

## Caractérisation d'un élément conjugatif original : le facteur sexuel de *Lactococcus lactis* 712

JJ Godon <sup>1</sup>, CJ Pillidge <sup>2</sup>, K Jury <sup>3</sup>, MJ Gasson <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des biotechnologies de l'environnement, Inra, avenue des Étangs,  
11100 Narbonne, France ;

<sup>2</sup> New Zealand Dairy Research Institute, Private Bag 11029, Palmerston North, Nouvelle Zélande ;

<sup>3</sup> Institute of Food Research, BBSRC, Colney lane, NR4 7UA Norwich, Royaume Uni

**Résumé** — Le facteur sexuel de *Lactococcus lactis* 712 est un élément génétique cryptique qui permet l'échange d'information génétique entre cellules. Il est aussi capable de mobilité intra-cellulaire avec une forme libre circulaire et des formes intégrées sur le plasmide lactose ou sur le chromosome. Cet élément d'environ 50 kb a été cloné et presque entièrement séquencé. Plus de 80 % des phases ouvertes de lecture ne présentent pas d'homologie significative avec des séquences déjà connues. Les homologies les plus fortes révèlent : (i) une protéine d'agrégation homologue à celles présentes sur les plasmides conjugatifs d'*Enterococcus faecalis*, (ii) une protéine homologue à TraD du facteur sexuel F d'*Escherichia coli* et VirD4 du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, deux protéines impliquées dans le transport de l'ADN, (iii) une protéine tripliquée homologue à la protéine dupliquée associée à la résistance au tellurium chez *Alcaligenes* sp. L'analyse de fragments clonés à partir des différentes formes intracellulaires du facteur sexuel (circulaire libre ou linéaire intégré) nous a permis de caractériser les événements d'intégration/excision sur le chromosome. Une séquence de 24 pb, identique sur le site chromosomique d'intégration (*attB*) et sur la forme circulaire du facteur sexuel (*attP*) est dupliquée aux bornes de celui-ci lors de son intégration. Une partie de cette séquence (12 pb) est aussi impliquée dans l'inversion de deux fragments d'ADN du facteur sexuel (*flip1* et 2). Le facteur sexuel a été marqué par l'insertion d'un gène de résistance à la tétracycline pour suivre sa fréquence de transfert, sa stabilité et son spectre d'hôte. Sa fréquence de transfert est élevée au sein de l'espèce *L. lactis* mais indécidable vers d'autres espèces même proches comme *L. garviae* and *L. raffinolactis*. La fréquence de transfert du chromosome par mobilisation et l'orientation unidirectionnelle de ce transfert ont été déterminées.

**conjugaison / agrégation / intégration / *L. lactis***

**Summary** — Characterization of an original conjugative element: the sex factor of *Lactococcus lactis* 712. The sex factor of *Lactococcus lactis* 712 is a 50 kb cryptic genetic element capable of existing either as a free plasmid or integrated on the chromosome and allowing a cell-cell exchange of genetic information. The sex factor was cloned from the *L. lactis* 712 plasmid-free derivative MG1363 and almost completely sequenced. Most (over 80%) of the open reading frames gave predicted amino acid sequences that showed no significant homology to current database sequences. The remaining 20% showed the following homologies: i) a sex factor aggregation protein showing high homology to its counterpart on an *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid; ii) an unknown sex factor protein

showing high homology to the DNA transport proteins TraD from *F* in *Escherichia coli* and VirD4 from *Ti* in *Agrobacterium tumefaciens*; iii) three very similar proteins encoded by a three sex factor genes arranged in tandem showing high homology to the tellurium resistance proteins encoded by a two-copy gene on an *Alcaligenes* sp plasmid. Sex factor integration/excision events were characterized using cloned DNA fragments derived from both circular and integrated forms of the sex factor. An identical 24bp sequence was present on the circular sex factor form (attP) and at the chromosomal attachment site (attB). This sequence was duplicated following sex factor integration. Twelve bp of this sequence were also involved in the inversion of two DNA elements (flip1 and flip2) within the sex factor. The sex factor was marked with a tetracycline resistance gene to allow determination of its stability, transfer frequency and host range. The sex factor was highly stable in MG1363. It transferred itself at high frequency, but only within the *L. lactis* species. There was no detectable transfer outside of this group, which included to the closely related *L. garviae* and *L. raffinolactis*. Using a series of *L. lactis* strains containing erythromycin markers inserted at known map locations on the chromosome, it was shown that the sex factor promoted chromosomal transfer in MG1363 and in the unrelated strain *L. lactis* subsp *lactis* IL1403 in a unidirectional, polarized manner.

