

## Génétique – Cartes chromosomiques

# Cartographie génomique de quelques souches de laboratoire de *Lactococcus lactis*

P Le Bourgeois, M Lautier, M Mata, P Ritzenthaler

Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire, CNRS,  
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

**Résumé** — Nous avons entrepris la construction d'une carte physique et génétique du génome des deux souches de *Lactococcus lactis* les plus étudiées au niveau moléculaire : les souches IL1403 et MG1363. Les fragments de restriction *NotI*, *Apal* et *SmaI* ont été ordonnés grâce à l'emploi du plasmide intégratif pRL1 combiné à des expériences de marquage terminal indirect; 27 marqueurs chromosomiques ont été localisés par des expériences d'hybridation avec des sondes homologues ou hétérologues, et dans certains cas leur position précise et leur orientation ont été déterminées à l'aide du plasmide intégratif pRC1. Six opérons ribosomiques ont été détectés dans le chromosome de la souche IL1403 : 5 sont regroupés dans 16% du chromosome et sont transcrits dans la même direction. Chez la souche IL1403, au moins 7 copies de la séquence d'insertion IS1076 ont été localisées alors qu'aucune copie de l'ISS1RS n'a été mise en évidence. Une comparaison des cartes physiques des souches *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 et DL11 montre que ces 2 souches sont étroitement reliées et que les régions variables sont localisées principalement à proximité et entre les opérons ribosomiques. Bien que les cartes physiques de *L. lactis* MG1363 et IL1403 diffèrent sensiblement, l'organisation génétique globale du génome semble conservée entre les 2 souches.

***Lactococcus lactis* / cartographie génomique / plasticité génomique / plasmide intégratif / électrophorèse en champs pulsés**

**Summary** — **Chromosome mapping of some laboratory *Lactococcus lactis* strains.** A combined physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 was established. The restriction map was constructed for the *NotI*, *Apal* and *SmaI* enzymes. The restriction fragments were ordered by using the random-integrative plasmid pRL1 and by indirect end-labeling experiments. The IL1403 chromosome was found to be circular and 2 420 kb in size. Twenty-seven chromosomal markers were mapped on the chromosome by hybridization experiments with gene probes of *Lactococcus lactis* and of various other bacteria. Integration of pRC1-derived plasmids via homologous recombination allowed a more precise location of some lactococcal genes as well as the determination of their orientation on the chromosome. Recurrent sequences such as IS elements and rRNA gene (*rrn*) clusters were also mapped. At least 7 copies of the IS1076 sequences were present and were located in 50% of the chromosome. In contrast, no copy of ISS1RS could be detected. Six ribosomal operons were found on the IL1403 chromosome; 5 were located within 16% of the chromosome and transcribed in the same direction. A comparison of the physical maps of *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 and DL11 strains showed that these 2 strains are closely related and that the variable regions are located mainly near the *rrn* gene clusters. In contrast, despite major restriction pattern dissimilarities between *L. lactis* IL1403 and MG1363, the overall genetic organization of the genome seems to be conserved between these 2 strains.

***Lactococcus lactis* / genome mapping / chromosome evolution / integration plasmid / pulsed-field gel electrophoresis**

## INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, ce sont surtout les nombreux plasmides des lactocoques qui ont retenu l'attention des généticiens. Cet intérêt pour les plasmides peut facilement s'expliquer : d'une part les techniques d'analyse de ces plasmides étaient disponibles et d'autre part ces plasmides sont impliqués dans des propriétés technologiques importantes comme la protéolyse, la production d'acide lactique, ou la résistance aux phages.

En effet, comme pour la plupart des bactéries, l'étude des chromosomes des lactocoques était inaccessible par les systèmes de cartographie génétique classiques tels que la conjugaison interrompue ou la transduction, systèmes qui ont permis de construire des cartes génétiques très élaborées uniquement chez *E coli* (Bachmann, 1990) ou *B subtilis* (Piggot, 1990). Les seules données physiques sur ce chromosome ont été obtenues par l'étude des cinétiques de réassociation ADN-ADN qui permettaient d'estimer la taille du chromosome des lactocoques entre 2,5 et 2,9 Mb (Jarvis et Jarvis, 1981). La composition globale en bases de ce chromosome était aussi connue, avec un pourcentage en G+C situé autour de 34–38% (Sandine *et al*, 1972).

Les choses ont très rapidement évolué au cours des 5 dernières années : l'étude physique des génomes bactériens est devenue possible grâce au développement de la technique d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) (Schwartz et Cantor, 1984). En 1989, nous avons montré que la taille de différentes souches de *L lactis* se situait entre 2,3 et 2,6 Mb (Le Bourgeois *et al*, 1989), cette estimation étant basée sur l'évaluation de la taille des fragments de restriction chromosomiques séparés par électrophorèse en champs pulsés. L'analyse des profils de restriction

par PFGE permet aussi d'identifier simplement une souche de lactocoque, de réaliser son empreinte génétique et de suivre son évolution. En comparant les profils de restriction réalisés à l'enzyme *Sma*I et en estimant le pourcentage des fragments qui comigraient, nous avons aussi pu classer les différentes souches de *L lactis* analysées en plusieurs groupes génétiques à l'intérieur de l'espèce *Lactococcus lactis* (Le Bourgeois *et al*, 1991).

