

## CARTOGRAPHIE DU PLASMIDE pSU100, PLASMIDE CRYPTIQUE DE *LACTOBACILLUS CASEI*

Reçu le 04/11/2001 – Accepté le 09/04/2003

### Résumé

Les bactéries isolées de la flore du lait cru local restent très peu connues quant à leurs potentialités et performances génétiques. L'intérêt des différentes propriétés biologiques portées par les plasmides de ces bactéries intéresse de nombreux laboratoires de recherche. Les techniques d'extraction et de purification nous ont permis de détecter un plasmide de 5,3 Kb chez *Lactobacillus casei*, bactérie isolée du lait de vache.

Ce plasmide appelé pSU100 a été cloné dans le vecteur de transformation pUC18 au site *EcoRI* chez *E. coli* JM103. Les profils électrophorétiques de restriction obtenus par des digestions simples, doubles et triples sous l'action de 33 endonucléases, ont contribué à l'élaboration d'une carte de restriction de ce plasmide. Cinq sites uniques ont été identifiés, ainsi que d'autres sites doubles et multiples. Une étude préliminaire du rôle physiologique de ce plasmide a permis de déceler une résistance à la kanamycine.

**Mots clés:** *Lactobacillus casei*, Plasmide, *Escherichia coli*, Clonage, Carte de restriction.

### Abstract

Lactic acid bacteria isolated from local raw cow's milk are still not well known about their potentialities and genetic performances. Many research group are interested by the different biologicals properties carried by plasmids of these bacteria. Extraction and purification of a 5,3 Kb cryptic plasmid was established in *Lactobacillus casei*.

This plasmid, designed pSU100, has been cloned in the vector of transformation pUC18 localized in the *EcoRI* site of *E. coli* JM103. Electrophoretic properties of restriction which has been obtained by simple, double and treple digestions with 33 endonucleases, those digestions permitted the construction of a restriction map of this plasmid. Five single sites have been identified, as well as double and many other sites. A preliminary examination of the physiological properties permitted to identify an antibiotic resistance for Kanamycine.

**Keywords:** *Lactobacillus casei*, Plasmid, *Escherichia coli*, Cloning, Restriction map.

F. BENSALAH

N. SAIDI

M. KIHAL

Laboratoire de Microbiologie

Appliquée

Département de Biologie

Faculté des Sciences

Université d'Oran Es-senia

Oran 31000, Algérie

### ملخص

البكتريات المعزولة من الحليب الخام المحلي تبقى مجهولة الخصائص و القدرات الوراثية. هناك عدة مخابر تعمل على تحديد مختلف الميزات الحيوية المحمولة على البلازميدات. ان طرق الاستخلاص و التنقية مكنتنا من الكشف عن بلازميد نو وزن جزئي 5.3 كيلوباز عند بكتيرة *Lactobacillus casei* المعزولة من حليب البقر.

وقد سمي هذا البلازميد pSU100 ثم استنسخ داخل ناقل التحويل pUC18 في موقع *EcoRI* عند *E. coli* (JM103). ان عملية القص البسيط والتناهي والمتعدد بواسطة انزيمات القطع المتخصصة أدت الى معرفة تركيب الخريطة الوراثية لهذا البلازميد، حيث أظهرت الدراسة وجود خمسة مواقع قطع أحادية وأخرى ثنائية ومتعددة. النتائج الدراسية الأولية للدور الأيضي لهذا البلازميد كشفت عن خاصية المقاومة للمضاد الحيوي Kanamycine.

**الكلمات المفتاحية:** *Lactobacillus casei* ، بلازميد، انزيمات القطع ، الاستنساخ، خريطة وراثية *Escherichia coli*

Les bactéries lactiques ont une importance industrielle considérable. Elles sont utilisées dans la fabrication des levains, dans la conservation des aliments ainsi que dans l'élaboration des probiotiques [30, 37, 31, 7]. Leur rôle dans le secteur agro-alimentaire n'est plus à démontrer, car elles interviennent largement dans les différents processus de fermentation des produits alimentaires. L'étude approfondie des souches lactiques locales, possédant de bonnes potentialités génétiques d'adaptation, peut nous conduire à proposer à terme des cultures «starters» pour l'industrie laitière.

La caractérisation phénotypique et génotypique des souches isolées demeure indispensable afin de sélectionner des levains stables et performants [33], comme elles peuvent être utilisées à l'avenir comme vecteur de molécules thérapeutiques [6, 13].