### conjugation / aggregation / integration / *L. lactis*

## INTRODUCTION

De nombreuses souches de *L. lactis* sont présentes dans les levains utilisés pour la fabrication de fromages et de produits laitiers fermentés. Depuis longtemps, des travaux ont essayé d'isoler et de conserver les souches composant ces levains et de caractériser leurs propriétés spécifiques. Récemment, à ces souches «naturelles» s'ajoutent des souches construites grâce au génie génétique. Cependant, la stabilité phénotypique de toutes ces souches et la maîtrise de la dissémination de l'information génétique modifiée dépendent du flux naturel des gènes au sein de la population bactérienne. Ce flux est postulé faible, mais sa mesure et les mécanismes qui le génèrent sont encore en grande partie inconnus.

Les mécanismes déjà connus de ces échanges génétiques chez les bactéries sont variés : le transfert de plasmides ou transposons conjuguatifs, la mobilisation du chromosome et d'autre plasmides par ces éléments, le rétrotransfert, la compétence naturelle, la transduction par les phages, etc. Leur mise en évidence a souvent été liée avec un phénotype permettant une sélection positive des souches réceptrices, généralement la résistance à un antibiotique.

Chez *L. lactis* ssp *cremoris* 712 (Gasson, 1983 ; Godon et al, 1992) un élément conjuguatif baptisé «facteur sexuel» a été découvert sur des souches voisines dans deux laboratoires en Angleterre et aux États-Unis (Gasson et Davies, 1980 ; Walsh et McKay, 1981). Sa co-intégration avec le plasmide lactose permet le transfert à haute fréquence de ce plasmide et confère aux bactéries un phénotype d'agrégation constitutif. Il s'agit d'un nouveau type d'élément génétique cryptique qui s'autotransfère par conjugaison et qui, par mobilisation, permet le transfert d'autres informations génétiques qu'elles soient chromosomiques ou extra-chromosomiques.

## STRUCTURE

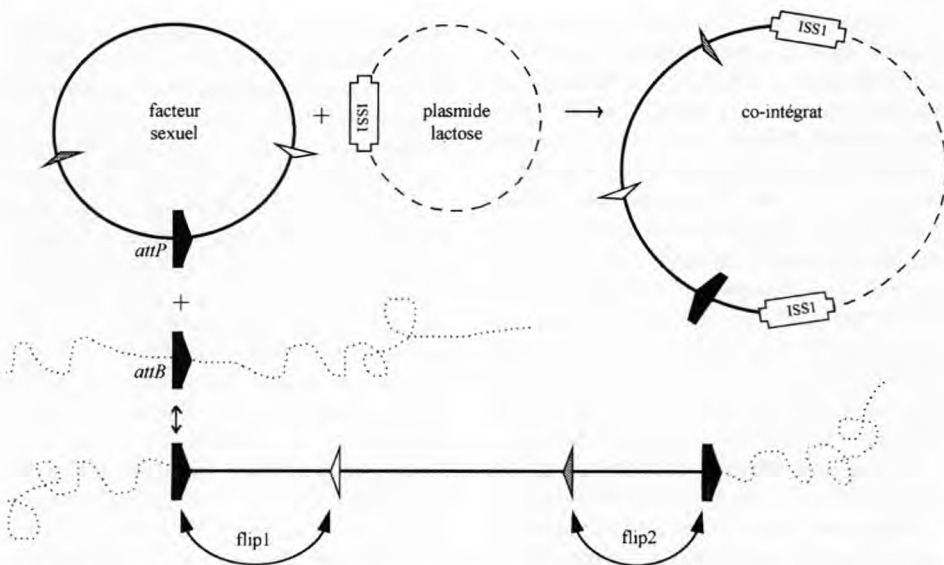
Le facteur sexuel de *L. lactis* 712 est une molécule d'environ 50 kb qui a été décrite sous deux formes en équilibre au sein d'une population : une forme circulaire libre (Anderson et McKay, 1984) et une forme intégrée dans le chromosome (Gasson et al, 1992). La forme intégrée étant la plus fréquente, elle représente environ 90 % des copies de l'élément dans la population (Pillidge et al, 1995).