La suite logique de ce travail a été la construction d'une carte physique et génétique d'un chromosome de lactocoque. Se posait tout d'abord le problème du choix de la souche pour réaliser cette carte. Plutôt que de prendre une souche anonyme, nous avons décidé de nous focaliser sur les 3 souches les plus couramment utilisées par les généticiens des lactocoques. Ces souches sont débarrassées de leurs plasmides et certaines de leurs prophages. Il s'agit de la souche IL1403 (Chopin *et al*, 1984), dérivée d'une souche CNRZ, la souche MG1363 (Gasson, 1983), dérivée de la souche NCDO712, et la souche LM2301 (McKay *et al*, 1976, 1980), dérivée de la souche NCDO2031. Les souches MG1363 et LM2301 sont isogéniques (Le Bourgeois *et al*, 1991) : la principale différence entre les 2 souches est une délétion de 60 kb chez la souche LM2301, correspondant probablement à la perte du facteur conjugatif chromosomique *clu*.

## RÉSULTATS

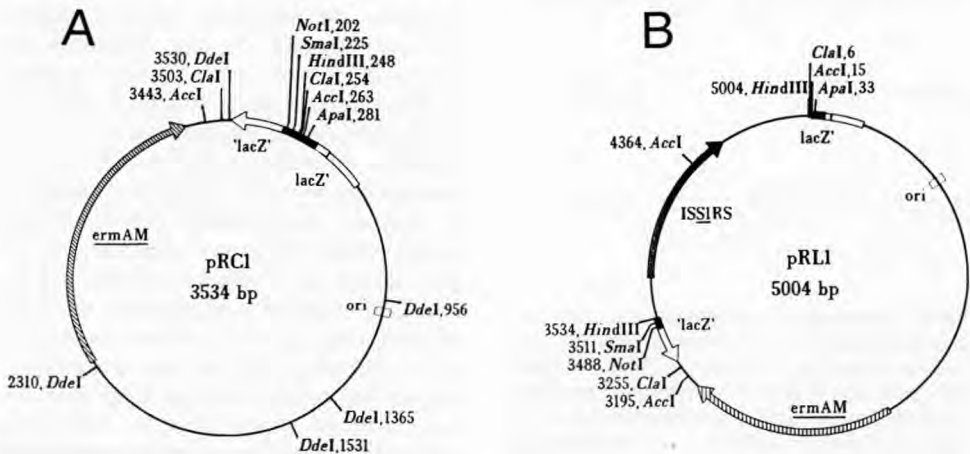
Pour construire une carte physique, la première étape consiste à trouver des enzymes qui génèrent une collection de 5 à 10 fragments facilement séparables par PFGE. La stratégie classique pour ordonner ensuite les fragments de restriction consiste souvent à isoler chaque fragment de restriction du gel, puis à les utiliser

comme sonde pour hybrider avec des profils de restriction différents, ou bien isoler les fragments de restriction, les digérer par une deuxième enzyme et séparer les fragments résultants par PFGE.

Dans le cas des souches que nous voulions étudier, la distribution des sites de restriction rares sur le chromosome était particulièrement mal adaptée : les enzymes testées coupaient le chromosome, soit trop peu souvent comme *SfiI* ou *NotI*, soit trop souvent comme *ApaI* ou *SmaI* (23 et 31 fragments). N'étant pas dans une situation très favorable pour entreprendre la construction de cette carte, nous avons donc été amenés à développer des outils génétiques pour faciliter cette construction (Le Bourgeois *et al*, 1992a). Le vecteur de base qui a servi à élaborer ces outils est le plasmide pRC1 (fig 1A), dérivé du plasmide pBluescriptIIKS. Il possède une origine de répllication fonctionnelle dans *E coli* mais il n'est pas répliatif chez les lactocoques. Il contient le gène de résistance à l'érythromycine (*ermAM*) qui s'exprime aussi bien chez *E coli* que chez les bactéries à Gram positif, et un site de clonage multiple dans le gène *lacZ* comprenant les

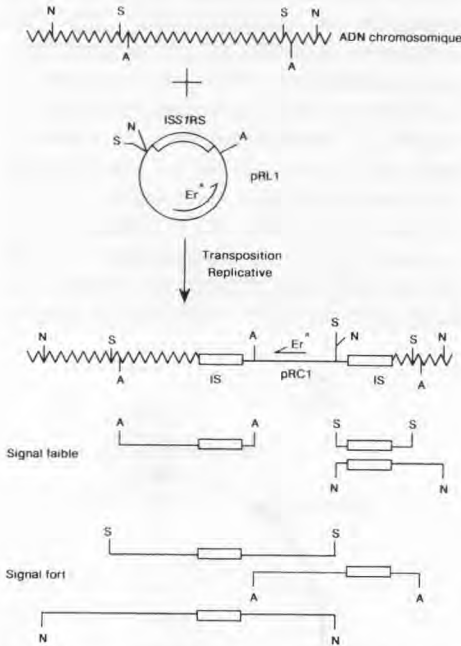
sites de restriction rares *NotI*, *ApaI* et *SmaI*.

