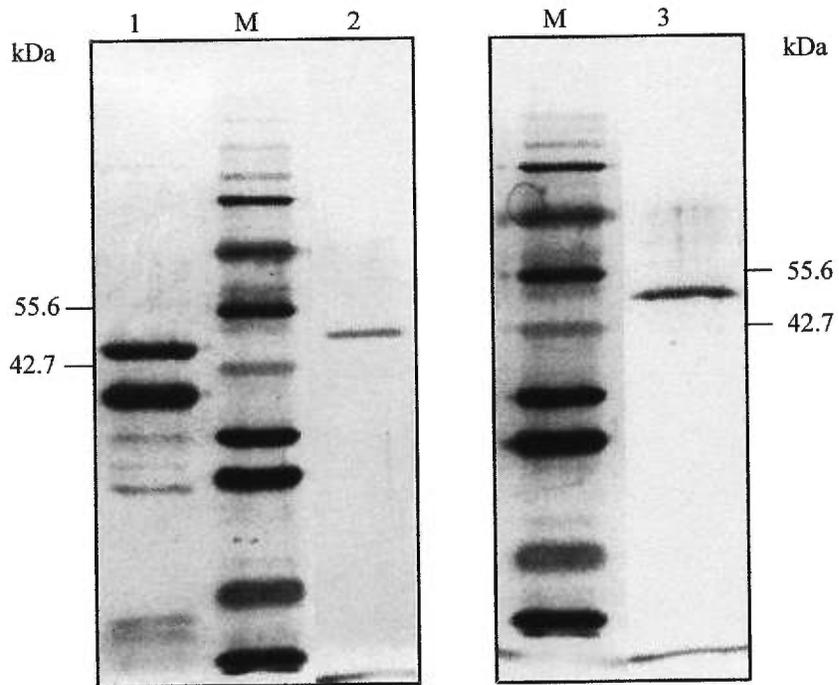


Figure 21. Analyse électrophorétique sur gel SDS-polyacrylamide 10 % des fractions provenant de la purification de *LlaGI*, coloration au nitrate d'argent. **Puits:** 1. Fraction 37 issue de la chromatographie sur la colonne Macro-Prep Q (**figure 19**); 2. Mélange des fractions 21 à 29 issues de la chromatographie sur la colonne héparine (**figure 20**); 3. Mélange des fractions 21 à 29 concentrées; **M.** Marqueur de poids moléculaire (**Tableau 7b**).

fraction non-active (**Figure 21; puit 1**). Le léger désalignement semble avoir été causé par des conditions de migration. De plus, cette bande s'est avérée être beaucoup plus intense que celle retrouvée dans la solution concentrée contenant *LlaGI* (**Figure 21; puit 3**). Ces observations suggèreraient deux choses: (1) la bande en question est un contaminant; *LlaGI* serait une composante mineure de cette bande, (2) la concentration de *LlaGI* obtenue par cette méthode de purification est tellement faible qu'il est impossible de la visualiser même par coloration au nitrate d'argent. En parallèle avec ces analyses de pureté, la masse moléculaire a été évaluée sur colonne Séphacryl S-300 HR. L'activité de *LlaGI* a été détectée à partir de la fraction 27 (**Résultats non-présentés**) alors que le BSA, sur gel polyacrylamide, est apparu dès la 24^e fraction (**Figure 22**). Donc, *LlaGI* a une masse moléculaire légèrement inférieure à 66,4 kDa.

La préparation finale a été analysée pour la présence de nucléases non-spécifiques en incubant un excès d'enzyme (5-10 U) avec 1 µg de substrat d'ADN. Cette méthode d'analyse a été utilisée par NEB pour déceler des traces de nucléases non-spécifiques dans leur préparation. Les résultats préliminaires ont effectivement confirmé la présence d'endonucléases non-spécifiques puisqu'un clivage dans l'ADN Φ x-174 RFI a été observé (**Figure 23a, flèche**). De plus, la digestion de 24 h de l'ADN λ par *LlaGI* montre un profil altéré suggérant alors la présence de nucléases contaminantes (**Figure 23b**).

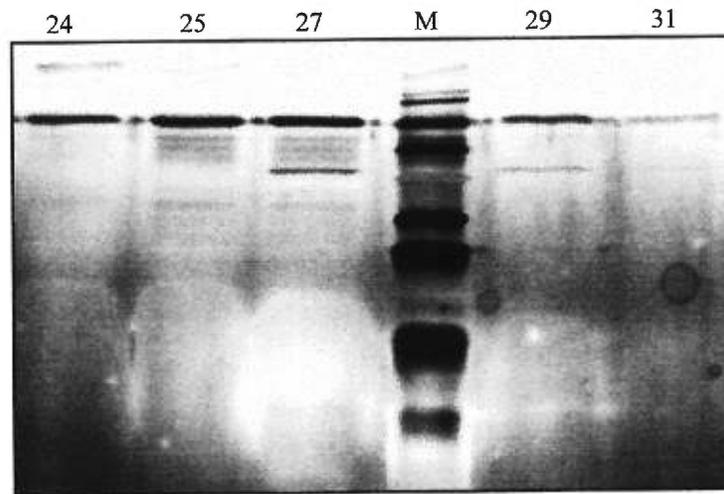


Figure 22. Analyse électrophorétique sur gel SDS-polyacrylamide 10 % des fractions protéiques provenant de la chromatographie sur gel Séphacryl-S300. M. Marqueur de poids moléculaire (**Tableau 7b**).

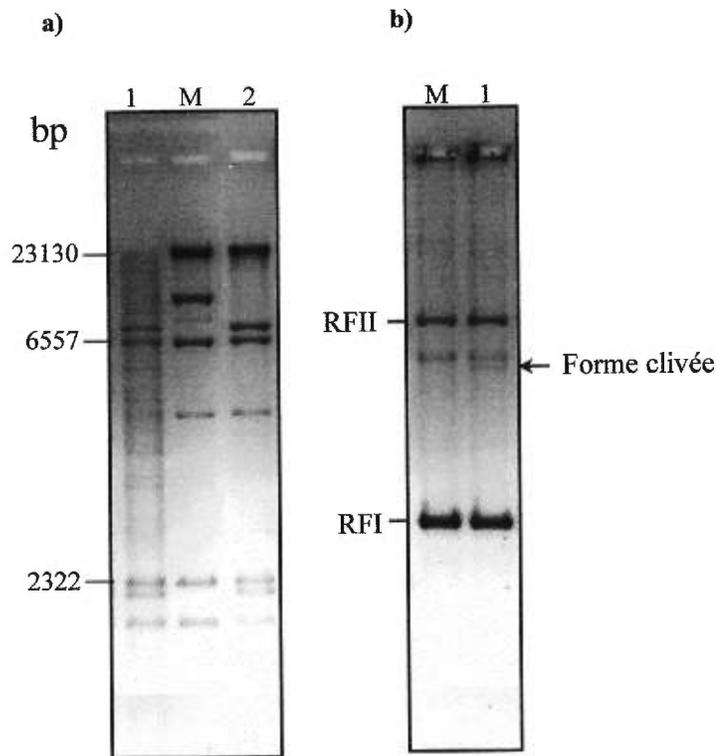


Figure 23. Identification de l'activité nucléasique non-spécifique dans la préparation de *LlaGI* obtenue après deux étapes de chromatographie. **a)** Digestion de l'ADN λ /*hindIII* par un excès de la préparation finale de *LlaGI*. **Puits: 1.** Incubation toute la nuit; **2.** Incubation 1 h; **M.** ADN λ /*hindIII* seul. **b)** Cassure non-spécifique de la forme RFI (superenroulée) de l'ADN ϕ _x-174 par un excès de la préparation finale de *LlaGI*. **Puits: 1.** Incubation pendant 4 h; **M.** ADN ϕ _x-174 RFI seul. La flèche indique la transformation de la forme RFI en forme clivée.

Afin d'obtenir une préparation exempte de toutes nucléases non-spécifiques, nous avons poussé plus loin la purification de *LlaGI* en procédant à trois étapes successives de chromatographie. Cette purification est schématisée dans la **figure 24**. Brièvement, la colonne échangeuse d'anions (Bio-Rad, Colonne contenant de la résine Macro-Prep Q, 21 ml) a été utilisée comme première étape de purification, car elle permet de charger une grande quantité d'extrait acellulaire. Les fractions actives, 12 à 23 (72 ml), éluées avec 180-360 mM, ont été identifiées, combinées et diluées 3 fois pour diminuer la concentration du NaCl. Elles ont été ensuite chargées sur la colonne CHTII (Bio-Rad, Econo-Pac hydroxyapatite, 5 ml). L'enzyme a été élué avec 80-180 mM de phosphate de potassium. Les fractions 8 à 18 (66 ml), qui possédaient l'activité de restriction, ont été réunies et appliquées sur la colonne héparine (Amersham Pharmacia Biotech, Hitrap heparin, 5 ml). L'enzyme site-spécifique a été élué avec 420-480 mM de NaCl (fractions 21 à 25 inclusivement). Ces fractions (30 ml) ont été ensuite combinées et concentrées à l'aide d'un centricon (Amicon, Centricon Plus-20). Le volume de la préparation finale de *LlaGI* est d'environ 230 μ l. La quantité de *LlaGI* produite par cette méthode été mesurée en incubant 1 μ l de différentes dilutions de *LlaGI* purifié avec 0.5 μ g λ /*HindIII* à 37°C, pendant 1 h (**Figure 25**). Selon cette figure, 1 μ l d'une dilution $\frac{1}{4}$ de *LlaGI* était suffisant pour digérer complètement 0.5 μ g de substrat d'ADN (**Figure 25, puits 3**). Par