Le site d'attachement préférentiel du facteur sexuel dans le chromosome a été caractérisé à partir des séquences nucléotidiques de fragments issus soit de la forme circulaire libre, soit des zones d'intégration dans le chromosome. Une séquence identique de 24 pb, présente sur le facteur sexuel et sur le chromosome, est le point de co-intégration des deux molécules circulaires (figs 1 et 2) (Godon et al, 1995). Ces 24 pb sont dupliquées lors de l'intégration et se retrouvent aux jonctions facteur sexuel : chromosome. Ce type d'intégration/excision est proche de celui des phages lambdaïdes. Nous ne savons pas encore si la forme circulaire libre provient de son maintien grâce à un mécanisme d'auto-réplication (type plasmide) ou d'une

haute fréquence d'intégration/excision. En revanche, la formation de co-intégrat facteur sexuel : plasmide lactose est un événement dirigé par une séquence d'insertion (ISS1) présente sur le plasmide lactose (fig 1) (Anderson et McKay, 1984).

La localisation du facteur sexuel dans le chromosome a été déterminée par gel en champs pulsé grâce à une sonde spécifique du gène *cluA*. Ce site, proche du gène *ilvD*, est probablement à l'opposé de l'origine de réplication du chromosome (fig 3) (Le Bourgeois et al, 1995).

Bien qu'un clone curé du facteur sexuel ait été isolé par hasard, cet élément semble remarquablement stable : un facteur sexuel portant un marqueur de résistance à la tétracycline n'a pu être perdu après 200 géné-



**Fig 1.** Différents états du facteur sexuel dans la cellule. Le facteur sexuel est représenté en trait plein, le plasmide lactose en traitillés et le chromosome en pointillés. Les triangles symbolisent l'emplacement des séquences impliquées soit dans les mécanismes de recombinaison, avec en noir les séquences d'insertion/excision (*attB* et *attP*), soit dans les mécanismes d'inversion avec en blanc et hachuré les séquences d'inversion (*flip1* et *flip2*).

Forms of the sex factor in the cell. Full, dashed and dotted lines indicate respectively sex factor DNA, lactose plasmid DNA and chromosomal DNA. Triangles show locations of sequences involved in recombination events. Black, white and dashed triangles correspond respectively to integration/excision sequences (*attB* and *attP*), inversion sequence *flip1* and inversion sequence *flip2*.

```

CTTTAGTATTAGTCTATAATAGAACAATCTTATTTATACCTAGAATATGGCTGGGCGTTTCTACCTCGTACCGT attB
ACAGGTTAATAAACCGTGGGAATATAAATCTTATTTATACCTAGAATATGCAAAAAAGCGTAATAACGGTATTT attP
GTAATCCCCATTGGCTGTAAAGTTGAAATCTAATTTATAATCGTAATTCGTATCGGTGTCTGGTAAGTCTTTTGA flip1
CGGGTTGCTCGCCTACACAGGCTTAATCATATTTATACCTGTGTTAAATTCCTGAGCTAAATCCGTCACCTGT flip2

```

**Fig 2.** Séquences impliquées dans les mécanismes de recombinaison. Insertion/excision : *attB* est la séquence cible sur le chromosome, *attP* est la séquence identique sur l'élément génétique (triangles noirs sur les figures 1 et 4). Inversion : séquences d'inversion *flip1* (triangle blanc sur les figures 1 et 4) et *flip2* (triangle hachuré sur les figures 1 et 4). Les 24 pb conservées entre *attB* et *attP* sont indiquées en gras ; les 12 pb conservées entre les quatre séquences sont soulignées. L'orientation des séquences *flip1* et *flip2* est inversée par rapport à la séquence de *attP*.