Comme la distribution des sites de restriction sur le chromosome n'était pas très favorable, on souhaitait disposer d'un outil qui nous permettrait d'introduire de façon aléatoire dans le chromosome des sites de restriction rares. Le clonage dans le plasmide pRC1 d'une séquence d'insertion fonctionnelle chez les lactocoques pouvait aboutir à ce type d'outil. Notre choix s'est porté sur la séquence d'insertion ISS1RS, isolée par l'équipe de l'Université de Caen (Huang *et al*, 1992) et apparentée à la séquence d'insertion ISS1 (Polzin et Shimizu-Kadota, 1987). Le clonage de cette séquence dans le plasmide pRC1 a donné naissance au plasmide pRL1 (fig 1B). Lorsque ce plasmide est introduit par électropériméabilisation dans une souche de *Lactococcus lactis*, des transformants résistants à l'érythromycine sont obtenus, bien que ce plasmide ne soit pas répliatif chez les lactocoques. Nous avons pu montrer que le plasmide pRL1 s'intégrait dans le chromosome *via* transposition répliative de l'ISS1. Cette intégration conduit à la duplication de l'ISS1 encadrant le vecteur



**Fig 1.** Carte de restriction des plasmides pRC1 (A) et pRL1 (B). La région en noir correspond au site de clonage multiple du plasmide pBluescript II KS.

pRC1 (fig 2) et à l'insertion d'un site de restriction *NotI*, *ApaI* et *SmaI* additionnel. Ce type d'intégration a pu être démontré par hybridation des profils de restriction en utilisant le plasmide pRL1 comme sonde. Le fragment de restriction dans lequel s'est intégré pRL1 disparaît et est remplacé par 2 fragments plus petits; la somme de la taille de ces 2 fragments est toujours légèrement supérieure à celle du fragment original à cause de la présence du plasmide pRL1 (5 kb) sur un fragment, et d'une copie supplémentaire de la séquence ISS1 (0,8 kb) sur l'autre fragment. Du fait de la distribution asymétrique des sites *ApaI*, *SmaI* et *NotI* sur le plasmide

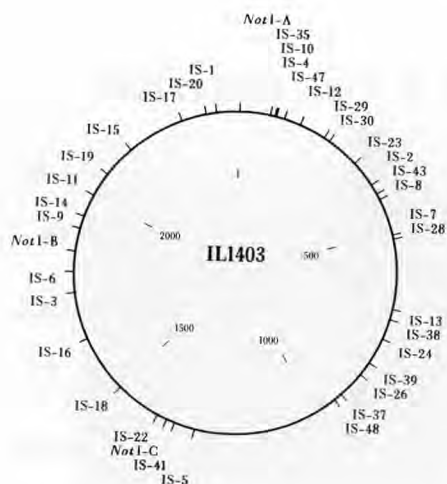


**Fig 2.** Représentation schématique de l'intégration du plasmide pRL1. Abréviations: IS : séquence d'insertion; A : *ApaI*; S : *SmaI*; N : *NotI*; Er<sup>R</sup>, gène de résistance à l'érythromycine (gène *ermAM*). Les rectangles correspondent à la séquence d'insertion ISS1RS. Les fragments de restriction donnant un signal fort ou faible après hybridation avec le plasmide pRL1 sont indiqués.

pRL1, le fragment contenant le plasmide pRL1 donne toujours un signal plus fort que celui qui ne contient que la séquence ISS1. Cette différence d'intensité permet le positionnement sans ambiguïté des sites de restriction les plus proches du site d'intégration.

L'intégration du plasmide pRL1 en un point précis du chromosome va aussi nous permettre d'ordonner les fragments de restriction les uns par rapport aux autres par la technique du marquage terminal indirect (Canard et Cole, 1989). L'ADN chromosomique d'un intégrant est d'abord totalement digéré par l'enzyme *NotI*, puis soumis à une digestion partielle à l'enzyme *ApaI* ou *SmaI* et les fragments séparés par PFGE sont hybridés avec la sonde pRC1. Des fragments de taille croissante correspondant à l'enchaînement des différents fragments *ApaI* ou *SmaI* sont mis en évidence et, de leur taille, il est facile de déduire l'ordre des différents fragments de restriction.

Parmi les nombreux clones résistants à l'érythromycine obtenus lors d'une seule expérience d'électroporation avec le plasmide pRL1, 35 intégrations ont été localisées sur le chromosome, et des expériences de marquage terminal indirect sur une vingtaine de ces intégrants ont permis la construction de la carte physique du chromosome de la souche IL1403. La localisation des 35 intégrations sur la carte physique du chromosome montre qu'elles semblent à peu près également réparties le long du chromosome (fig 3). Il faut quand même noter qu'il subsiste une région de 400 kb où aucune insertion n'a eu lieu. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour savoir s'il existe des régions où la séquence ISS1 se transposerait de façon préférentielle et pour déterminer les raisons de ce phénomène. En dehors de son utilité pour la cartographie physique du chromosome, le plasmide pRL1 peut aussi être employé pour réaliser des expé-



**Fig 3.** Localisation chromosomique des sites d'intégration du plasmide pRL1.

riences de mutagenèse par insertion; le gène inactivé pourra aussi être facilement localisé sur la carte physique. Dans certains cas, il peut aussi servir à cloner dans *E coli* les séquences adjacentes au site d'insertion.