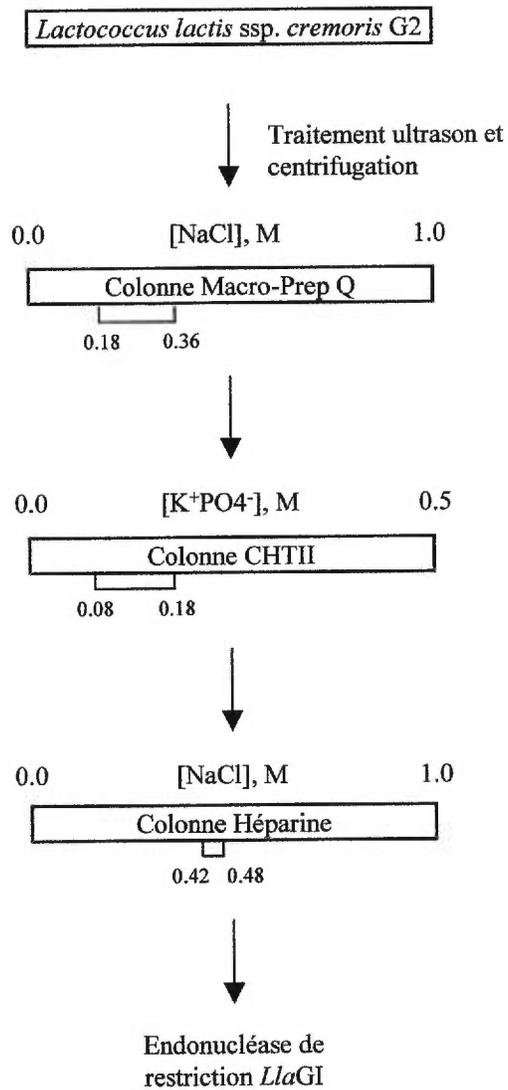


Figure 24. Schéma de purification de *LlaGI* en trois étapes. Les matrices utilisées sont inscrites dans les rectangles. Au dessus des rectangles: le gradient de sel. Au dessous des rectangles: la concentration de sel requise pour éluer l'endonucléase.

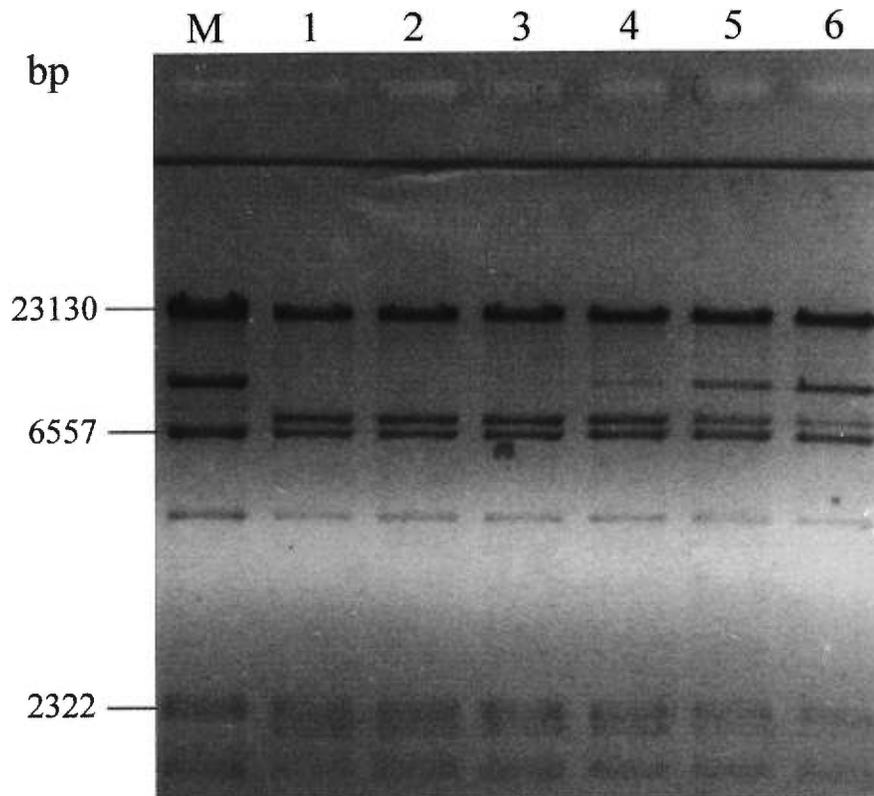


Figure 25. Analyse de l'activité de restriction de *LlaGI* purifié. Électrophorèse sur gel d'agarose 0.4 %. Digestion de 0.5 µg de λ /*HindIII* par différentes dilutions de la préparation de *LlaGI* purifié à 37°C, pendant 1 h, dans 50 µl de tampon G. **Puits 1.** Directe; **2.** Dilution 1/2; **3.** Dilution 1/4; **4.** Dilution 1/8; **5.** Dilution 1/16; **6.** Dilution 1/32.

conséquent, nous estimons que 2 µl de cette même dilution était nécessaire pour digérer 1 µg de $\lambda/HindIII$. De plus, 0.5 µl de la solution *LlaGI* non-diluée est équivalent à 1 U (1 U correspondant à la quantité d'enzymes requise pour complètement digérer 1 µg de $\lambda/HindIII$ à 37°C, pendant 1 h, dans 50 µl de tampon G2). Ces résultats nous ont permis d'évaluer la concentration de *LlaGI*, obtenue par ce protocole de purification à environ 750 U à partir 1 g de cellules humides. Bien que les fragments d'ADN $\lambda/HindIII$ générés par la digestion avec 20 U de *LlaGI* pendant toute la nuit soient quelque peu altérés, le profil demeurait quand même très net (**Figure 26a**). De plus, une conversion de la forme superenroulée à la forme relâchée de l'ADN du phage $\Phi x-174$ suggère la présence d'endonucléases non-spécifiques (**Figure 26b**). En dépit de la forte activité de *LlaGI* purifié, l'analyse sur gel polyacrylamide et coloration au nitrate d'argent ne montrent aucune trace de protéines (**Résultats non-présentés**).

Les résultats de cette purification en trois étapes sont présentés dans le **tableau 8**. Les fractions actives à chaque étape de chromatographie ont été employées pour mesurer l'activité enzymatique. Afin de quantifier l'activité de restriction de *LlaGI*, une unité d'activité (distincte de celle décrite à la page 46) est définie comme étant la quantité d'enzymes requis pour obtenir une digestion visible de l'ADN λ dans 20 µl de tampon G2, en 1 h à 37°C. Le

rendement après trois étapes de chromatographie pour la purification de l'enzyme a été estimé à environ 44 %.

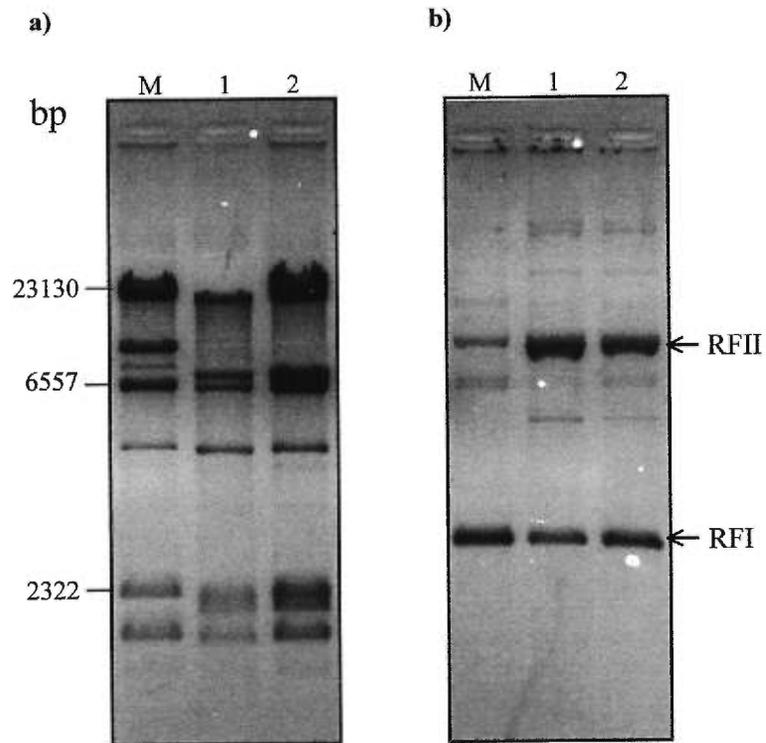


Figure 26. Identification de l'activité nucléasique non-spécifique dans la préparation de *LlaGI* obtenue après trois étapes de chromatographie. **a)** Digestion de λ /hindIII par un excès de *LlaGI* purifié. **Puits:** 1. Incubation toute la nuit; 2. Incubation 1 h; **M.** λ /hindIII seul. **b)** Conversion de la forme superenroulée (RFI) à la forme relâchée (RFII) de l'ADN de ϕ x-174 par un excès de *LlaGI* purifié. **Puits:** 1. Incubation 1 h; 2. Incubation 4 h; **M.** ϕ x-174 RFI seul. Les flèches indiquent la transformation de la forme RFI en RFII.