Les bactéries lactiques et notamment les lactobacilles contiennent généralement des plasmides codant pour des propriétés biologiques importantes telles que l'utilisation du lactose, le transport du citrate, l'activité protéolytique, la résistance aux antibiotiques. De nombreux efforts sont concentrés sur la construction de souches de bactéries lactiques résistantes aux bactériophages [23, 17, 21, 22, 2, 1]. Par ailleurs, Cuozzo *et al*, [8], ont mis en évidence la Lactocine 705, bactériocine produite par *Lactobacillus casei*.

Actuellement, les préoccupations de nombreux chercheurs sont consacrées à la mise au point de vecteurs de clonage et en particulier de vecteurs navette; ces derniers sont devenus un moyen d'investigation important dans la recherche en biologie moléculaire [42, 47]. Les

plasmides interviennent effectivement dans les différentes étapes de clonage, séquençage, expression et autres manipulations génétiques [44, 3, 34, 47, 38].

Un certain nombre de plasmides isolés de *Lactobacillus casei* ont été clonés chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* en utilisant les plasmides pBR322, pUC18, et pACY184 comme vecteurs de transformation [4, 40].

Le présent travail s'intéresse à la caractérisation d'un élément génétique extrachromosomique cryptique de *Lactobacillus casei*, espèce industrielle à caractère probiotique utilisée dans les laits fermentés tel que Actimel de Danone. Elle peut être utilisée dans l'élaboration de vaccins oraux contre l'anthrax [49] ou le tétanos [27].

## MATERIELS ET METHODES

### Souches bactériennes, plasmides conditions et de culture

*Lactobacillus casei* L1-8 provient de la collection du Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université Es-sénia, Oran, Algérie. Cette souche a été isolée localement à partir du lait de vache. La confirmation de son identification ainsi que sa caractérisation ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Le milieu MRS (De Man *et al.*, [10]) a été utilisé pour le maintien et la croissance de *Lb. casei* à 37°C. La glycine à 4% est additionnée au milieu MRS liquide dans les expériences d'extraction massive de plasmides [45].

*Escherichia coli* JM103 (Laboratoire de Microbiologie de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) a été utilisée comme souche réceptrice dans les manipulations de transformation. Le vecteur de clonage utilisé appartient à la série pUC [46]. Une gamme de 33 enzymes de restriction a été testée dans les différentes digestions simples, doubles et triples de l'ADN plasmidique.

*E. coli* est ensemencée sur milieu LB (lactose broth) complet et maintenue en milieu minimal M9 à 37°C [29]. L'obtention de clones recombinés de cette souche nécessite un milieu sélectif, LB solide en présence d'ampicilline, supplémenté de l'X-Gal et de l'IPTG [18].

Les expériences et le matériel concernant la détection, l'extraction, la purification, le clonage et la transformation, ainsi que la digestion de l'ADN plasmidique ont été réalisées au sein du Laboratoire indiqué ci-dessus.

Le plasmide pSU101 a été construit selon la procédure suivante: le plasmide pSU100 (5,3 Kb) a été isolé et purifié de *Lb. Casei*. Le vecteur de clonage utilisé est le pUC18 (2,7 Kb) codant pour une résistance à l'ampicilline (Amp<sup>r</sup>). Ces deux plasmides ont été digérés par l'endonucléase *EcoRI*, puis ligés par l'ADN ligase du phage T4. Un plasmide recombiné de 8 Kb a été obtenu.

### Détection et extraction de plasmides

Les microextractions et les détections de plasmides chez *Lb. casei* ont été réalisées selon la méthode de Klaenhammer [23]. Le culot de 10 ml d'une culture de 18 h a subi un traitement au lysozyme (75 µl à 1mg/ml), puis une lyse alcaline à pH12,2. Ce mélange est neutralisé par une solution de Tris-HCl 2M à pH7. La déprotéinisation est

conduite avec du phénol saturé en solution de NaCl à 3%. Chloroforme et alcool isoamylique sont utilisés pour la séparation des phases. 2,5 ml d'éthanol froid (95%) est utilisé pour la précipitation de l'ADN qui est obtenu en culot après une dernière centrifugation.

L'extraction massive de plasmides à partir de 250ml de culture MRS de *Lb. casei* a été réalisée selon la procédure de Vanderslice *et al.* [45]. Cette méthode a été modifiée comme suit: à 1,25ml de lysozyme (30 mg/ml dans du Tris-HCl 20 mM, pH8), a été additionné 60 µl de mutanolysine (1 mg/ml). Ce mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure, et le culot récupéré après une centrifugation (15000 g, 15 mn.), est resuspendu dans 6,5 ml d'une solution tris 100mM, EDTA 10mM (pH 8,5), auquel on rajoute 600 µl de sarkosyl à 10% et 100 µl de SDS à 10%.