*Sequences involved in recombination events. Integration/excision: attB is the chromosomal target sequence and attP is its sex factor counterpart (black triangles in figures 1 and 4). Inversion: inversion sequences flip1 (white triangles in figure 1 and 4) and flip2 (dashed triangles in figures 1 and 4). Bold sequences indicate the 24 bp conserved region between attB and attP. Underlined sequences refers to 12 bp that are conserved between all four sequences. The orientation of flip1 and flip2 sequences is opposite with attP sequence.*

rations de culture sans pression de sélection (Pillidge et al, 1995).

L'étude du site d'intégration du facteur sexuel dans le chromosome a permis la caractérisation d'autres événements de recombinaison sur le facteur sexuel. Deux fragments d'ADN (*flip1* et 2), d'environ 10 kb chacun, inversent leur orientation. Ces deux fragments sont encadrés par deux séquences répétées inversées de 13 nucléotides (fig 2). Dans les deux cas, l'une de ces séquences est incluse dans la séquence de 24 pb qui constitue le point d'attachement du facteur sexuel dans le chromosome (figs 1 et 2). L'inversion de *flip1*, observée par Anderson (Anderson et McKay, 1984) à une fréquence de 2,5 % par génération (Anderson et McKay, 1984), supprime de façon réversible l'agrégation constitutive observée lors de la formation du co-intégrat facteur sexuel : plasmide lactose. Effectivement, l'une des bornes de l'inversion est située à l'intérieur du gène codant pour la protéine d'agrégation CluA et l'inversion de *flip1* inactive ce gène (Godon et al, 1995). Le rôle de ces inversions fréquentes, s'il ne s'agit pas d'événements sans signification biologique, demeure inconnu.

## ANALYSE GÉNÉTIQUE

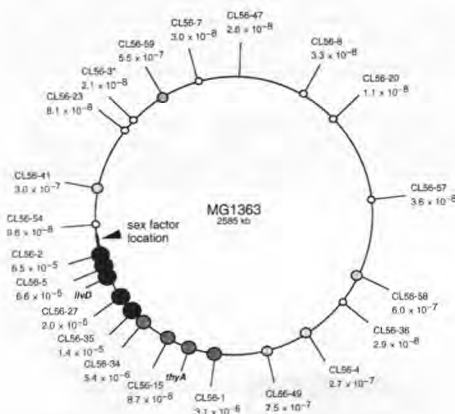
À partir de *L. lactis* MG1363, souche sans plasmide issue de *L. lactis* 712, le facteur sexuel a été entièrement cloné et séquencé à environ 90 %. Quarante-sept phases ouvertes de lecture de plus de 100 acides aminés ont été identifiées. Elles sont regroupées en 17 unités de transcription qui ont toutes la même orientation (fig 4). Les séquences codantes ont été comparées aux séquences présentes dans les banques de données. Seulement 20 % des séquences protéiques déduites du facteur sexuel présentent des homologies significatives. Parmi ces homologies, des gènes codant pour des protéines correspondant à certaines fonctions attendues ont pu être identifiés comme ceux permettant l'agrégation (*cluA*), le transfert d'ADN (*traD*) ou la régulation génétique (*orf47*). D'autres fonctions attendues n'ont pu être identifiées, aucun gène codant pour une protéine potentielle permettant la réplication, l'intégration/excision ou l'inversion du facteur sexuel n'a été identifié. En revanche, des gènes présentant des homologies inattendues ont été découverts : résistance à un métal lourd (tellurium, gènes *telABC*), matu-

rase d'introns mitochondriaux de levure (*matR*).