Étape de purification	Volume totale (ml)	Protéine totale (mg)	Activité totale (Unités ^a)	Activité spécifique (Unités/mg)	Rendement (%)	Purification
Extrait brut	5,30	4,96	271 000	54 700	100,0	1,0
Colonne Q	72,0	3,51	288 000	82 000	106,0	1,5
Colonne CHTII	66,0	1,18	132 000	112 000	48,6	2,0
Colonne Héparine	30,0	< 0,51 ^b	120 000	> 222 000	44,2	4,1

Tableau 8. Rendement et index de purification de *Lla*GI après trois étapes de chromatographie successives.

^a Une unité (distincte de celle décrite à la page 46) est définie comme étant la quantité d'enzymes requise pour obtenir une digestion visible de l'ADN Lambda dans le tampon G2 en 1 h à 37°C.

^b La limite inférieure de protéines pouvant être détectée est d'environ 17 µg/ml.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

La découverte des endonucléases de restriction a ouvert la voie à la conception de nouvelles techniques moléculaires. Ces techniques ont permis des progrès remarquables dans le domaine de la technologie de l'ADN recombinant et dans la compréhension de la structure des gènes. Ces percées ont incité différents groupes de chercheurs à investiguer de nouvelles endonucléases. Bien que maintes endonucléases aient été identifiées (**Roberts et coll., 1998**), une seule endonucléase provenant du genre *Lactococcus*, *ScrFI*, était disponible commercialement. Le présent travail a donc pour but de caractériser les enzymes de restriction chez les lactocoques. Compte tenu de l'importance des endonucléases de restriction, cette caractérisation sera d'une grande utilité pour la communauté scientifique. Lors de notre étude, il a été démontré que deux des huit souches investiguées possédaient une activité spécifique de restriction sur l'ADN du phage λ , laissant penser que le genre *Lactococcus* représenterait une très bonne source de ces enzymes. Les enzymes site-spécifiques découverts, produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* M19 et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H24, ont été désignés *LlaMI* et *LlaHI* respectivement. Malgré le manque d'évidences directes, leurs besoins en ATP suggèrent qu'il s'agit d'endonucléases appartenant aux systèmes de R-M type-II.

Selon nos résultats, *LlaMI* reconnaît la séquence spécifique 5'-CCN₁GG-3' où N représente l'un des quatre nucléotides et serait une isoschizomère ou néoschizomère de *ScrFI*. Cependant, *LlaMI* est bien distinct de son homologue, *ScrFI*. D'abord, en accord avec les données de Fitzgerald *et coll.* (1982), nos résultats ont démontré que l'activité de *ScrFI* était drastiquement inhibée à des concentrations de sel à 1 M, tandis qu'à cette même concentration, l'activité de *LlaMI* était stimulée. D'autre part, l'analyse biochimique basée sur la décarboxylation de l'arginine, effectuée sur les souches M19 et UC503, a confirmé que seulement la souche M19 était capable de transformer cet acide aminé. Les analyses comparatives entre les sous-espèces *cremoris* et *lactis* exécutées par Reddy *et coll.* (1969) ont démontré que les *cremoris*, contrairement aux *lactis*, étaient généralement incapables de transformer l'arginine. Par conséquent, en accord avec Twomey *et coll.* (1993), la souche UC503 est classée dans la sous-espèce des *cremoris* alors que la souche M19 est classée dans celle des *lactis*. Il a été proposé que la pression sélective avait un rôle important à jouer dans la détermination de la spécificité des endonucléases et que plusieurs des isoschizomères semblaient être formés à partir de gènes non-apparentés (Bickle *et coll.*, 1993; Wilson *et coll.*, 1991b). Bien que *ScrFI* et *LlaMI* possèdent la même spécificité, nos résultats suggèrent que ces deux enzymes proviennent d'ancêtres différents et ont évolué indépendamment. Toutefois, les analyses sur tamis moléculaire indique une similarité entre la masse moléculaire de *LlaMI* (entre 30 kDa et

60 kDa) et *ScrFI* (60 kDa). Bien que la chromatographie sur gel de filtration puisse donner un indice sur la taille des protéines, il n'informe pas sur leur composition et séquence en acides aminées.

Après *LlaGI*, identifié chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* G2, l'enzyme site-spécifique, *LlaHI*, a été détecté chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H24. Ce dernier enzyme est le deuxième à reconnaître la séquence hexa-nucléotide 5'-GCTAGC-3' isolée dans notre laboratoire. Ainsi, *LlaHI*, tout comme *LlaGI*, serait soit une isoschizomère, soit une néoschizomère de *NheI*, un enzyme provenant de *Neisseria mucosa heidelbergensis* ATCC 25999 et disponible commercialement. L'étude du profil plasmidique des souches H24 et G2 a démontré que ces dernières ne possèdent pas le même patron et ne sont donc pas identiques. Toutefois, il arrive fréquemment que les endonucléases de restriction soient encodées par les plasmides autotransférables. Si tel était le cas, il ne serait pas impossible que ces deux souches puissent posséder un même plasmide et par conséquent, exprimer le même enzyme. Nyengaard *et coll.* (1995) ont constaté que dans un levain industriel composé de 62 isolats, jusqu'à 19 % des souches pouvaient posséder la même activité de restriction. Ces auteurs ont également démontré que cette activité était en fait encodée par les plasmides. Par ailleurs, les résultats récents sur la protoplastisation suggèrent que *LlaGI* serait effectivement encodé par les

plasmides (**Badoiu-Moisi, 1998**). L'élimination des plasmides par cette méthode entraîne également la perte de l'activité spécifique *in vitro*.

L'endonucléase de restriction *LlaGI* est le premier enzyme de restriction à avoir été isolé dans notre laboratoire (**Karska-Wysocki et coll., 1995**). Il reconnaît la séquence palindromique 5'-GCATGC-3' et clive cette séquence après la première guanine (**Karska-Wysocki et coll., 1995**). Comme toutes les endonucléases de restriction de type-II, *LlaGI* a un besoin absolu d'ions divalents (Mg^{2+}) pour catalyser sa réaction. Similairement à son isoschizomère, *LlaGI* possède une activité optimale à une concentration de Mg^{2+} entre 5 mM et 7.5 mM et à un pH se situant entre 7.5 et 8.0. Contrairement à *NheI*, qui a une activité optimale à 50 mM de sel et est inactivé à des niveaux au delà de 100 mM, l'activité de *LlaGI* est stimulée par les concentrations de sels (NaCl et KCl) >50 mM et n'est diminuée que par les concentrations >200 mM; son activité maximale se situe entre 100mM et 200 mM. De plus, la masse moléculaire de *LlaGI*, évaluée par ultrafiltration et par chromatographie sur tamis moléculaire, a été estimée entre 50 kDa et 66 kDa. Cependant, puisque la masse moléculaire de *NheI* n'a pas été publiée, il nous est impossible d'en faire la comparaison avec l'enzyme *LlaGI*.

Les propriétés chimiques de ces deux endonucléases sont assez semblables, mise à part leur sensibilité aux sels. Ainsi, nous croyons que

l'endonucléase *LlaGI* représente une alternative intéressante à *NheI* pour deux raisons. D'abord, sa plus grande tolérance aux sels, critère important dans le choix d'un enzyme de restriction, puisque cela permettrait d'éviter l'étape de dessalage nécessaire pour la digestion enzymatique lors des purifications. Ensuite, la deuxième raison est plutôt d'ordre sécuritaire. Bien que les différentes espèces du genre *Neisseria* puissent coloniser les muqueuses humaines, elles sont souvent impliquées dans les infections tel les méningites et les maladies transmises sexuellement (**Koneman et coll., 1997**). Ainsi, *N. mucosa* a été identifiée comme cause, bien que peu commune, de méningite, d'infection oculaire, de bactériémie et d'infection rénale chez un patient en phase terminale (**Gini, 1987; Shooter et coll., 1990; Stoka et coll., 1991**). En effet, les infections banales qui ne provoquent normalement aucun symptôme chez un hôte sain pourraient affectées plus sérieusement la personne immunosupprimée. Par opposition, les espèces lactocoques, en plus d'avoir été pendant longtemps considérées comme des bactéries 'alimentaires', font également partie de la flore normale humaine. Soumis à des régulations sévères par les différents organismes de contrôle, la manipulation de ces microorganismes comporte peu de risques pour la santé humaine comparés à d'autres souches. De plus, la croissance des lactocoques est relativement facile et ne requiert aucun nutriment particulier.