L'extraction rapide de plasmides chez *E. coli* a été réalisée selon la méthode de Holmes et Quigley [17]. A partir d'une culture agitée (10 ml) en milieu LB, le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 350 µl de tampon STET (saccharose 8%, triton X-100 5%, EDTA 50mM pH8, Tris-HCl 50mM pH 8). 30 µl de lysozyme (10 mg/ml) sont ajoutés au mélange. Après incubation (1 h, 37°C) et centrifugation, le surnageant est traité par l'isopropanol à -20°C. Le culot est repris dans 1 ml d'éther éthylique; l'ADN plasmidique est obtenu après une dernière centrifugation (12000 g, 10 mn.).

L'extraction massive de plasmides chez *E. coli* est obtenue à partir de 250 ml de culture en milieu LB à 37°C selon la méthode de Clewell et Helinsky [5]. Après traitement au lysozyme dans une solution de Tris, saccharose, EDTA et «triton mixture», on prélève 5 ml du lysat clair obtenu après centrifugation; on ajoute à ce dernier 5g de CsCl et 500µl de bromure d'éthidium à 10mg/ml. Le mélange est soumis à une ultracentrifugation (55000g, 14 heures), dans un rotor Vti 65 (Centrikon).

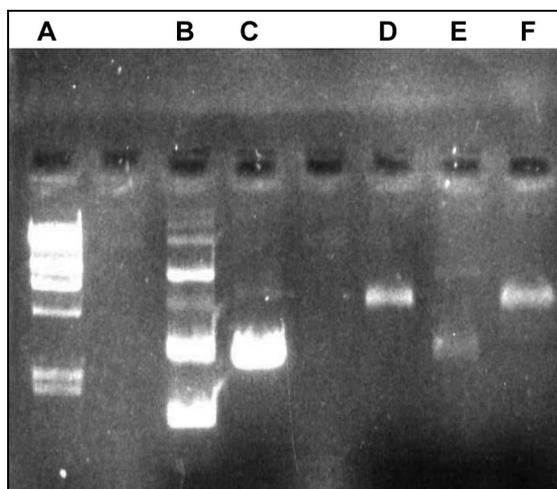
### Purification du plasmide pSU 100 à partir d'un gel d'agarose

L'ADN plasmidique est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%, dans (89 mM Tris, 2 mM EDTA, 89 mM acide borique pH 8) contenant du bromure d'éthidium à raison de 1µg /ml.

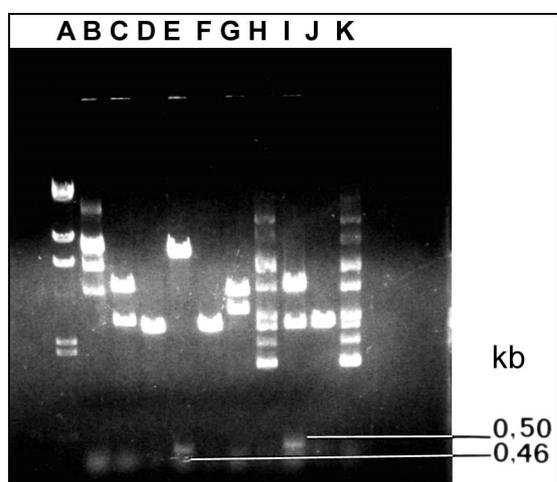
On découpe sous éclairage ultraviolet, le fragment d'agarose contenant la bande d'ADN plasmidique localisée à 2,8 Kb (Figure 1). Ce poids moléculaire est estimé selon la méthode standard de Meyers *et al.*, [32]. Une extraction phénolique suivie d'une précipitation alcoolique permet d'obtenir le plasmide purifié [20].

### Clonage du plasmide pSU100 au site *EcoRI* du pUC18

Les plasmides pSU100 et pUC18 sont linéarisés sous l'action de l'enzyme de restriction *EcoRI* selon le protocole suivant: 1 µg d'ADN est digéré par 0,1 unité d'enzyme en présence de tampon adéquat pendant deux heures à 37°C (Figure 2). Le mélange est soumis à une extraction phénolique suivie d'une précipitation alcoolique. La ligation a été réalisée sur les ADN obtenus. Ils sont traités par la DNA ligase du phage T4 pendant une nuit à température ambiante .



**Figure 1:** Profil de restriction de pSU100 et pUC18 digéré par *EcoRI*. A:  $\lambda$  *HindIII*, B: pUC18 natif, C: pUC18 digéré, D et F: pSU100 digéré, E: pSU100 natif.