Le produit du gène *cluA* présente les différents modules qui caractérisent les protéines de surface des bactéries à Gram positif : peptide signal hydrophobe dans la partie N-terminale, hexapeptide conservé servant d'ancrage dans la paroi (LPXTG) (Navarre et Schneewind, 1994), région hydrophobe et

résidus chargés positivement dans la partie C-terminale (fig 5). *CluA* est homologue à deux familles de protéines d'agrégation déjà caractérisées (Godon et al, 1994). La première comprend les protéines d'agrégation liées aux phéromones sexuelles qui sont impliquées dans la conjugaison chez *Enterococcus faecalis* (Clewett, 1993). La seconde comprend les protéines antigéniques des streptocoques oraux qui permettent l'adhésion aux cellules eucaryotes (fig 5). La protéine *CluA* joue un rôle important lors de la conjugaison. Son inactivation entraîne une diminution de 1000 fois de la fréquence de transfert du facteur sexuel (Pillidge et al, 1995).

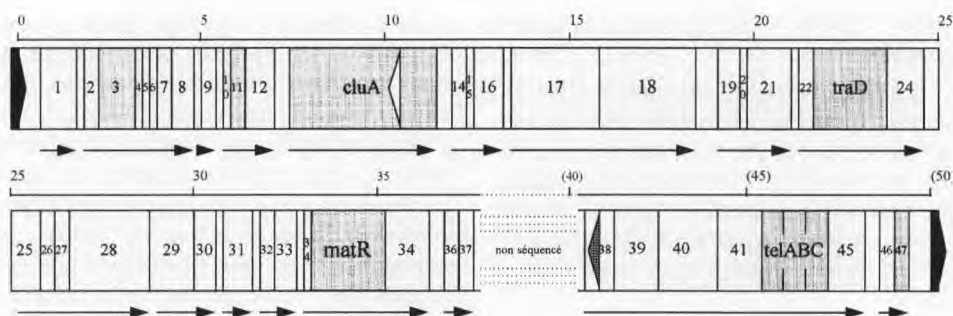
TraD présente de l'homologie avec une famille de protéines plasmidiques : TraK de pSK41 chez *Staphylococcus aureus*, TraD de F chez *E. coli*, TraG de RP4 chez *Pseudomonas* et VirD4 de Ti chez *Agrobacterium tumefaciens* (Frost et al, 1994). Ces protéines jouent un rôle dans le transport de l'ADN, l'exportation se faisant soit vers une bactérie receveuse pour TraK, TraD et TraG soit vers une cellule végétale pour VirD4. Ces homologies, parmi les rares identifiées, permettent de relier le facteur sexuel à d'autres systèmes analogues et d'identifier une fonction qui semble conservée chez les eubactéries (Frost et al, 1994). *MatR* est fortement homologue aux séquences codantes de gènes présents sur certains introns mitochondriaux de levure (groupe II). Les protéines codées par ces gènes, appelées maturases, existent sur l'ARN messager leur propre séquence codante. De tels gènes ont déjà été identifiés chez des bactéries (Ferat et Michel, 1993). Le gène codant pour *MatR* mime un intron inséré au milieu de la phase codante d'*orf34*. L'épissage de la séquence codante de *MatR* se produit sur l'ARN messager du facteur sexuel d'une manière similaire à celle décrite sur l'ARN messager mitochondrial de levure (Shearman et al, 1996).



**Fig 3.** Mobilisation du chromosome par le facteur sexuel. Le nom des clones, CL56-X, la fréquence de transfert et le site d'insertion sont indiqués sur la carte chromosomique de la souche MG1363 (Le Bourgeois et al, 1995). Les positions de *ilvD* et *thyA* sont indiquées en référence. L'unité utilisée pour les fréquences de transfert est le nombre de cellules réceptrices devenues résistantes à l'érythromycine sur le nombre de cellules réceptrices totales. La taille des cercles est proportionnelle à la fréquence, les cercles noirs, gris foncés, gris clairs et blancs correspondent respectivement aux fréquences de transfert de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ .