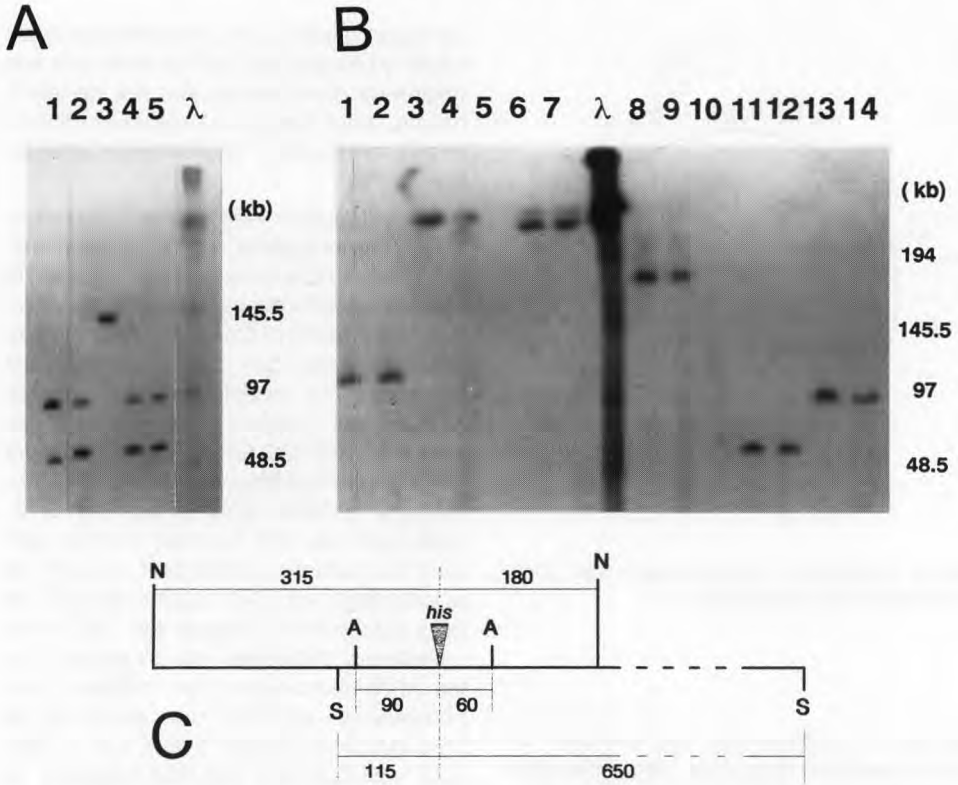
Après avoir construit la carte physique de la souche IL1403, nous avons établi une carte génétique afin de préciser l'agencement des gènes sur le chromosome de cette souche.

Les systèmes cellulaires au fonctionnement conservé pendant l'évolution constituent des cibles de choix pour l'établissement des cartes génétiques. Les plus évidents sont les gènes impliqués dans l'assemblage et le fonctionnement des ribosomes, ainsi que l'origine et la terminaison de la réplication. Comme l'origine de réplication et les opérons ribosomiques semblent avoir de réelles contraintes de position génomique, ils peuvent probablement servir à définir l'ossature du génome.

De façon générale, on pourrait alors envisager qu'un génome soit «normé» par son origine de réplication et son site de terminaison, ainsi que par sa signature ribosomique, en nombre, localisation et orientation.

La localisation des opérons ribosomiques a été entreprise sur ce chromosome. Un opéron ribosomique d'une souche de lactocoque avait été caractérisé précédemment (Beresford et Condon, 1991) et cette étude a montré que son organisation est semblable au modèle général proposé pour les eubactéries, à savoir l'ordre des gènes 5' 16S-23S-5S 3', et qu'il contient des sites de restriction rares pour un chromosome à faible pourcentage en G+C. Cela n'est pas très étonnant car les opérons ribosomiques possèdent souvent un pourcentage en G+C assez éloigné de celui du génome puisque les très fortes contraintes évolutives qui s'exercent sur les ARN ribosomiques ont maintenu leur pourcentage en G+C aux alentours de 55% (Muto et Osawa, 1987). Les 6 opérons ribosomiques ont été localisés et orientés sur le chromosome par hybridation avec une sonde spécifique de l'extrémité 5' du gène 16S et de l'extrémité 3' du gène 23S. Cinq de ces opérons sont regroupés sur 15% du chromosome (entre les position 23 et 38, fig 4) et sont transcrits dans la même direction, alors que le sixième (localisé près de la position 0) est transcrit en sens inverse. La localisation et le sens de transcription de ces opérons peuvent aussi nous donner des informations quant à la position de l'origine de réplication du chromosome : celle-ci est en général positionnée à la divergence transcriptionnelle de ces opérons (Bachmann, 1990; Ziegler et Dean, 1990).

Nous avons aussi entrepris de localiser sur ce chromosome les séquences d'insertion connues chez *Lactococcus lactis*. Nous avons à notre disposition 2 des 3 séquences d'insertion connues chez cette



**Fig 4.** Localisation de l'opéron *his* sur la carte physique du chromosome de la souche IL1403 après intégration par recombinaison homologue, et analyse par PFGE. Le fragment *his* est cloné dans le plasmide pRC1 dans un sens (plasmide pA) ou dans l'autre (plasmide pB). **A.** Hybridation de l'ADN chromosomique avec la sonde *his*, après digestion par *Apal*. Pistes 1 et 2 : clones IL1403::pA; piste 3 : souche parentale IL1403; pistes 4 et 5 : clones IL1403::pB. **B.** Hybridation de l'ADN chromosomique avec la sonde pRC1. Pistes 1 et 2 : clones IL1403::pA digérés par *SmaI*; pistes 3 et 4 : clones IL1403::pB digérés par *SmaI*; piste 5 : IL1403 digérée par *SmaI*; pistes 6 et 7 : clones IL1403::pA digérés par *NotI*; pistes 8 et 9, clones IL1403::pB digérés par *NotI*; piste 10 : IL1403 digérée par *NotI*; pistes 11 et 12 : clones IL1403::pA digérés par *Apal*; pistes 13 et 14 : clones IL1403::pB digérés par *Apal*.  $\lambda$ , multimères d'ADN de lambda utilisés comme marqueur de taille. **C.** Carte physique de la région *his*.