**Figure 2:** Profil de restriction de pSU101 et pUC18 après double digestion. A:  $\lambda$  *HindIII*, B: pSU101 natif, C: pSU101 digéré par *HpaI* et *PstI*, D: pUC18 digéré par *HpaI* et *PstI*, E: pSU101 digéré par *BglIII* et *PstI*, F: pUC18 digéré par *BglIII* et *PstI*, G: pSU101 digéré par *HpaI* et *BglIII*, H: pUC18 digéré par *HpaI* et *BglIII*, I: pSU101 digéré par *EcoRI*, J: pUC18 digéré par *EcoRI*, K: pUC18 natif.

### Transformation d'*Escherichia coli* et sélection des clones recombinés

Les cellules compétentes d'*E. coli* JM-103 sont utilisées pour la transformation selon la méthode de Mandel et Higa [28]. Le milieu sélectif comprend le milieu LB complet additionné de 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline, de 40  $\mu$ l d'IPTG (24 mg/ml) et de 40  $\mu$ l d'X-Gal (20 mg/ml). Ce milieu permet la sélection par la couleur des clones recombinés. L'ADN plasmidique des clones retenus est extrait selon la méthode de Holmes et Quigley [18]; il est ensuite digéré par *EcoRI*, puis soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7%. La taille des fragments d'ADN obtenus est déterminée en utilisant comme marqueur de poids moléculaire l'ADN du phage lambda digéré par *Hind III*.

### Cartographie de restriction du plasmide pSU100

La recherche et la mise en évidence des différents sites sont réalisées sous l'action d'endonucléases spécifiques dans les tampons décrits selon les procédures standards [29] ou dans des conditions indiquées par les fournisseurs. Ces démarches expérimentales ont nécessité des digestions simples et mixtes pendant deux heures à 37°C.

33 enzymes de restriction ont été utilisés et se présentent comme suit: *EcoRI*, *XhoI*, *SmaI*, *SalI*, *MstI*, *PvuI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HindII*, *PvuII*, *ClaI*, *AccI*, *BstEII*, *SacI*, *BglII*, *XhoII*, *AvaI*, *Sau3a*, *KpnI*, *AvaII*, *ApaI*, *BamHI*, *HgiI*, *PstI*, *AluI*, *DraI*, *HindIII*, *XbaI*, *SphI*, *SpeI*, *HpaI*, *DdeI*, *HgaI*.

### Profil d'antibiorésistance de *Lb. casei* et des clones sélectionnés

Le comportement des différentes souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques a été étudiée en réalisant des antibiogrammes en milieux solides, milieu MRS pour *Lb. casei*, milieu LB pour *E. coli* et les transformants obtenus.

## RESULTATS

### Identification des plasmides et localisation des sites

L'extraction de plasmides a permis de mettre en évidence l'ADN plasmidique dont la distribution s'est faite par migration de quatre bandes de 2,8 Kb; 9 Kb; 23,7 Kb; et de 50 Kb.

La bande d'ADN natif localisée à 2,8 Kb (plasmide pSU100) a été prélevée à partir du gel de migration, purifiée et digérée en même temps que le plasmide vecteur pUC18 par l'enzyme *EcoRI*. (Figure 1). Ces plasmides sont linéarisés et possèdent un poids moléculaire de 5,3 Kb pour le plasmide pSU100 et 2,7 Kb pour le vecteur pUC18.

### Clonage du plasmide pSU100 et sélection des clones

Les travaux de clonage des plasmides pSU100 et du pUC18, de la transformation de la souche réceptrice d'*E. coli*, ainsi que de la digestion par l'endonucléase *EcoRI* ont permis de caractériser et d'identifier trois types de recombinants. L'analyse du profil électrophorétique de restriction montre trois cas de figures selon la taille du fragment inséré: le vecteur pUC18 et le fragment de 0,5 Kb: (Plasmide pSU98); le vecteur pUC18 et le fragment de 4,8 Kb: (Plasmide pSU99); le vecteur pUC18 et le fragment de 5.3 Kb (Plasmide pSU101). Ces trois types de clones recombinés ont été appelés successivement, transformants: Tf.25, Tf.28 et Tf.29.

### Carte de restriction du pSU100

L'étude de la répartition de l'ensemble de ces fragments d'ADN montre qu'il existe au moins deux sites de restriction *EcoRI* dans le plasmide pSU100.

Connaissant les sites de restriction du «polylinker» du pUC18, il est aisé de rechercher et d'identifier les sites

existants au niveau du plasmide pSU100. Toutes les digestions se sont réalisées simultanément sur le vecteur pUC18 pris comme témoin et sur le plasmide pSU101.