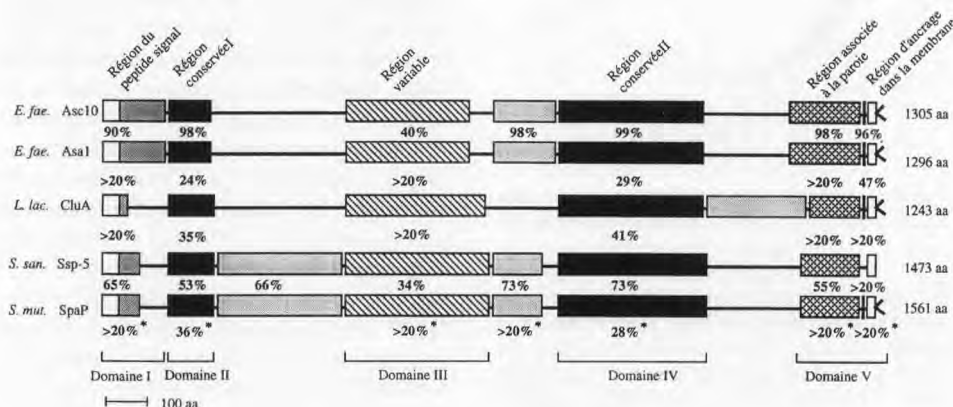
*Sex factor chromosomal mobilisation. Clone names (CL56-x) and insertion sites refer to the chromosomal map of L. lactis strain MG1363 (Le Bourgeois et al, 1995). The frequency of chromosomal transfer (transconjugant cfus/recipient cfus) at each site is indicated, along with the positions of *ilvD* and *thyA* for reference. The size of each circle corresponds to the transfer frequency: black, dark-grey, light-grey and white circle, correspond respectively to  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ .*





**Fig 4.** Carte génétique du facteur sexuel. Les phases ouvertes de lecture sont représentées en gris ; gris clair pour celles qui ne présentent pas d'homologie avec des séquences connues et gris foncé pour les autres. L'échelle en kilobases est donnée sur la ligne supérieure ; les flèches de la ligne inférieure représentent les probables unités de transcription. Les triangles noirs, blancs et hachurés se réfèrent à la figure 1.

*Sex factor genetic map. Grey boxes indicate open reading frames. Dark-grey boxes correspond to open reading frames homologous to known protein sequences. The line at the top indicates scale in kilobases. Arrows on the bottom indicate putative transcriptional units. Black, white and dashed triangles refer to figure 1.*



**Fig 5.** Comparaison des séquences de cinq protéines d'agrégation. Les protéines représentées par des rectangles sont divisées en cinq domaines communs. Les pourcentages correspondent à la comparaison entre chaque domaine des protéines entre lesquelles ils sont placés. La dernière ligne de pourcentage compare la dernière protéine et la première. Les rectangles blancs correspondent à des régions hydrophobes. Les rectangles gris correspondent à des régions assignables à aucun des cinq domaines. La taille des protéines est indiquée à la droite de chacune d'elles. *E fae*, *L lac*, *S san* et *S mut* correspondent respectivement à *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus mutans*.

*Comparison between five aggregation proteins. Each protein is divided into boxed regions. These regions belong to five defined domains, except the light-grey boxed regions which belong to no specified domain. Black boxes correspond to conserved domains in all proteins; white boxes correspond to hydrophobic regions. The amino acid identity percentage is indicated between each domain. The value below the SpaP protein (\*) indicates the percentage identity between this and the Asc10 protein.*

Trois mécanismes de résistance au tellurium ont été caractérisés sur de grands plasmides conjuguatifs de bactéries à Gram négatif. L'homologie entre leurs protéines est faible (Walter et Taylor, 1992). En revanche, il existe une homologie au niveau organisation des gènes et séquence protéique entre le mécanisme de résistance porté par le plasmide pMER610 isolé d'*Alcaligenes* sp (Jobling et Ritchie, 1988) et des gènes du facteur sexuel de *L. lactis*.