bactérie : ISS1RS et IS1076 (Huang *et al*, 1991), apparentée à IS904 (Dodd *et al*, 1990). La localisation de ces IS sur le chromosome bactérien est un facteur important pour la compréhension de la dynamique du génome puisqu'il a été démontré chez *E coli* que ces IS peuvent constituer

les sites d'intégration du facteur F et peuvent être responsables de réarrangements chromosomiques comme de grandes inversions. Contrairement à d'autres observations (Schäfer *et al*, 1991), nous n'avons pas trouvé de copies d'ISS1 dans le chromosome de la souche IL1403. Par contre,

**Tableau I.** Gènes localisés sur la carte chromosomique de la souche IL1403.

Gène	Origine	Référence
<i>Séquences récurrentes</i>		
16S- <i>rna</i>	<i>C perfringens</i>	Garnier <i>et al</i> (1991)
23S- <i>rml</i>	<i>C perfringens</i>	Canard (1992, non publié)
ISS 1RS	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> Z270	Huang <i>et al</i> (1992)
IS 1076	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> Z270	Huang <i>et al</i> (1991)
<i>Gènes homologues</i>		
<i>hisB</i> , <i>ORF8</i> , <i>HisHAF</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Delorme <i>et al</i> (1992)
<i>ilvD</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Godon <i>et al</i> (1992)
<i>lap</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>cremoris</i> Wg2	Stroman (1992)
<i>mleR</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Renault <i>et al</i> (1989)
<i>pepC</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>cremoris</i> AM2	Chapot-Chartier <i>et al</i> (1993)
<i>pepXP</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCDO763	Nardi <i>et al</i> (1991)
<i>recA</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Duwat <i>et al</i> (1992)
<i>thyA</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> MG1363	Ross <i>et al</i> (1990)
<i>trpC</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Bardowski <i>et al</i> (1992)
<i>trxB</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Renault (1992, non publié)
<i>uvrC</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	Godon (1992)
<i>usp45</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i> MG1363	van Asseldonk <i>et al</i> (1990)
<i>Gènes hétérologues</i>		
<i>rpoA</i>	<i>B subtilis</i>	Suh <i>et al</i> (1986)
<i>rpoD</i>	<i>B subtilis</i>	Price <i>et al</i> (1983)
<i>tag-3</i> , <i>gtaD1</i> , <i>gtaA12</i>	<i>B subtilis</i>	Mauël <i>et al</i> (1989)
<i>uncD</i>	<i>E coli</i>	von Meyerburg et Hansen (1980)
<i>groE</i>	<i>E coli</i>	Canard et Cole (1989)
<i>rpsL</i>	<i>E coli</i>	Canard et Cole (1989)
<i>gyrA</i>	<i>C perfringens</i>	Canard et Cole (1989)
<i>rec-like</i>	<i>S salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>	Slos et Mercenier (1992, non publié)
<i>ung</i>	<i>S pneumoniae</i>	Méjean <i>et al</i> (1991)
<i>ami</i>	<i>S pneumoniae</i>	Alloing <i>et al</i> (1990)
<i>hexA</i> , <i>hexB</i>	<i>S pneumoniae</i>	Prudhomme <i>et al</i> (1991)

au moins 7 copies de l'IS1076 ont été localisées sur ce chromosome. Il est remarquable de noter que ces IS ne sont pas réparties de façon uniforme, mais sont regroupées dans 50% du chromosome.

Douze gènes chromosomiques bien caractérisés de *L lactis* (tableau I) ont été localisés sur le chromosome par des expériences classiques d'hybridation à stringence élevée. Cependant cette techni-

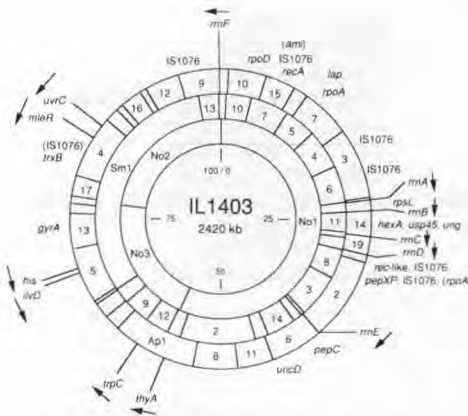
que n'autorise qu'une localisation approximative de ces gènes sur un fragment de restriction donné. Pour 6 d'entre eux (tableau I), la position précise sur la carte physique et leur orientation ont été déterminées grâce à une méthode qui emploie le plasmide vecteur pRC1. En effet, lorsque le gène à localiser est cloné dans le plasmide pRC1 et lorsque ce plasmide recombinant est introduit dans un lactoco-

que, ce plasmide s'intègre par recombinaison homologue dans le gène à localiser, et des sites *NotI*, *SmaI* et *Apal* sont introduits à proximité immédiate de ce gène. L'analyse des profils de restriction des transformants après hybridation avec le plasmide pRC1 permet de localiser très précisément ce gène sur la carte physique.