Les endonucléases de restriction font partie des enzymes les plus étudiés chez les bactéries. Un grand nombre de recherches ont visé à identifier de nouvelles endonucléases ou des isoschizomères/néoschizomères différents par leur activité, stabilité, etc.. Parmi les milliers d'endonucléases de restriction isolées à ce jour, seulement une petite proportion, soit 4 % (100 endonucléases) a été clonée (**Roberts et coll., 1998**). Par ailleurs, 90 % des endonucléases de restriction vendues commercialement sont obtenues par purification classique (chromatographie d'échange d'ions, d'affinité, d'hydrophobique...). Le nombre d'étapes de chromatographie dépend du degré de pureté exigé dans le produit final. En général, cela peut varier entre 2 et 6 étapes. Les endonucléases *CauI* et *CauII*, qui provenaient de *Chloroflexus aurantiacus*, *Eco29KI* d'*Escherichia coli* K802, et *PspGI* de *Pyrococcus*, ont nécessité plus de 5 étapes de chromatographie pour éliminer toutes les nucléases non-spécifiques (**Bingham et coll., 1982; Morgan et coll., 1998; Pertzév et coll., 1997**). De leur côté, la purification partielle de *LlaAI* et celle de *LlaBI* de *Lactococcus lactis* n'ont requis que deux étapes (**Nyengaard et coll., 1993**). D'autres endonucléases, *BloI* et *BloII*, n'étaient que partiellement purifiées après deux étapes (**Hartke et coll., 1996**). La chromatographie liquide à basse pression à l'aide du « Econo System » (BioRad) a été employée dans l'élaboration de notre modèle de purification pour des endonucléases de restriction isolées chez *Lactococcus*. Toutes les endonucléases que nous avons étudiées possédaient une affinité pour les supports échangeurs d'anions. Un

premier protocole en deux étapes de chromatographie par affinité (héparine) puis par échange d'anions a été employé pour purifier *LlaMI* et *LlaHI*. N'ayant pas atteint les conditions optimales, nous avons observé une importante perte à chaque étape, se traduisant par une préparation finale diluée. Cette dilution a rendu la préservation de l'activité très difficile. De plus, nous avons remarqué que la quantité de protéines pouvant être adsorbées par la matrice (utilisée comme première étape de chromatographie) limite grandement la quantité du produit éventuel obtenu. De cette observation, deux modèles de purification utilisant la colonne Q comme première étape de purification ont été réalisés avec *LlaGI*. Cette stratégie offre deux avantages : 1) vu la possibilité de créer différentes grandeurs de colonne Q à l'aide de la résine Macro-Prep Q, une colonne avec capacité d'adsorbance supérieure est possible; 2) puisque la force ionique requise pour éluer *LlaGI* est nettement inférieure à celle requise pour l'éluer de la colonne héparine, le passage d'une étape de purification à une autre en sera facilité.

D'abord, la chromatographie en deux étapes successives sur les colonnes Q (15 ml) ensuite Héparine (5 ml) semblait être efficace pour isoler l'endonucléase *LlaGI* tout en préservant son activité biologique. En fait, les analyses protéiques sur gel SDS-polyacrylamide ont révélé que la majorité des protéines ont été éliminées et n'ont laissé qu'une seule bande. Toutefois, les expériences subséquentes ont indiqué que les nucléases contaminantes étaient

encore présentes dans la préparation finale. Ensuite, afin d'accroître l'homogénéité de *LlaGI*, un deuxième protocole de purification a été proposé. L'extrait acellulaire de la souche G2 a été chromatographié successivement sur les colonnes Q, hydroxyapatite et héparine. L'analyse de l'activité biologique a révélé que la préparation finale, 230 μl , contenait au moins 450 U. De plus, La concentration de protéines dans cette solution est estimée à approximativement 17 $\mu\text{g/ml}$. Bien que la concentration de *LlaGI* est plus élevée dans cette préparation (2 U/ μl) que celle obtenue par deux étapes de chromatographie (0.7 U/ μl , p.87), l'analyse sur gel SDS-polyacrylamide n'a montré aucune bande et ce, même avec une coloration au nitrate d'argent. Ce résultat affirme que la chaîne polypeptidique présentée à la **figure 21 (puits 3)** ne correspondait pas à la sous-unité protéique de *LlaGI*. Il est probable que la concentration de protéines analysées sur gel polyacrylamide ait été trop faible pour être détectée, ou que la méthode de coloration au nitrate d'argent employée ne soit pas spécifique aux protéines recherchées. En effet, les expériences ont démontré qu'il faut souvent recourir à des méthodes de coloration différentes pour visualiser toutes les bandes protéiques sur un gel (**Friedman, 1982**). D'après nos résultats, *LlaGI* possède une activité spécifique évaluée à plus de 110 000 U par mg de protéine.

Puisque la perte de l'activité totale est liée au nombre d'étapes exigées pour la purification, un compromis est nécessaire. Avec ce modèle de

purification en trois étapes, nous avons enregistré une perte d'environ 56 % pour l'enzyme purifié. Le prélèvement exclusif des fractions ayant la plus grande activité dans les différentes étapes de purification contribue en grande partie à cette perte. De plus, la rétention et l'élution des protéines dans les différents supports de chromatographie dépendent grandement de leur structure tertiaire. Ces étapes successives peuvent donc causer la perte de l'activité biologique. Il a été démontré que la perte d'activité enzymatique, lors de la chromatographie par échange d'ions, peut atteindre jusqu'à 10 % (**Deutscher, 1990**). Par ailleurs, bien que l'activité protéolytique soit à son maximum dans l'extrait brut, les traces de protéases dans les solutions partiellement purifiées peuvent affecter la protéine d'intérêt si présentes en grande proportion. Malheureusement, le spectre étroit des inhibiteurs de protéases à sérine tel le PMSF (phénylméthylsulfonylfluoride) restreint leur efficacité et donc une combinaison des différents inhibiteurs aurait été nécessaire pour une meilleure préservation de l'activité biologique de la protéine. Nous avons également remarqué que le temps requis pour compléter la purification était un facteur très important. En effet, une purification antérieure de *LlaGI* par chromatographie successive sur les colonnes Q, CHTII et héparine ayant duré ≥ 4 jours, a donné une préparation d'enzyme purifié (300 μ l) dont l'activité était estimée à environ seulement 75 U (**Résultats non-présentés**). Par contre, la quantité d'enzyme obtenue suite à une purification de ≤ 3 jours est d'environ

450 U (**Protocole de purification à trois étapes décrit dans la section Matériels et Méthodes**). En conclusion, nous croyons sincèrement que les pertes encourues dans notre protocole de purification étaient surtout dues à la sélection exclusive des fractions les plus actives et au temps requis pour la purification.

Les analyses pour la recherche de nucléases non-spécifiques dans la préparation de *LlaGI* purifié ont démontré une légère altération du patron de digestion suite à l'incubation prolongée avec un excès d'endonucléases. La conversion élevée de la forme RFI à la forme RFII de l'ADN du phage Φ x-174 a également été observée. En principe, ces résultats suggèrent la présence de nucléases contaminantes, toutefois l'examen détaillé du gel d'agarose présenté à la **figure 26a (puits 1)**, révèle l'existence d'une multitude de bandes intermédiaires de très faible intensité. Ce phénomène est mieux représenté à la **figure 23a (puits 1)**. Ce profil oriente plutôt vers une activité dite 'star'. Cette dernière a surtout été observée lorsque les conditions ``extrêmes`` de digestion sont utilisées. Dans ces cas, l'endonucléase de restriction est capable de cliver les séquences similaires aux séquences palindromiques reconnues (**NEB**). La restriction de séquences différenciées par un seul nucléotide dans la séquence de reconnaissance et les cassures dans l'ADN simple brin sont des propriétés de l'activité 'star' (**Barany, 1988**). Nasri *et coll.* (**1986**) ont suggéré que cette activité représentait une caractéristique générale des endonucléases de

restriction. En effet, l'activité 'star' a été démontrée chez *Bam*HI (George *et coll.*, 1980), *Eco*RI (Polisky *et coll.*, 1975), *Hind*III (Nasri *et coll.*, 1986), *Sa*II (Malyguine *et coll.*, 1980), *Pvu*II (Nasri *et coll.*, 1987), etc.. En fonction de chaque endonucléase, la concentration de glycérol (>5 %), le rapport enzyme/substrat (>100 unités/ μ g), la force ionique (<25 mM), le pH (>8), la présence de solvant organique et la substitution du Mg^{2+} par d'autres ions divalents peuvent tous contribuer au clivage moins spécifique des endonucléases (NEB). Dans les études effectuées avec *Lla*GI, les conditions ``standard`` ont été réalisées à l'exception du pH, avec une faible concentration de glycérol (<4 %), une forte force ionique (100 mM), des ions Mg^{2+} comme cofacteur, un faible rapport enzyme/substrat et l'absence de solvant organique. Par conséquent, l'activité 'star' de *Lla*GI serait expliquée par le pH élevé.

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans l'économie mondiale. Elles sont utilisées notamment dans la bio-conservation et la transformation des aliments. Les principales propriétés recherchées par l'industrie laitière comprennent le métabolisme des glucides et des citrates, l'activité protéolytique, la résistance aux bactériophages, la production d'antimicrobiens et le temps de génération (Coffey *et coll.*, 1994; Bigret, 1994; Champagne, 1998). La production d'acide à partir de la fermentation du glucose et du lactose et la croissance relativement rapide sont des qualités associées à *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* M19. La croissance de cette souche

dans le milieu lait litmus entraîne une coagulation des protéines présentes (la caséine) par l'action de l'acidité issue de la fermentation du lactose (**Résultats non-présentés**). De plus, cette croissance est stimulée quand le milieu M17, contenant du lactose, est supplémenté avec du glucose. Ceci signifie que ce sucre est également fermenté par la souche M19. De plus, bien que notre laboratoire n'ait pu confirmer la résistance de *L. lactis* ssp. *lactis* M19 aux bactériophages, la présence d'endonucléases soulève cette possibilité. Twomey *et coll.* (1997) ont, quant à eux, démontré que le système R-M *ScrFI*, produit par *L. lactis* ssp. *cremoris* UC503, était capable de limiter la propagation des phages c2. Par conséquent, nous spéculons que *LlaMI*, qui a la même spécificité que *ScrFI*, pourrait également protéger la cellule hôte. Malgré le manque de mesure quantitative sur l'expression de *LlaMI* chez la souche M19, nous croyons que la spécificité de l'activité de restriction devrait primer sur le taux d'expression de l'endonucléase. En effet, la sensibilité des phages aux systèmes R-M est directement proportionnelle au nombre de sites de restriction dans leur génome. Plusieurs auteurs ont indiqué que les phages masquaient les sites de restriction, par substitution ou délétion, pour contourner les systèmes R/M des bactéries (Coveney *et coll.*, 1987; Jarvis *et coll.*, 1986; Moineau *et coll.*, 1992). Les rapports sur l'analyse du génome des phages démontrent une réorganisation génétique favorisant la perte du site de restriction enzymatique (Kruger *et coll.*, 1983; Sharpe, 1986). Moineau *et coll.* (1993) ont également démontré que les nouvelles espèces de phages (P335) sont plus sensibles aux