Les gènes dupliqués, *terD* et *terE* de pMER610, présentent entre eux une homologie de 65%. Les gènes homologues du facteur sexuel sont présents en trois copies contiguës : *telA*, *telB* et *telC*. Leur homologie au niveau protéique varie de 36 à 44 % entre eux et de 38 à 55 % avec *terD* ou *terE*. Les gènes *telABC* sont suivis par un gène codant pour une protéine hydrophobe probablement membranaire alors que les gènes *telDE* sont précédés par un gène codant pour une protéine de même taille présentant les mêmes caractéristiques, bien que non homologue. La fonction de ces gènes reste inconnue car *L. lactis* est résistant à de fortes concentrations de tellurium, indépendamment de la présence du facteur sexuel.

## TRANSFERT PAR CONJUGAISON

Le facteur sexuel ne portant aucune résistance sélectionnable, son évolution dans une population n'était pas facilement mesurable. Nous avons donc remplacé le gène *telC* par un gène de résistance à la tétracycline (Pillidge et al, 1995).

Contrairement à d'autres éléments conjuguatifs le spectre d'hôte du facteur sexuel est très étroit. En effet, le facteur sexuel issu de *L. lactis* ssp *cremoris* 712 se transfère seulement vers les deux sous-espèces de *L. lactis* ssp *lactis* et *L. lactis* ssp *cremoris*. Les tentatives pour transférer cet élément vers *L. garviae*, *L. raffinolactis*, *Streptococ-*

*cus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis* et *E. coli* ont été infructueuses (Pillidge et al, 1995).

Le facteur sexuel s'autotransfère à une fréquence assez élevée. Sur boîte de Pétri, quand les souches réceptrices dépourvues du facteur sexuel et les souches donneuses sont isogéniques, une réceptrice sur 50 reçoit le facteur sexuel (Pillidge et al, 1995). En revanche, lorsque la souche réceptrice possède déjà un facteur sexuel, la fréquence de transfert est réduite d'environ dix fois. Les transferts entre souches non isogéniques ou entre les deux sous-espèces *lactis* et *cremoris* sont proches de  $10^{-3}$ .

La capacité du facteur sexuel à transférer le chromosome par mobilisation a été mesurée grâce à une collection de souches dérivées de MG1363 utilisées pour la cartographie du chromosome de *L. lactis* ssp *cremoris* (Le Bourgeois et al, 1995). Ces souches portent un marqueur de résistance à l'érythromycine inséré à différents emplacements sur le chromosome. Selon l'emplacement du marqueur  $10^{-5}$  à  $10^{-9}$  des clones receveurs subissent un transfert chromosomique (fig 3). Un effet polaire aux bornes du facteur sexuel est clairement visible (fig 3). Le transfert du chromosome vers des souches appartenant à la sous-espèce *lactis* est aussi possible à des fréquences comparables (Pillidge et al, 1995). D'autre part, une souche de *L. lactis* ssp *lactis* IL1403 qui a acquis le facteur sexuel devient capable de transférer son chromosome à une souche isogénique toujours aux mêmes fréquences (Pillidge et al, 1995).

## CONCLUSION

L'étude de ce facteur sexuel a permis de mettre en évidence l'existence d'un flux d'information génétique au sein des populations de lactocoques laitiers. Cependant, les mesures en laboratoire ne reflètent probablement pas la mesure de ce flux au sein

d'un levain pendant de nombreuses générations dans des états physiologiques différents.

La conjugaison est un mécanisme naturel pour les transferts d'ADN ; une meilleure connaissance de ces mécanismes devrait permettre leur maîtrise et leur utilisation. De plus, les organismes construits ou modifiés par ce procédé naturel ne sont pas soumis à la législation contraignante qui régit l'utilisation des organismes génétiquement modifiés à des fins industrielles.