Par exemple, dans le cas de l'opéron *his*, les expériences d'hybridation nous avaient montré que cet opéron était présent sur un fragment *Apal* de 150 kb (fig 5A piste 3), *SmaI* de 765 kb et *NotI* de 495 kb. Vu l'agencement des fragments de restriction sur la carte, la position de cet opéron était imprécise à 145 kb près, puisqu'il pouvait se trouver n'importe où sur ce fragment *Apal*. Un fragment de cet opéron a été cloné dans le plasmide pRC1 dans les 2 orientations possibles, puis chaque plasmide recombinant a été introduit par

électroperméabilisation dans la souche IL1403. Des clones résistant à l'érythromycine ont été sélectionnés, et leur ADN chromosomique a été analysé par hybridation, après digestion à *Apal*, *SmaI* et *NotI*, et électrophorèse en champs pulsés. Comme on pouvait s'y attendre, le fragment *Apal* de 150 kb disparaît et est remplacé par deux nouveaux fragments de 90 et 60 kb hybridant avec la sonde *his* (fig 5A). De même le fragment *NotI* de 495 kb est converti en 2 fragments de 315 et 180 kb et le fragment *SmaI* de 765 kb en 2 fragments de 650 et 115 kb. La position relative des sites *Apal*, *SmaI* et *NotI* adjacents au site d'intégration a été déterminée par hybridation des profils de restriction en utilisant comme sonde le plasmide pRC1. En effet l'intégration selon le mécanisme de Campbell (simple *crossing-over*) conduit à une duplication du fragment homologue, encadrant l'ADN plasmidique. De par la distribution asymétrique des sites *Apal*, *SmaI* et *NotI*, seul un des deux nouveaux fragments hybridera avec la sonde pRC1. Ainsi, pour une orientation donnée du fragment *his* dans pRC1, les fragments possédant une homologie avec la sonde sont soit les fragments *Apal* de 60 kb, *SmaI* de 115 kb et *NotI* de 315 kb, soit les fragments *Apal* de 90 kb, *SmaI* de 650 kb et *NotI* de 180 kb (fig 5B). Ces résultats permettent donc une localisation très précise de l'opéron *his* par rapport à la carte physique du chromosome (fig 5C). Ont été localisés par cette technique les gènes suivants : le gène *mleR* (Renault *et al*, 1989, résultats non publiés), le gène *thyA* (Ross *et al*, 1990), ceux de l'opéron *his* (Delorme *et al*, 1992), de l'opéron *trp* (Bardowski *et al*, 1992), de l'opéron *ilv* (Godon *et al*, 1992), et le gène *uvrC* (Godon *et al*, 1992). On remarquera que les gènes de biosynthèse des acides aminés ne sont pas regroupés en un endroit unique sur le chromosome.

Puisque peu de gènes homologues étaient disponibles, des gènes hétérolo-



**Fig 5.** Carte physique et génétique du chromosome de la souche *L lactis subsp lactis* IL1403. Abréviations : Ap : *Apal*; Sm : *SmaI*; No : *NotI*. L'échelle de taille est indiquée en pourcentage de la taille totale du chromosome. Les flèches indiquent l'orientation 5'-3' des gènes. Les parenthèses indiquent les gènes hybridant faiblement avec le chromosome. L'ordre des fragments de restriction ainsi que leur taille respective sont décrits ailleurs (Le Bourgeois *et al*, 1992b)

gues d'autres espèces bactériennes ont été utilisés comme sonde dans des expériences d'hybridation, mais cette fois-ci à faible stringence (tableau I). Ce type d'expériences ne permet de détecter que des séquences homologues et ne permet pas de prouver que les séquences qui hybrident avec la sonde hétérologue codent pour la même fonction que cette dernière. Nous avons cependant pris quelques précautions dans le choix des gènes pour que la séquence nucléotidique des sondes hétérologues soit le plus proche possible de celle des gènes des lactocoques. Les gènes testés retenus sont en général des gènes codant pour des fonctions fortement conservées au cours de l'évolution comme les gènes spécifiant certaines sous-unités de l'ARN polymérase (*rpoA* et *rpoD*) ou une protéine structurale des ribosomes (*rpsL*), les gènes impliqués dans la topologie de l'ADN (*gyrA*), dans la réparation des mésappariements (*hex* et *ung*) ou dans le transport des oligopeptides (*ami*). Les gènes ont aussi été choisis préférentiellement chez des bactéries qui ont un faible pourcentage en G+C comme *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens* ou *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. Une douzaine de gènes hétérologues ont ainsi pu être placés sur la carte physique.

## DISCUSSION

À notre connaissance, la carte génétique de la souche IL1403 est la première carte génétique publiée d'une souche de *Lactococcus lactis*. La carte génomique établie, il est maintenant particulièrement simple de localiser très précisément tout nouveau marqueur cloné dans le plasmide pRC1. Il serait souhaitable que tous les généticiens des lactocoques contribuent à la compléter et à la maintenir à jour.