L'analyse des fragments d'ADN a montré que la digestion par l'enzyme *Xba*I donne naissance à deux bandes dont la somme des poids moléculaires est de 8 Kb pour le pSU101. L'un des sites *Xba*I se trouve dans les séquences du pUC18, le second site *Xba*I est unique et se trouve dans le pSU100. Les enzymes *Ava*I, *Cla*I et *Spe*I ne modifient pas la conformation du plasmide pSU101. Les enzymes *Bam*HI et *Ava*II donnent naissance à une seule bande d'ADN de 8 Kb, ces sites sont localisés dans le pUC18. La digestion par l'enzyme *Hind*II entraîne la formation de cinq bandes de restriction. Ceci indique que quatre sites de ce dernier sont localisés dans le pSU100, le cinquième se situe sur le pUC18.

L'étude du profil de restriction a montré que la digestion du plasmide pSU101 par les enzymes *Bg*III et *Hpa*I conduit à l'apparition d'une seule bande de 8 Kb; l'action de leur double digestion indique la présence de deux bandes d'ADN dont la somme est de 8 Kb. Ces deux sites sont localisés sur le pSU100 et sont uniques. Les enzymes *Hpa*I et *Bg*III sont incapables de digérer le vecteur pUC18.

Deux autres sites uniques ont été identifiés dans le plasmide pSU100 après digestion simple par les enzymes de restriction *Bst*EII et *Hga*I. L'analyse du profil obtenu montre la présence d'une bande unique localisée à 8 Kb suite à l'action de *Bst*EII. La digestion par *Hga*I montre la présence d'une bande importante à 8 Kb ainsi que d'autres fragments aux mêmes positions observées pour le plasmide natif pSU101. Ceci indique que la digestion n'est pas totale. La présence de ce site sera confirmée par des doubles digestions.

La localisation relative des sites les uns par rapport aux autres est effectuée par analyse des différents poids moléculaires de fragments obtenus après double et triple digestion du plasmide pSU101. Connaissant la position exacte des sites au niveau du «polylinker» du pUC18, les doubles digestions enzymatiques spécifiques agissant en parallèle sur les différents sites identifiés du pSU100 et ceux du pUC18 nous ont permis d'aboutir aux données qui se résument dans le tableau I.

Les résultats fort intéressants obtenus dans les différents électrophorégrammes, (Figures 2 et 3) puis traduits en poids moléculaire de chaque fragment d'ADN obtenu nous ont orienté à localiser les différents sites de restriction et à établir la cartographie du plasmide pSU100, (Figure 4). L'analyse suivante donne quelques renseignements importants qui permettent de vérifier la position de chaque site unique.

Le site *Bst*EII du pSU100 est situé à 0,89 Kb du site *Pst*I du pUC18.

Le site *Bg*III du pSU100 est situé à 0,46 Kb du site *Pst*I du pUC18 (Figures 2 et 3, canaux E et C).

Le site *Bg*III du pSU100 est situé à 0,41 Kb du site *Eco*RI du pUC18 (Figure 3, canal D).

Le site *Bg*III du pSU100 est situé à 0,44 Kb du site *Xba*I du pUC18.

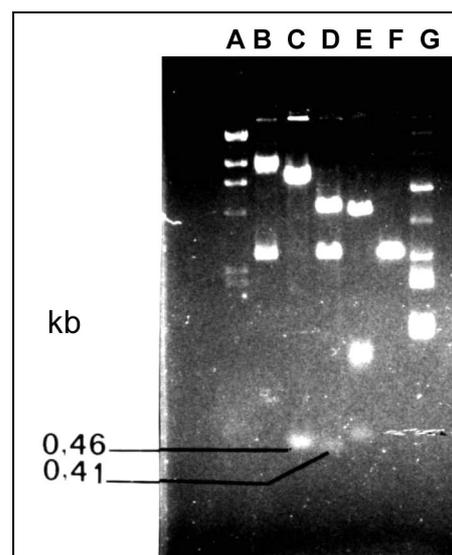
Le site *Hpa*I du pSU100 est diamétralement opposé au

site *Pst*I du pUC18 (Figure 2, canal C).