systemes R/M que les phages (936 et c2) classiques. Ils ont également rapporté que les sites de restriction étaient plus nombreux chez les espèces P335. Similairement, les souches *L. lactis* ssp. *cremoris* G2 et H24 représentent de bons candidats pour l'industrie laitière. D'abord, la production d'endonucléases de restriction par ces deux souches indique la présence d'un mécanisme de défense contre les phages. Ensuite, les plasmides présents dans ces deux souches peuvent conférer des propriétés intéressantes aux cellules hôtes. Les évidences ont suggéré que les plasmides médient notamment le métabolisme des glucides, l'activité protéinase et la production de bactériocines (Coakley *et coll.*, 1997; Kok, 1991; M^cKay *et coll.*, 1983). De plus, parce que les plasmides régulent plusieurs activités biochimiques, leur stabilité au sein de la cellule est essentielle. À ce sujet, il a été remarqué que les plasmides portés par la souche G2 étaient relativement stables puisque les repiquages successifs sur un milieu non-tamponné n'avaient aucun effet sur la perte de ceux-ci (Badoiu-Moisi, 1998). Ces observations suggèrent que ces plasmides sont fortement liés à la cellule hôte. Il est important de noter qu'en dépit des études directes sur la résistance aux phages *in vivo*, l'expression de *LlaGI* et *LlaHI* aurait probablement une implication pratique dans la défense contre les phages des lactocoques. Par conséquent, l'exploitation des levains composés principalement des souches M19, H24 et G2 peut constituer un moyen efficace, à court terme, pour lutter contre les bactériophages.

Enfin, la localisation suivie par le clonage des gènes qui encodent les enzymes *LlaMI*, *LlaHI* et *LlaGI* dans une souche industrielle constitueraient une stratégie alternative intéressante pour améliorer les isolats qui composent le levain. Bien que les systèmes R/M sont des mécanismes de défense puissants et efficaces contre les phages, ils sont toutefois incapables de prodiguer une protection prolongée. Puisque les méthylases et les endonucléases sont co-exprimées, les rares particules phagiques qui auront échappé à la restriction des endonucléases seront modifiées et deviendront alors résistantes au système R-M (Hill, 1993). Dans la nature, il n'est pas rare de retrouver plus d'un mécanisme de résistance, encodé par différents plasmides, chez une même souche de lactocoque (Hill *et coll.*, 1991; Dinsmore *et coll.*, 1995). Les évidences ont démontré que l'accumulation des mécanismes de défense se traduit inmanquablement par une augmentation de la résistance (Durmaz *et coll.*, 1995; Josephsen *et coll.*, 1990). Un exemple classique de résistance aux phages a été mis en évidence chez la souche industrielle *L. lactis* ssp. *lactis* ME2. Cette souche possède au total 13 plasmides (Sander *et coll.*, 1983) encodant un système d'inhibition de l'adsorption, deux systèmes d'infection abortive et deux systèmes R/M (Durmaz *et coll.*, 1992; Higgins *et coll.*, 1988; Hill *et coll.*, 1989a et 1989b). La combinaison des différents mécanismes de défense permettrait donc la création d'une 'super' souche pouvant résister à presque tous les bactériophages rencontrés dans l'industrie.

CONCLUSION

Les travaux réalisés au cours de cette étude ont permis d'identifier deux endonucléases de restriction, désignés *LlaMI* et *LlaHI*. Ces dernières sont produites respectivement par *L. lactis* ssp. *lactis* M19 et *L. lactis* ssp. *cremoris* H24. La purification partielle de ces deux enzymes ainsi que d'un troisième (*LlaGI*), identifié antérieurement dans notre laboratoire, a été effectuée par chromatographie liquide à basse pression. Bien que des protocoles de purification indépendants aient été utilisés, celui ayant servi pour *LlaGI* semble apte à produire des préparations exemptes de nucléases non-spécifiques. De plus, cette stratégie permettra la purification des autres enzymes de restriction détectés chez les lactocoques. Par ailleurs, la présence d'enzymes de restriction est un critère important dans la sélection des souches de lactocoques destinées à la transformation du lait. Enfin, les souches M19, H24 et G2 peuvent être utilisées, en association, dans le levain afin de minimiser les pertes dues aux bactériophages.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Adams GM, Blumenthal RM (1995) Gene *pvuIIW* : a possible modulator of *PvuII* endonuclease subunit association.
Gene **157**:193-199
- Aggarwal AK (1995) Structure and function of restriction endonucleases.
Curr Opin Struct Biol **5** :11-19.
- Aggarwal AK, Wah DA (1998) Novel site-specific DNA endonucleases.
Curr Opin Struct Biol **8**:19-25.
- Agriculture CANADA. <http://www.dairyinfo.agr.ca>.
- Aguirre M, Collins MD (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection.
J Appl Bacteriol **75**:95-107.
- Alves J, Ruter T, Geiger R, Fliess A, Maass G, Pingoud A (1989) Changing the hydrogen-bonding potential in the DNA binding site of *EcoRI* by site-directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, the preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site -GAATTC-.
Biochemistry **28**:2678-2684.
- Anderson JE (1993) Restriction endonucleases and modification methylases.
Curr Opin Struct Biol **3** :24-30.
- Arber W (1979) Promotion and limitation of genetic exchange.
Science **205**:361-365.
- Badoiu-Moisi D (1998) Élimination des plasmides et isolement de colonies LAC⁻ de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.
Rapport de stage non publié.
Directeur : Dr Szatmari G, Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal.
- Barany F (1988) The *TaqI* 'star' reaction: strand preferences reveal hydrogen-bond donor and acceptor sites in canonical sequence recognition.
Gene **65**:149-165.
- Barany F, Danzitz M, Zebala J, Mayer A (1992) Cloning and sequencing of genes encoding the *TthHB8I* restriction and modification enzymes: comparison with the isoschizomeric *TaqI* enzymes.
Gene **112**:3-12.
- Barrette B (1997) Caractérisation et purification de *LlaGI* chez *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* G2.
Rapport de stage non publié.
Directrice : Dr Mamet-Bratley, Département de Biochimie, Université de Montréal.

- Bertani G, Weigle JJ (1953) Host controlled variation in bacterial viruses.
J. Bacteriol. **65** :113-121.
- Bickle TA, Krüger DH (1993) Biology of DNA restriction.
Microbiol Rev **57** :434-450.
- Bigret M (1994) Lactic acid bacteria and organoleptic properties of foods.
Actes du colloque LACTIC 94, Les bactéries lactiques/lactic acid bacteria. Edn. Adria Normandie. Presses universitaires de Caen. pp25-27.
- Bingham AH, Darbyshire J (1982) Isolation of two restriction endonucleases from *Chloroflexus aurantiacus* (*CauI*, *CauII*).
Gene **18**:87-91.
- Bougueleret L, Schwarzstein M, Tsugita A, Zabeau M (1984) Characterization of the genes coding for the *EcoRV* restriction and modification system of *Escherichia coli*.
Nucleic Acids Res **12**:3659-3676.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem **72**:248-254.
- Brooks JE, Nathan PD, Landry D, Sznyter LA, Waite-Rees P, Ives CL, Moran LS, Slatko BE, Benner JS (1991) Characterization of the cloned *BamHI* restriction-modification system: Its nucleotide sequence, properties of the methylases and expression in the heterologous hosts.
Nucleic Acids Res **19**:841-850.
- Champagne CP (1998) Production de ferment lactique dans l'industrie laitière. Edn. La fondation des gouverneurs et Edisem. Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Chandrasegaran S, Smith H.O. (1988) Amino acid sequence homologies among twenty-four restriction endonucleases and methylases. From proteins to ribosomes. Edited by Sarma R.H. and Sarma M.H., Structure and expression. Adenine Press inc., New-York. pp149-156.
- Cheng X, Balendiran K, Schildkraut I, Anderson JE (1994) Structure of *PvuII* endonuclease with cognate DNA.
EMBO J **13**:3927-3935.
- Cheng X (1995) Structure and function of DNA methyltransferases.
Annu Rev Biophys Biomol Struct **24** :293-318.
- Clyman J, Belfort M (1992) Trans and cis requirements for intron mobility in a prokaryotic system.
Genes Dev **6**:1269-1279.
- Cluzel PJ, Chopin A, Ehrlich DS, Chopin MC (1991) Phage abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, expression of which is mediated by an ISO-ISSI element.
Appl Environ Microbiol **57**:3547-3551.