Une telle carte est déjà intéressante en soi, mais elle présente encore beaucoup

plus d'intérêt quand on peut la comparer à d'autres cartes physiques ou génétiques de souches de la même espèce ou d'autres espèces. Cette étude comparative permettra d'avoir une idée de la diversité génomique au niveau intra- ou interspécifique. Récemment, une équipe australienne (Tulloch *et al*, 1991) a construit une carte physique d'une autre souche de *L. lactis* subsp *lactis*, la souche DL11 (LeBlanc *et al*, 1979) qui est une dérivée protéase- de la souche ATCC11454. Cette dernière présente la particularité d'utiliser le saccharose comme source de carbone et est productrice de nisine, mais quasiment aucune étude génétique n'a été réalisée sur cette souche et elle provient d'une autre collection que la souche IL1403. La comparaison des cartes de restriction *NotI* et *SmaI* a été possible entre ces 2 souches. À notre grande surprise, en alignant les cartes de ces deux souches d'origine différente, une bonne correspondance entre la position des sites *SmaI* a pu être observée sur environ 60% du chromosome, à l'exception du fragment *SmaI*-F de la souche DL11 qui est remplacé par les fragments *SmaI*-9 et *SmaI*-12 de la souche IL1403. Cela pourrait résulter de l'insertion dans la souche IL1403 d'un élément génétique de 60 kb possédant un site *SmaI*.

Les 40% restant du chromosome qui contiennent les 6 opérons ribosomiques, sont sujets à des variations importantes aussi bien au niveau de la taille des fragments que du nombre de sites de restriction. En effet, dans ces 2 souches la disposition des opérons ribosomiques semble très conservée mais les distances entre ces opérons ne sont pas constantes : la distance entre *rrmF* et *rrmA* est plus courte de 50 kb chez la souche DL11 alors que l'inverse est vrai pour la distance entre *rrmB* et *rrmC* (plus grand de 50 kb). Par contre, *rrmD* et *rrmE* sont à peu près à égale distance dans les deux souches. Un polymorphisme de restriction très pronon-

cé est donc observé dans les régions ribosomiques et seuls sont conservés les fragments *Smal* proches de ces opérons. Comme les loci *rrm* sont répétés dans le génome, ils pourraient servir de sites pour des recombinaisons homologues intrachromosomiques, donnant naissance à des duplications, délétions ou inversions (Harvey et Hill, 1990). Ces observations suggèrent aussi que la diversification génomique chez les lactocoques pourrait se faire en partie par échanges de modules entre les opérons ribosomiques. Par exemple, on pourrait imaginer que, lors d'un transfert de gènes horizontal par conjugaison intra ou inter-espèces, il puisse se produire des échanges de modules par recombinaison homologue entre les opérons ribosomiques de l'ADN de la souche donneuse et de la souche réceptrice.

Nous avons aussi entrepris de cartographier le génome de la souche *L. lactis* MG1363 (Le Bourgeois *et al*, 1992b). Cette carte n'est pas encore complète mais il est cependant déjà possible de comparer les 2 cartes des souches IL1403 et MG1363 sur une distance d'environ 1 Mb. Cette comparaison a mis en évidence un polymorphisme de restriction beaucoup plus prononcé qu'entre les souches DL11 et IL1403. Les cartes physiques semblent totalement différentes. En revanche, l'organisation génique globale resterait conservée, notamment pour les opérons de biosynthèse des acides aminés. L'étude comparative des cartes physiques montre clairement que la souche DL11 est beaucoup plus proche de la souche IL1403 que ne l'est la souche MG1363. Cela peut s'expliquer par le fait que la souche MG1363 possède un génotype correspondant à la sous-espèce *cremoris*, au moins pour son ARNr 16S (Salama *et al*, 1991), bien que certains traits phénotypiques soient caractéristiques de la sous-espèce *lactis*.

La comparaison de l'organisation génomique de plusieurs souches de *Lactococ-*

*cus lactis* et de ses sous-espèces devrait permettre de tirer des conclusions générales sur la plasticité et l'évolution du génome, ainsi que sur la topologie du chromosome chez les lactocoques. D'un point de vue appliqué, il sera peut-être possible d'établir une corrélation entre une certaine organisation génomique et certaines propriétés technologiques de ces bactéries. Lorsqu'on souhaite stabiliser et exprimer certains caractères par intégration de gènes plasmidiques dans le chromosome, il n'est certainement pas indifférent d'intégrer ces gènes n'importe où dans le chromosome, certaines régions étant sujettes à moins de variations que d'autres.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions sincèrement les différentes équipes qui nous ont envoyé les sondes utilisées dans cette étude, en particulier B Canard pour la plupart des gènes hétérologues, et les chercheurs de l'équipe de «génétique microbienne» de l'INRA de Jouy-en-Josas pour la grande majorité des gènes de *L. lactis*.

## RÉFÉRENCES

- Alloing G, Trombe MC, Claverys JP (1990) The *ami* locus of the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 4, 633-644
- Bachmann BJ (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8<sup>e</sup> édition. *Microbiol Rev* 54, 130-197
- Bardowski J, Ehrlich SD, Chopin A (1992) Tryptophan biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J Bacteriol* 174, 6563-6570
- Beresford T, Condon S (1991) Cloning and partial characterization of genes for ribosomal ribonucleic acid in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 78, 319-324
- Canard B, Cole ST (1989) Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium per-*