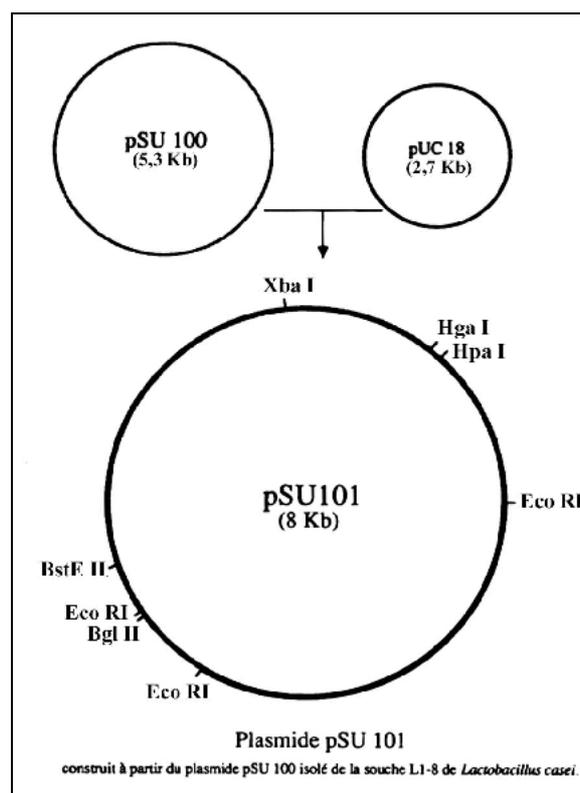
Les sites *Hpa*I et *Bg*III du pSU100 sont diamétralement opposés (Figure 2, canal G).

Le site *Xba*I du pSU100 est diamétralement opposé au site *Xba*I du pUC18.

Les doubles digestions *Hga*I/*Ava*II, *Hga*I/*Bst*EII et *Hpa*I/*Ava*II permettent la localisation du site *Hga*I.



**Figure 3:** Profil de restriction de pSU101 et pUC18 après simple et double digestion. A:  $\lambda$  *Hind*III, B: pSU101 natif, C: pSU101 digéré par *Pst*I/*Bg*III, D: pSU101 digéré par *Eco*RI/*Bg*III, E: pSU101 digéré par *Hind*III, F pUC18 digéré par *Hind*III, G: pUC18 natif.



**Figure 4:** Cartographie de pSU101 construit à partir du plasmide pSU100 de *Lactobacillus casei* et du plasmide vecteur pUC18.

Digestions par les endonucléases	Taille des fragments de restriction PM (Kb)			Total (Kb)
	Localisation des sites			
	<i>HpaI</i> , <i>BgIII</i> (fig.1)	<i>XbaI</i> , (fig.2)	<i>BstEII</i> , <i>HgaI</i> (fig.3)	
<i>PstI/HpaI</i>	4,60 et 3,50	-	- -	7,90
<i>PstI/BgIII</i>	7,30 et 0,40	-	- -	7,70
<i>HpaI/BgIII</i>	3,70 et 4,20-	-	- -	7,90
<i>EcoRI</i>	4,60; 2.70 et 0,50	- - -	- - -	7,80
<i>HpaI/XbaI</i>	- - -	3.85; 3.10 et 1,05	-- -	8,00
<i>BgIII/XbaI</i>	- - -	4,20; 3,40 et 0,44	- - -	8,04
<i>HpaI/AvaII</i>	- - -	6,40 et 1,60	- - -	8,00
<i>BstEII/PstI</i>	- - -	- - -	6.90 et 0,89	7,79
<i>BstEII/AvaII</i>	- - -	- - -	6,10 et 1,90	8,00
<i>HgaI/AvaII</i>	- - -	- - -	6,20 et 1,70	7,90
<i>BstEII/HgaI</i>	- - -	- - -	4,10 et 3,75	7,85
<i>PstI/AvaII</i> (pSU101)	- - -	- - -	6,90 et 1,00	7,90
<i>PstI/AvaII/BstEII</i> (pSU101)	- - -	- - -	5,90; 1,00 et 0,98	7,88
<i>PstI/AvaII/BstEII</i> (pUC18)	- - -	- - -	1,50 et 1,00	2,50
<i>PstI/AvaII</i> (pUC18)	- - -	- - -	1,50 et 1,00	2,50

**Tableau I:** Estimation des poids moléculaires des fragments d'ADN obtenus après digestion du pSU101 (marqueur de taille  $\lambda$  *HindIII*).