Le facteur sexuel ne peut être classé parmi les éléments génétiques mobiles déjà connus. Cet élément semble être un patchwork de différents éléments. Son mécanisme d'intégration/excision rappelle celui des phages lambdaïdes mais son existence sous les formes circulaires et intégrées et son mode de transfert le rapprochent des transposons conjuguatifs de bactéries à Gram positif (Clewell et Planagan, 1994) et des plasmides intégratifs des Streptomyces (Hopwood et Kieser, 1994). Des homologies de séquence existent avec divers plasmides conjuguatifs (résistance au tellurium), avec différents mécanismes d'exportation d'ADN ou avec les plasmides conjuguatifs dont le transfert est induit par des phéromones chez *E. faecalis*. Il est encore trop tôt pour savoir si cet élément original est un membre d'une nouvelle famille d'éléments génétiques ou seulement l'unique fruit du bricolage moléculaire des lactocoques.

## REMERCIEMENTS

Le travail décrit a été financé en partie par le contrat Bridge-Biot-CT91-0263 du «Biotechnology Action Programme» de la «Commission of the European Communities». JJ Godon a bénéficié d'un financement conjoint de l'Inra et du BBRSC et CJ Pillidge d'un financement de la «Foundation for Research Science and Technology» de Nouvelle Zélande.

## RÉFÉRENCES

- Anderson DG, McKay LL (1984) Genetic and physical characterization of recombinant plasmids associated with cell aggregation and high frequency conjugal transfer in *Streptococcus lactis* ML3. *J Bacteriol* 158, 954-962
- Clewell DB (1993) Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73, 9-12
- Clewell DB, Planagan BE (1994) The conjugative transposons of Gram-positive bacteria. In: *Bacterial conjugation* (DB Clewell, ed). Plenum Press, New York, 369-393
- Ferat JC, Michel M (1993) Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* 364, 358-361
- Frost LS, Ippen-Ihler K, Skurray RA (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev* 58, 162-210
- Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154, 1-9
- Gasson MJ, Davies PL (1980). High frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J Bacteriol* 143, 1260-1264
- Gasson MJ, Swindell SB, Maeda B, Dodd BM (1992) Molecular rearrangement of lactose plasmid DNA associated with high-frequency transfer and cell aggregation in *Lactococcus lactis* 712. *Mol Microbiol* 6, 3213-3223
- Godon JJ, Delorme C, Ehrlich SD, Renault P (1992) Divergence of genomic sequences between *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 58, 4045-4047
- Godon JJ, Jury K, Shearman CA, Gasson MJ (1994) The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Mol Microbiol* 12, 655-663
- Godon JJ, Pillidge CJ, Jury K, Shearman CA, Gasson MJ (1995) Molecular analysis of the *Lactococcus lactis* sex factor. In: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci* (Ferretti JJ, Gilmore MS, Klaenhammer TJ, Brown F, eds). Dev Biol Stand, Karger, Basel
- Hopwood DA, Kieser T (1994) Conjugative plasmids of *Streptomyces*. In: *Bacterial conjugation*. (DB Clewell, ed) Plenum Press, New York, 293-311
- Jobling MG, Ritchie DA (1988) The nucleotide sequence of a plasmid determinant for resistance to tellurium anions. *Gene* 66, 245-258
- Le Bourgeois P, Lautier M, van den Berghe L, Gasson MJ, Ritzenthaler P (1995) Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus*



- lactis* subsp *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion. *J Bacteriol* 177, 2840-2850
- Navarre WW, Schneewind O (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14, 115-121
- Pillidge CJ, Godon JJ, Le Bourgeois P, Jury K, Gasson MJ (1995) Conjugal transfer of the sex factor in *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* 712 and associated chromosomal mobilization. *J Bacteriol* (Soumis pour publication)
- Shearman CA, Godon JJ, Gasson MJ (1996) Splicing of a group II intron in a functional transfer gene of *Lactococcus lactis*. (Soumis)
- Walsh PM, McKay LL (1981) Recombinant plasmid associated with cell aggregation and high frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. *J Bacteriol* 146, 937-944
- Walter EG, Taylor DE (1992) Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid* 27, 52-64