- fringens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6676-6680
- Chapot-Chartier MP, Nardi M, Chopin MC, Chopin A, Gripon JC (1993) Cloning and sequencing of *pepC*: a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* AM2. *Appl Environ Microbiol*. *Appl Environ Microbiol* 59, 330-333
- Chopin A, Chopin MC, Moillo-Batt A, Langella P (1984) Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11, 260-263
- Delorme C, Ehrlich SD, Renault P (1992) Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J Bacteriol* 174, 6571-6579
- Dodd HM, Horn N, Gasson MJ (1990) Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J Gen Microbiol* 136, 555-560
- Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A (1992) Use of degenerate primers for polymerase chain reaction cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* *recA* gene. *Appl Environ Microbiol* 58, 2674-2678
- Garnier T, Canard B, Cole ST (1991) Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 173, 5431-5438
- Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154, 1-9
- Godon JJ, Chopin MC, Ehrlich SD (1992) Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J Bacteriol* 174, 6580-6589
- Harvey S, Hill CW (1990) Exchange of spacer regions between rRNA operons in *Escherichia coli*. *Genetics* 125, 683-690
- Huang DC, Novel M, Novel G (1991) A transposon-like element on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* Z270. *FEMS Microbiol Lett* 77, 101-106
- Huang DC, Novel M, Huang XF, Novel G (1992) Non-identity between plasmid and chromosomal copies of ISS1-like sequences in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ270 and their possible role in chromosomal integration of plasmid genes. *Gene* 118, 39-46
- Jarvis AW, Jarvis BDW (1981) Deoxyribonucleic acid homology among lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* 41, 77-83
- Le Bourgeois P, Mata M, Ritzenthaler P (1989) Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 59, 65-70
- Le Bourgeois P, Mata M, Ritzenthaler P (1991) Pulsed-field gel electrophoresis as a tool for studying the phylogeny and genetic history of lactococcal strains. In: *Genetic and molecular biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci* (Dunny GM, Cleary PP, McKay LL, eds). ASM, Washington DC,
- Le Bourgeois P, Lautier M, Mata M, Ritzenthaler P (1992a) New tools for the physical and genetic mapping of *Lactococcus* strains. *Gene* 111, 109-114
- Le Bourgeois P, Lautier M, Mata M, Ritzenthaler P (1992b) Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL1403. *J Bacteriol* 174, 6752-6762
- LeBlanc DJ, Crow VL, Lee LN, Garon CF (1979) Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* 137, 878-884
- Mauil C, Young M, Margot P, Karamata D (1989) The essential nature of teichoic acids in *Bacillus subtilis* as revealed by insertional mutagenesis. *Mol Gen Genet* 215, 388-394
- McKay LL, Baldwin KA, Efstathiou JD (1976) Transductional evidence for plasmid linkage metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl Environ Microbiol* 32, 45-52
- McKay LL, Baldwin KA, Walsh PM (1980) Conjugal transfer of genetic information in group N Streptococci. *Appl Environ Microbiol* 40, 84-91
- Méjean V, Devedjian JC, Rives I, Alloing G, Claverys JP (1991) Uracil-DNA glycosylase affects mismatch efficiency in transformation and bisulfite-induced mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 19, 5525-5531
- Muto A, Osawa S (1987) The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 166-169
- Nardi M, Chopin MC, Chopin A, Cals MM, Gripon JC (1991) Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO 763. *Appl Environ Microbiol* 57, 45-50

- Piggot PJ (1990) Genetic map of *Bacillus subtilis* 168. In: *The bacterial chromosome* (Drica K, Riley M, eds) ASM, Washington DC,
- Polzin KM, Shimizu-Kadota M (1987) Identification of a new insertion element, similar to Gram-negative IS26, on the lactose plasmid of *Streptococcus lactis* ML3. *J Bacteriol* 169, 5481-5488
- Price CW, Gitt MA, Doi RH (1983) Isolation and physical mapping of the gene encoding the major  $\sigma$  factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4074-4078
- Prudhomme M, Méjean V, Martin B, Claverys JP (1991) Mismatch repair genes of *Streptococcus pneumoniae*: HexA confers a mutator phenotype in *Escherichia coli* by negative complementation. *J Bacteriol* 173, 7196-7203
- Renault P, Gaillardin C, Heslot H (1989) Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators. *J Bacteriol* 171, 3108-3114
- Ross P, O'Gara F, Condon S (1990) Cloning and characterization of the thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 56, 2156-2163
- Salama M, Sandine WE, Giovannoni S (1991) Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1313-1318
- Sandine WE, Radich PC, Elliker PR (1972) Ecology of the lactic streptococci. A review. *J Milk Food Technol* 35, 176-185
- Schäfer A, Jahns A, Geis A, Teuber M (1991) Distribution of the IS elements ISS1 and IS904 in lactococci. *FEMS Microbiol Lett* 80, 311-318
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75
- Stroman P (1992) Sequence of a gene (*lap*) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Gene* 113, 107-112
- Suh JW, Boylan SA, Price CW (1986) Gene for the alpha subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase maps in the ribosomal protein gene cluster. *J Bacteriol* 168, 65-71
- Tulloch DL, Finch LR, Hillier AJ, Davidson BE (1991) Physical map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* DL11 and localization of 6 putative rDNA operons. *J Bacteriol* 173, 2768-2775
- van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, Simons G (1990) Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MG1363. *Gene* 95, 155-160
- von Meyerburg K, Hansen FG (1980) The origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome: genes near *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. *ICN-UCLA Symp Cell Mol Biol* 19, 137-159
- Ziegler D, Dean D (1990) Orientation of genes in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Genetics* 125, 703-708