- Coakley M, Fitzgerald G, Ros RP (1997) Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures.
Appl Environ Microbiol **63**:1434-1440.
- Coffey A, Daly C (1994) Lactic acid bacteria in the biopreservation of foods. Actes du colloque LACTIC 94, Les bactéries lactiques/lactic acid bacteria. Edn. Adria Normandie. Presses universitaires de Caen. pp17-24.
- Coveney FA, Fitzgerald GF, Daly C (1987) Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology, restriction mapping, DNA homology, and structural protein analysis.
Appl Environ Microbiol **53**:1439-1447.
- Daly C, Fitzgerald GF, Davis R (1996) Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance.
Antonie Van Leeuwenhoek **70**:99-110.
- Davis R, van der Lelie D, Mercenier A, Daly C, Fitzgerald GF (1993) *ScrFI* restriction-modification system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC503: cloning and characterization of two *ScrFI* methylase genes.
Appl Environ Microbiol **59**:777-785.
- de Vos WM, Underwood HM, Davies FL (1984) Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11.
FEMS Microbiol Lett **23**:175-178.
- Deutscher MP (1990) Guide to protein purification.
Methods in Enzymology (Academic press inc) **182**:403-409.
- Dinsmore PK, Klaenhammer TR (1995) Bacteriophage resistance in *Lactococcus*.
Mol Biotechnol **4**:297-314.
- Dreier J, Bickle TA (1996) ATPase activity of the type IC restriction-modification system *EcoR124II*.
J Mol Biol **257**:960-969.
- Dryden DT, Cooper LP, Thorpe PH, Byron O (1997) The in vitro assembly of the *EcoKI* type I DNA restriction/modification enzyme and its in vivo implications.
Biochemistry **36**:1065-1076.
- Durmaz E, Higgins DL, Klaenhammer TR (1992) Molecular characteristics of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ME2.
J Bacteriol **174**:7463-7469.
- Durmaz E, Klaenhammer TR (1995) A starter culture rotation strategy incorporating paired restriction-modification and abortive infection bacteriophage defenses in a single *Lactococcus lactis* strain.
Appl Environ Microbiol **61**:1266-1273.

- Eddy SR, Gold L (1992) Artificial mobile DNA element constructed from the *EcoRI* endonuclease gene.
Proc Natl Acad Sci U S A **89**:1544-1547.
- Ehbrecht HJ, Pingoud A, Urbanke C, Maass G, Gualerzi C (1985) Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA.
J Biol Chem **260**:6160-6166.
- Ermel G, Cavalier A, Thomas D, Le Pennec JP (1994) Genetic studies of lactococcal bacteriophages--taxonomic differentiations and DNA analysis: evidence for 3' cohesive ends.
J Appl Bacteriol **76**:431-441.
- Fitzgerald GF, Daly C, Brown LR, Gingeras TR (1982) *ScrFI*: a new sequence-specific endonuclease from *Streptococcus cremoris*.
Nucleic Acids Res **10**:8171-8179.
- Flores H, Osuna J, Heitman J, Soberon X (1995) Saturation mutagenesis of *His114* of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants.
Gene **157**:295-301.
- Friedman RD (1982) Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels.
Anal Biochem **126**:346-349.
- Froseth BR, Harlander SK and M^cKay LL (1988) Plasmid-mediated reduced phage sensitivity in *Streptococcus lactis* KR5.
J Dairy Sci **71**:275-284.
- Garvey P, Van sinderen D, Twomey DP, Hill C, Fitzgerald GF (1995) Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defense systems in the genus *Lactococcus*.
Int Dairy J **5**:905-947.
- Garvey P, Hill C, Fitzgerald GF (1996) The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration.
Appl Environ Microbiol **62**:676-679.
- Gautier M, Chopin MC (1987) Plasmid-determined systems for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*.
Appl Environ Microbiol **53** :923-927.
- Geiger R, Ruter T, Alves J, Fliess A, Wolfes H, Pingoud V, Urbanke C, Maass G, Pingoud A, Dusterhoft A, et al. (1989) Genetic engineering of *EcoRI* mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site: physicochemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln144Lys145 and Gln144Lys145Lys200 mutants.
Biochemistry **28**:2667-2677.

- George J, Blakesley RW, Chirikjian JG (1980) Sequence-specific endonuclease *Bam*HI. Effect of hydrophobic reagents on sequence recognition and catalysis.
J Biol Chem **255**:6521-6524.
- Gini GA (1987) Ocular infection in a newborn caused by *Neisseria mucosa*.
J Clin Microbiol **25**:1574-1575.
- Gopal PK, Crow VL (1993) Characterization of loosely associated material from the cell surface of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8 and its phage-resistant variant 398.
Appl Environ Microbiol **59**:3177-3182.
- Hager PW, Reich NO, Day JP, Coche TG, Boyer HW, Rosenberg JM, Greene PJ (1990) Probing the role of glutamic acid 144 in the *Eco*RI endonuclease using aspartic acid and glutamine replacements.
J Biol Chem **265**:21520-21526.
- Hartke A, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y (1996) Characterization of a complex restriction/modification system detected in a *Bifidobacterium longum* strain.
Appl Microbiol Biotechnol **45**:132-136.
- Heidmann S, Seifert W, Kessler C, Domdey H (1989) Cloning, characterization and heterologous expression of the *Sma*I restriction-modification system.
Nucleic Acids Res **17**:9783-9796.
- Heitman J, Model P (1990) Mutants of the *Eco*RI endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition.
EMBO J **9**:3369-3378.
- Heitman J (1993) On the origins, structures and functions of restriction-modification enzymes.
Genetic Engineering (Setlow J.K. Ed.), pp57-108, Plenum Press, New-York.
- Higgins DL, Sanozky-Dawes RB, Klaenhammer TR (1988) Restriction and modification activities from *Streptococcus lactis* ME2 are encoded by a self-transmissible plasmid, pTN20, that forms cointegrates during mobilization of lactose-fermenting ability.
J Bacteriol **170**:3435-3442.
- Hill C, Pierce K, Klaenhammer TR (1989a) The conjugative plasmid pTR2030 encodes two bacteriophage defense mechanisms in lactococci, restriction modification (R+/M+) and abortive infection (Hsp+).
Appl Environ Microbiol **55**:2416-2419.
- Hill C, Romero DA, McKenney DS, Finer KR, Klaenhammer TR (1989b) Localization, cloning, and expression of genetic determinants for bacteriophage resistance (Hsp) from the conjugative plasmid pTR2030.
Appl Environ Microbiol **55**:1684-1689.

- Hill C, Miller LA, Klaenhammer TR (1991) In vivo genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage.
J Bacteriol **173**:4363-4370.
- Hill C (1993) Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria.
FEMS Microbiol Rev **12**:87-108.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST (1994) Bergey Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.).
Williams & Wilkins Edn., Baltimore. p787.
- Ives CL, Nathan PD, Brooks JE (1992) Regulation of the *Bam*HI restriction-modification system by a small intergenic ORF, *bam*HIC, in both *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.
J Bacteriol **174**:7194-7201.
- Jarvis AW, Meyer J (1986) Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages.
Appl Environ Microbiol **51**:566-571.
- Jarvis AW, Fitzgerald GF, Mata M, Mercenier A, Neve H, Powell IB, Ronda C, Saxelin M, Teuber M (1991) Species and type phages of lactococcal bacteriophages.
Intervirology **32**:2-9.
- Jarvis AW (1992) Analysis of phage resistance mechanisms encoded by lactococcal plasmid pAJ2074.
Can J Microbiol **39**:252-258.
- Jeltsch A, Alves J, Oelgeschlager T, Wolfes H, Maass G, Pingoud A (1993) Mutational analysis of the function of Gln115 in the *Eco*RI restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis.
J Mol Biol **229**:221-234.
- Jeltsch A, Wenz C, Wende W, Selent U, Pingoud A (1996) Engineering novel restriction endonucleases : Principles and applications.
Trends Biotechnol **14** :235-238.
- Jeltsch A, Wenz C, Stahl F, Pingoud A (1996) Linear diffusion of the restriction endonuclease *Eco*RV on DNA is essential for the in vivo function of the enzyme.
EMBO J **15**:5104-5111.
- Josephsen J, Klaenhammer T (1990) Stacking of three different restriction and modification systems in *Lactococcus lactis* by cotransformation.
Plasmid **23**:71-75.

- Josephsen J, Jorgen-Jensen B, Nyengaard NR (1998) Determination of the recognition sequence of the type II restriction endonuclease, *LlaCI*, from *Lactococcus lactis* W15.
FEMS Microbiol Lett **163**:25-29.
- Junulaitis A, Pertrusyte M, Manaliene Z, Klimauskas S, Butkus V (1992a) Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase – Prototypes of a new class (type IV).
Nucleic Acids Res **20** :6043-6049.
- Junulaitis A, Vaisvila R, Timinskas A, Klimauskas S, Butkus V (1992b) Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzymes.
Nucleic Acids Res **20** :6051-6056.
- Kapfer W, Walter J, Trautner TA (1991) Cloning, characterization and evolution of the *BsuFI* restriction endonuclease gene of *Bacillus subtilis* and purification of the enzyme.
Nucleic Acids Res **19**:6457-6463.
- Karska-Wysocki B, Szatmari G, Beauregard G, Mamet-Bratley MD (1995) A new restriction endonuclease activity found in *Lactococcus cremoris* G2. Ottawa Life Sciences Conference, panel #D2-09.
- Karska-Wysocki B, Szatmari G, Barrette B, Mamet-Bratley MD (1996) Characterization of a new restriction endonuclease, *LlaGI*, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* G2. Ottawa Life Sciences conference, panel #P0-88.
- Karyagina A, Shilov I, Tashlitskii V, Khodoun M, Vasil'ev S, Lau PCK, Nikolskaya I (1997) Specific binding of *ssolI* DNA methyltransferase to its promoter region provides the regulation of *ssolI* restriction-modification gene expression.
Nucleic Acids Res **25**:2114-2120.
- Kessler C, Manta V (1990) Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases – A review (Edition 3).
Gene **92**:1-248.
- Kim YC, Grable JC, Love R, Greene PJ, Rosenberg JM (1990) Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing.
Science **249**:1307-1309.
- Kim YG, Chandrasegaran S (1994) Chimeric restriction endonuclease.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**:883-887.
- Kim YG, Smith J, Durgesha m, Chandrasegaran S (1998) Chimeric restriction enzyme : Gal4 fusion to FokI cleavage domain.
Biol Chem **379**:489-495.
- Klaenhammer TR (1989) Genetic characterization of multiple mechanisms of phage defense from a prototype phage-insensitive strain, *Lactococcus lactis* ME 2.
J Dairy Sci **72**:3429-3443.