Antibiotiques		Souches bactériennes					
		L1-8	Tf-29	Tf-28	Tf-25	pUC18	JM103
Tétracycline (Tet)	30 UI	Tet <sup>S</sup>	Tet <sup>S</sup>	Tet <sup>S</sup>	Tet <sup>S</sup>	Tet <sup>S</sup>	Tet <sup>S</sup>
Chlortétracycline (Ct)	30 UI	Ct <sup>S</sup>	Ct <sup>S</sup>	Ct <sup>S</sup>	Ct <sup>S</sup>	Ct <sup>S</sup>	Ct <sup>S</sup>
Acide Nalidixique (Na)	30 $\mu$ g	Na <sup>R</sup>	Na <sup>R</sup>	Na <sup>S</sup>	Na <sup>S</sup>	Na <sup>S</sup>	Na <sup>S</sup>
Rifampicine (Ra)	30 $\mu$ g	Ra <sup>S</sup>	Ra <sup>S</sup>	Ra <sup>S</sup>	Ra <sup>S</sup>	Ra <sup>S</sup>	Ra <sup>S</sup>
Triméthyl,+ Sulfate (ST)	1.25 $\mu$ g + 2.75	St <sup>R</sup>	St <sup>R</sup>	St <sup>S</sup>	St <sup>S</sup>	St <sup>S</sup>	St <sup>S</sup>
Ampicilline (Amp)	10 $\mu$ g	Amp <sup>S</sup>	Amp <sup>R</sup>	Amp <sup>R</sup>	Amp <sup>R</sup>	Amp <sup>R</sup>	Amp <sup>S</sup>
Chloramphénicol (Cp)	30 $\mu$ g	Cp <sup>S</sup>	Cp <sup>S</sup>	Cp <sup>S</sup>	Cp <sup>S</sup>	Cp <sup>S</sup>	Cp <sup>S</sup>
Kanamycine (Ka)	30 UI	Ka <sup>R</sup>	Ka <sup>R</sup>	Ka <sup>S</sup>	Ka <sup>S</sup>	Ka <sup>S</sup>	Ka <sup>S</sup>
Acide fusidique (FA)	10 $\mu$ g	FA <sup>R</sup>	FA <sup>R</sup>	FA <sup>R</sup>	FA <sup>R</sup>	FA <sup>R</sup>	FA <sup>S</sup>

**Tableau II:** Profil d'antibiorésistance chez *Lb. casei* (L1-8), *E. coli* JM103, pUC18 et les transformants obtenus. Légende : **S** = sensible, **R** = résistant

## Profil d'antibiorésistance

L'antibiogramme réalisé sur le lactobacille étudié, les souches témoins (JM103 et pUC18) et les dérivés obtenus se résume dans le tableau 2. L'analyse de ce dernier nous permet de révéler que la résistance à l'acide nalidixique, la triméthyl sulfate et la kanamycine est associée au fragment de 5.3 Kb intégré dans le pUC18.

## DISCUSSION

Le clonage du plasmide pSU100 de 5.3 Kb isolé de *Lb. casei* dans le vecteur pUC18 a permis d'identifier 3 types de plasmides recombinants : pSU98 (2.7 Kb + 0.5 Kb), pSU99 (2.7 Kb + 4.8 Kb) et pSU101 (2.7 Kb + 5.3 Kb).

Des travaux similaires menés par Leer *et al.* [26] ont permis l'obtention de dérivés à partir de plasmides de 2,4 Kb chez *Lactobacillus pentosus* et de 1,9Kb chez *Lactobacillus platarum*.

Le plasmide pSU101 a fait l'objet de travaux d'extraction, de purification, de clonage, de transformation et de digestion par différentes endonucléase, et ce dans le but d'établir sa cartographie.

La carte de restriction de ce plasmide a révélé la présence de 5 sites de restriction uniques (*XbaI*, *BgIII*, *BstEII*, *HpaI*, et *HgaI*), 2 sites *EcoRI* (Figure 2, canal I), 2 sites *HindIII* (Figure 3, canal E), 4 sites *HindII* et d'autres sites multiples coupant dans des séquences tétra-nucléotidiques (*RsaI*, *AluI*, *DraI*, et *TaqI*) ainsi que dans des séquences hexa-nucléotidiques (*PvuII*). Un plasmide recombinant pBN183 a été obtenu par Solaiman *et al.* [41] à partir du plasmide pBN128 de *Streptococcus thermophilus* et le vecteur pBR322 au site *BamHI* et cloné chez *E. coli*.

Dans certains des résultats obtenus, les différentes coupures réalisées montrent une perte éventuelle de petites séquences nucléotidiques. Il se peut par ailleurs que le clonage aux sites *EcoRI* ait pu entraîner la perte de petits fragments d'ADN. Nous suggérons donc le clonage du pSU100 dans le vecteur pUC18 en un autre site de restriction unique tel que *XbaI* par exemple. Nous pourrions en effet montrer si la totalité des fragments nucléotidiques ont été clonés et vérifier ainsi la conformité de la cartographie déjà établie du pSU100. Les travaux de Yamamoto et Takano [48] sur la cartographie du plasmide pCP53 (2Kb) de *Lactobacillus helveticus*, après obtention d'un plasmide recombinant pCP53D (4,7Kb) a été réalisé et la présence de la résistance à la tétracycline médié par ce plasmide a été démontré. Par ailleurs, d'autres chercheurs [14] ont pu identifié 4 sites uniques sur le plasmide pRV300 isolé de *Lactobacillus casei*.