- Kok J (1991) Proteinase genes of cheese starter cultures.
Biochem Soc Trans **19**:670-674.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckengerger PC, Winn WC (1997)
Color atlas and textbook of diagnostic microbiology (5th ed.).
Lippincott-Raven, Philadelphia. pp492-503.
- Kong H, Roemer SE, Waite-Rees PA, Benner JS, Wilson GG, Nwankwo DO
(1994) Characterization of the *BcgI*, a new kind of restriction-
modification system.
J Biol Chem **269**:683-690.
- Kostrewa D, Winkler FK (1995) Mg²⁺ binding to the active site of *EcoRV*
endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and
product DNA at 2 Å resolution.
Biochemistry **34**:683-696.
- Krüger DH, Bickle TA (1983) Bacteriophage survival: multiple mechanisms
for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts.
Microbiol Rev **47**:345-360.
- Krüger DH, Kupper D, Meisel A, Renter M, Schroeder C (1995) The
significance of distance and orientation of restriction endonuclease
recognition sites in viral DNA genomes.
FEMS Microbiol Rev **17**:177-184.
- Kulik EM, Bickle TA (1996) Regulation of the activity of the type IC
EcoR1241 restriction enzyme.
J Mol Biol **264**:891-906.
- Lacks S, Greenberg B (1977) Complementary specificity of restriction
endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA
methylation.
J Mol Biol **114**:153-168.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of bacteriophage T4.
Nature (London) **227**:680-685
- Loones A (1994) La pression de sélection des souches : Le cas du lait
fermenté.
Actes du colloque LACTIC 94, Les bactéries lactiques/lactic acid
bacteria. Edn. Adria Normandie. Presses universitaires de Caen.
pp235-244.
- Lucey M, Daly C, Fitzgerald GF (1992) Cell surface characteristics of
Lactococcus lactis harboring pCI528, a 46kb plasmid encoding inhibition
of bacteriophage adsorption.
J Gen Microbiol **138**:2137-2143.
- Luria SE, Human ML (1952) A non-hereditary host-induced variation of
bacterial viruses.
J Bacteriol **64**:557-569.

- Mackey T, Lejeune V, Janssens M, Wauters G (1993) Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from humans. *J Clin Microbiol* **31**:2499-2501.
- Madsen A, Josephsen J (1998a) Characterization of *LlaCI*, a new restriction-modification system from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15. *Biol Chem* **379**:443-449.
- Madsen A, Josephsen J (1998b) Cloning and characterization of the lactococcal plasmid-encoded type II restriction/modification system, *LlaDII*. *Appl Environ Microbiol* **64**:2424-2431.
- Malyguine E, Vannier P, Yot P (1980) Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents. *Gene* **8**:163-177.
- Mayo B, Hardisson C, Brana AF (1991) Nucleolytic activities in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497. *FEMS Microbiol Lett* **79**:795-198.
- M^cCelland M, Nelson M, Raschke E (1994) Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **22** :3640-3659.
- M^cClarín JA, Frederick CA, Wang BC, Greene P, Boyer HW, Grable J, Rosenberg JM (1986) Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* **234**:1526-1541.
- M^cKay LL (1983) Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**:259-274.
- M^cKay LL, Bohanon MJ, Polzin KM, Rule PL, Baldwin KA (1989) Localization of separate genetic loci for reduced sensitivity towards small isometric-headed bacteriophage SK1 and prolate-headed phage c2 on pGBK17 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. *Appl Environ Microbiol* **55**:2702-2709.
- Mernagh DR, Janscak P, Firman K, Kneale GG (1998) Protein-protein and protein-DNA interactions in the type I restriction endonuclease R.*EcoR124I*. *Biol Chem* **379**:497-503.
- Moineau S, Fortier J, Ackermann HW, Pandian S (1992) Characterization of lactococcal phages from Quebec cheese plants. *Can J Microbiol* **38**:875-882.
- Moineau S, Pandian S, Klaenhammer TR (1993) Restriction/modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry. *Appl Environ Microbiol* **59**:197-202.

- Moineau S, Walker SA, Vedamuthu ER, Vandenberg PA (1995) Cloning and sequencing of *LlaDCHI* [corrected] restriction/modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae DpnII* system.
Appl Environ Microbiol **61**:2193-2202.
- Moineau S, Borkaev M, Holler BJ, Walker JK, Vedamuthu ER, Vandenberg PA (1996) Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the states.
J Dairy Sci **79**:2104-2111.
- Monteville MR, Ardestani B, Gellar BR (1994) Lactococcal phage require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA.
Appl Environ Microbiol **60**:3204-3211.
- Morgan R, Xiao J-P, Xu S-Y (1998) Characterization of an extremely thermostable restriction enzyme, *PspGI*, from *Pyrococcus* strain and cloning of the *PspGI* restriction-modification system in *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol **64**:3669-3673.
- Nasri M, Thomas D (1986) Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease *HindIII*.
Nucleic Acids Res **14**:811-821.
- Nasri M, Thomas D (1987) Alteration of the specificity of *PvuII* restriction endonuclease.
Nucleic Acids Res **15**:7677-7687.
- NEB (New England BioLabs) (1998) Restriction Endonucleases Catalogue 1998-1999.
- Newman M, Strzelecka T, Dorner LF, Schildkraut I, Aggarwal AK (1995) Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding.
Science **269**:656-663.
- Nyengaard N, Vogensen FK, Josephsen J (1993) *LlaAI* and *LlaBI*, two type-II restriction endonucleases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W9 and W56 recognizing, respectively, 5'-/GATC-3' and 5'-C/TRYAG-3'.
Gene **136**:371-372.
- Nyengaard N, Vogensen FK, Josephsen J (1995) Restriction-modification systems in *Lactococcus lactis*.
Gene **157**:13-18.
- Nyengaard NR, Falkenberg-Klok J, Josephsen J (1996) Cloning and analysis of the restriction-modification system *LlaBI*, a bacteriophage resistance system from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56.
Appl Environ Microbiol **62**:3494-3498.
- Oram JD (1971) Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* ML 3.
J Gen Virol **13**:59-71.

- O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus*.
Appl Environ Microbiol **59**:2730-2733.
- O'Sullivan DJ, Zagula K, Klaenhammer TR (1995) In vivo restriction by *LlaI* is encoded by three genes, arranged in an operon with *llaIM*, on the conjugative *Lactococcus* plasmid pTR2030.
J Bacteriol **177**:134-143.
- O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR (1998a) Control of expression of *LlaI* restriction in *Lactococcus lactis*.
Mol Microbiol **27**:1009-1020.
- O'Sullivan D, Coffey A, Fitzgerald GF, Hill C, Ross RP (1998b) Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative plasmids.
Appl Environ Microbiol **64**:4618-4622.
- Osuna J, Flores H, Soberon X. (1991) Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities.
Gene **106**:7-12.
- Pertzev AV, Kravetz AN, Mayorov SG, Zakharova MV, Solonin AS (1997) Isolation of a strain overproducing endonuclease *Eco29KI*: Purification and characterization of the homogenous enzyme.
Biochem (Moscow) **62**:732-741.
- Pingoud A, Jeltsch A (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases.
Eur J Biochem **246**:1-22.
- Poch MT, Somkuti GA (1995) Isolation of *SagI*, a new *HaeIII* isoschizomer from *Streptococcus agalactiae*.
Appl Microbiol Biotechnol **43**:282-284.
- Polisky B, Greene P, Garfin DE, McCarthy BJ, Goodman HM, Boyer HW (1975) Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease.
Proc Natl Acad Sci U S A **72**:3310-3314.
- Powell IA, Arnold PM, Hillier AJ, Davidson BE (1989) Molecular comparison of prolate and isomeric-headed bacteriophages of lactococci.
Can J Microbiol **35**:860-866.
- Prakash-Cheng A, Ryu J (1993) Delayed expression of in vivo restriction activity following conjugal transfer of *Escherichia coli* *hsdK* (restriction-modification) genes.
J Bacteriol **175**:4905-4906.
- Prevots F, Mata M, Ritzenthaler P (1990) Taxonomic differentiation of 101 lactococcal bacteriophages and characterization of bacteriophages with unusually large genomes.
Appl Environ Microbiol **56**:2180-2185.

- Price C, Bickle TA (1986) A possible role for DNA restriction in bacterial evolution.
Microbiol Sci **3**:296-299.
- Raleigh EA (1992) Organization and function of the mcrBC genes of *Escherichia coli* K-12.
Mol Microbiol **6**:1079-1086.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ, Reinbold GW (1969) Differential agar medium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*.
Appl Microbiol **18**:755-759.
- Rimseliene R, Vaisvila R, Janulaitis A (1995) The *eco72IC* gene specifies a trans-acting factor which influences expression of both DNA methyltransferase and endonuclease from the *Eco72I* restriction-modification system.
Gene **157**:217-219.
- Roberts RJ (1976) Restriction endonucleases.
CRC Crit Rev Biochem **4**:123-64.
- Roberts RJ, Halford SE (1993) Type II restriction endonucleases. Nucleases, edn. 2. Edited by Linn S.M., Lloyd R.S. and Roberts R.J.. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp35-88.
- Roberts RJ, Macelis D (1998) REBASE - restriction enzymes and methylases.
Nucleic Acids Res **26**:338-350.
- Saha S, Ahmad I, Reddy YV, Krishnamurthy V, Rao DN (1998) Functional analysis of conserved motifs in type III restriction-modification enzymes.
Biol Chem **379**:511-517.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders ME, Klaenhammer TR (1983) Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis* : evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption.
Appl Environ Microbiol **46**:1125-1133.
- Schäfer A, Geis A, Neve H, Teuber M (1991) Bacteriophage receptors of *Lactococcus lactis* subsp. '*diacetylactis*' F7/2 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1.
FEMS Microbiol Lett **62**:69-73.
- Scherrer B (1984) Biostatistique
Gaëtan Morin éditeur ltée. Québec. pp624-642.
- Schiestl RH, Petes TD (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc Natl Acad Sci U S A **88**:7585-7589.
- Schouler C, Gautier M, Ehrlich SD, Chopin MC (1998a) Combinational variation of restriction modification specificities in *Lactococcus lactis*.
Mol Microbiol **28**:169-178.

- Schouler C, Clier F, Lerayer AL, Ehrlich SD, Chopin MC (1998b) A type IC restriction-modification system in *Lactococcus lactis*.
J Bacteriol **180**:407-411.
- Sears LE, Zhou B, Aliotta JM, Morgan RD, Kong H (1996) *BaeI*, another unusual *BcgI*-like restriction endonuclease.
Nucleic Acids Res **24** :3590-3592.
- Sharpe PM (1986) Molecular evolution of bacteriophages: evidence of selection against the recognition sites of host restriction enzymes.
Mol Biomol Evol **3**:75-83.
- Shooter JR, Howles MJ, Baselski MS (1990) *Neisseria* infections in dialysis patients.
Clin Microbiol Newslett **12**:15-16.
- Sidorova NY, Rau DC (1996) Differences in water release for the binding of *EcoRI* to specific and nonspecific DNA sequences.
Proc Natl Acad Sci U S A **93**:12272-12277.
- Sijtsma L, Sterkenburg A, Wouter JTM (1988) Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance.
Appl Environ Microbiol **54**:2808-2811.
- Sijtsma L, Jansen N, Hazeleger WC, Wouter JTM, Hellingwerf KJ (1990a) Cell surface characteristics of bacteriophage-resistant *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and its bacteriophage-sensitive strain SK112.
Appl Environ Microbiol **56**:3230-3233.
- Sijtsma L, Wouters JTM, Hellingwerf KJ (1990b) Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110.
J Bacteriol **172**:7126-7130.
- Siksnyš V, Zareckaja N, Vaisvila R, Timinskas A, Stakenas P, Butkus V, Janulaitis A (1994) CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R.*MunI* and R.*EcoRI*.
Gene **142**:1-8
- Sing WD, Klaenhammer TR (1990) Plasmid-induced abortive infection in lactococci: a review.
J Dairy Sci **72**:2239-2251.
- Skowron P, Kaczorowski T, Tucholski J, Podhajaska AJ (1993) Atypical DNA-binding properties of class-IIs restriction endonucleases: Evidence for recognition of the cognate sequence by a *FokI* monomer.
Gene **125** :1-10.
- Smith HO, Nathans D (1973) Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.
J Mol Biol **81**:419-423.

- Stephenson FH, Ballard BT, Boyer HW, Rosenberg JM, Greene PJ (1989) Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the *RsrI* and *EcoRI* restriction endonucleases. *Gene* **85** :1-13.
- Stotka JL, Rupp ME, Meier FA, Markowitz SM (1991) Meningitis due to *Neisseria mucosa* : case report and review. *Rev Infect Dis* **13**:837-841.
- Su P, Im H, Hsieh H, Kang'a S, Dunn NW (1999) *LlaFI*, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **65**:686-693.
- Szybalski W, Kim SC, Hasan N, Podhajaska AJ (1991) Class-IIs restriction enzymes – A review. *Gene* **100** :13-26.
- Tao Tao, Bourne JC, Blumenthal RM (1991) A family of regulatory genes associated with type II restriction-modification systems. *J Bacteriol* **173**:1367-1375.
- Tao Tao, Blumenthal RM (1992) Sequence and characterization of *pvuIIR*, the *PvuII* endonuclease gene, and of *pvuIIC*, its regulatory gene. *J Bacteriol* **174**:3395-3398.
- Terry BJ, Jack WE, Modrich P (1985) Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease. Nonspecific interactions in *EcoRI* catalysis. *J Biol Chem* **260**:13130-13137.
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **29**:807-813.
- Thielking V, Selent U, Kohler E, Wolfes H, Pieper U, Geiger R, Urbanke C, Winkler FK, Pingoud A (1991) Site-directed mutagenesis studies with *EcoRV* restriction endonuclease to identify regions involved in recognition and catalysis. *Biochemistry* **30**:6416-22.
- Trevors JT (1995) Molecular evolution in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67** :315-324.
- Twomey DP, Davis R, Daly C, Fitzgerald GF (1993) Sequence of the gene encoding a second *ScrFI* m⁵C methyltransferase of *Lactococcus lactis*. *Gene* **136**:205-209.
- Twomey DP, Gabillet N, Daly C, Fitzgerald GF (1997) Molecular characterization of the restriction endonuclease gene (*scrFIR*) associated with the *ScrFI* restriction/modification system from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC503. *Microbiology* **143**:2277-2286.

- Twomey DP, McKay LL, O'Sullivan DJ (1998) Molecular characterization of the *Lactococcus lactis* LlaKR2I restriction-modification system and effect of an IS982 element positioned between the restriction and modification genes.
J Bacteriol **180**:5844-5854.
- Valyasevi R, Sandine WE, Geller BL (1990) The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide.
Appl Environ Microbiol **56**:1882-1889.
- Valyasevi R, Sandine WE, Geller BL (1991) A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2.
J Bacteriol **173**:6095-6100.
- Valyasevi R, Sandine We, Geller BL (1994) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 bacteriophage Sk1 receptor involving rhamnose and glucosemoieties in the cell wall.
J Dairy Sci **77**:1-6.
- Walder RY, Walder JA, Donelson JE (1984) The organization and complete nucleotide sequence of the *Pst*I restriction-modification system.
J Biol Chem **259**:8015-8026.
- Ward AC, Davidson BE, Hillier AJ, Powell IB (1992) Conjugally transferable phage resistance activities from *Lactococcus lactis* DRC1.
J Dairy Sci **75**:683-691.
- Watanabe K, Takesue S, Ishibashi K (1977) Reversibility of the adsorption of bacteriophage PL-1 to the cell walls isolated from *Lactobacillus casei*.
J Gen Virol **34**:189-194.
- Watson R, Zuker M, Martin SM, Visentin LP (1980) A new site-specific endonuclease from *Neisseria cinerea*.
FEBS Lett **118**:47-54.
- Wenz C, Selent U, Wende W, Jeltsch A, Wolfes H, Pingoud A (1994) Protein engineering of the restriction endonuclease *EcoRV*: replacement of an amino acid residue in the DNA binding site leads to an altered selectivity towards unmodified and modified substrates.
Biochim Biophys Acta **1219**:73-80.
- Wilson GG (1988) Type II restriction-modification systems.
Trends genet **4**:314-318.
- Wilson GG (1991a) Organisation of restriction-modification systems.
Nucleic Acids Res **19** :2539-2566.
- Wilson GG (1991b) Restriction and modification systems.
Annu Rev Genet **25** :585-627.

- Winkler FK, Banner DW, Oefner C, Tsernoglou D, Brown RS, Heathman SP, Bryan RK, Martin PD, Petratos K, Wilson KS (1993) The crystal structure of *EcoRV* endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments.
EMBO J **12**:1781-1795.
- Winter RB, Berg OG, von Hippel PH (1981) Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The *Escherichia coli* lac repressor-operator interaction: kinetic measurements and conclusions.
Biochemistry **20**:6961-6977.
- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.
Anal Biochem **118**:197-203.
- Xu G, Willert J, Kapfer W, Trauner TA (1995) *BsuCI*, a type-I restriction-modification system in *Bacillus subtilis*.
Gene **157**:59.
- Xu GL, Kapfer W, Walter J, Trautner TA (1992) *BsuBI*--an isospecific restriction and modification system of *PstI*: characterization of the *BsuBI* genes and enzymes.
Nucleic Acids Res **20**:6517-6523.
- Yu W, Mierau I, Mars A, Johnson E, Dunny G, McKay LL (1995) Novel insertion sequence-like element IS982 in lactococci.
Plasmid **33**:218-225.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je désire adresser mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr George Szatmari, pour son accueil dans le laboratoire ainsi que pour ses conseils et sa patience lors de l'écriture de ce mémoire. J'aimerais également remercier mes co-directrices : la Dre Margaret Mamet-Bratley pour ses précieux commentaires et conseils et la Dre Barbara Karska-Wysocki pour ses remarques constructives lors de la réalisation de mes différents travaux. Finalement, je voudrais témoigner ma reconnaissance envers le CRSNG et l'Entente Auxiliaire Canada-Québec sur le Développement Agroalimentaire pour son soutien financier au cours de ce projet.