L'étude du rôle physiologique de ce plasmide a montré une résistance à la kanamycine, à l'acide nalidixique et au

triméthyl sulfate (Tableau 2). Par ailleurs ce rôle reste en grande partie à déterminer par des expériences de transformation [36, 47], d'expression codant pour différentes activités métaboliques [3, 11, 40], de résistance aux bactériophages [16, 12], de production de bactériocines [24]. L'étude de la structure du plasmide pSU100 serait très intéressante à réaliser par le séquençage du fragment de 0.5 Kb du pSU98 et du fragment 4.8 Kb du plasmide pSU99 et rechercher par la même occasion les fonctions que pourraient déterminer ces deux séquences. Des travaux sur les plasmides chez *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus* ont permis de caractériser leur structure et leur séquençage [34, 44]. Le plasmide pSU100 et ses dérivés peuvent être utilisés à terme comme vecteur homologue de clonage en particulier pour transformer des souches lactiques. Certains plasmides pouvant s'exprimer chez d'autres souches lactiques tel que le plasmide pLEB6000 de *Lactobacillus casei* ont été récemment construits [43]. Le gène codant pour la L(+)-lactate déhydrogenase de *Lactobacillus casei* a été cloné chez *Saccharomyces cerevisiae* [9]. De nouveaux plasmides à spectre large ont été construits [35]; ils contiennent le gène lacZ-T1T2.

**Remerciement.** Nous remercions le docteur Jean-Claude HUBERT et son équipe de l'université de Strasbourg pour leur assistance technique.

## REFERENCES

- [1]- Alvarez M.A., Rodriguez A., Suàres J.E., "Stable expression of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 repressor blocks phage propagation during milk fermentation", *J. Appl. Microbiol.*, 86 (1999), pp.812-816.
- [2]- Chekroune A., Ait Hammadouche N., Kihal M., Bensoltane A., Saidi D., Mazmase F., Kheroua O., "Hydrolytic activity of lactic acid bacteria on bovine b-lactoglobulin. effects on its immunological reactivity", *Microbiol. Aliment. Nutrition*, 16 (1998), pp.211-220
- [3]- Chavagnat F., Casey M.G., Meyer G., "Purification, characterisation, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999), pp.3001-3007.
- [4]- Cleerebezem M., Beerthuyzen M.M., Vaugan E.E., de Vos W.M., Kuipers O.P., "Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inucible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp.", *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), pp.4581-4584.
- [5]- Clewell D.B., Helinsky D.R., "Supercoiled circular DNA – protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conservation to an open circular DNA form", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 62 (1969), pp.1159-1166
- [6]- Corthier G., Renault P., "Future directions for research on biotherapeutic agents: contribution of genetics on lactic acid bacteria", in: G.W. Elmer (Eds.), *Biotherapeutic agents and infectious diseases*. Humana Press, Totowa, N.J. (1998), pp. 269-304.
- [7]- Cruz Martin M., Alonso J.C., Suarez J.E., Alvarez M.A., "Generation of Food-Grade Recombinant Lactic Acid Bacterium Strains by Site-Specific Recombination", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000), pp.2599-2604.
- [8]- Cuozzo S.A., Sesma F., Palacios J.M., de Ruis Holdago A.P., Raya R.R., "Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705 a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705", *FEMS Microbiol. Lett.*, 185 (2000), pp.157-161.
- [9]- Dequin S., Barre P., "Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH", *Biotechnology*, 12 (2) (1992), pp.173-177.
- [10]- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M., "A medium for the cultivation of lactobacilli", *J. Appl. Bact.*, 23 (1960), pp.130-135.
- [11]- Dixon-Fyle S M., Caro L., "Characterisation *in vivo* and *in vitro* of a new HU family protein from *Streptococcus thermophilus* ST11", *Plasmid.*, 42 (1999), pp.159-173.
- [12]- Garcia P., Ladero V., Alonso J.C., Suàres J E., "Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2", *J. Virol.*, 73 (1999), pp.3920-3929.
- [13]- Geoffroy M.C., Guyard C., Quatannens B., Pavan S., Lange M., Mercenier A., "Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacteria strains under development as live vaccine vectors", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000), pp.383-391.
- [14]- Gosalbes M.J., Esteban C.D., Galan J.L., Perez-Martinez G., "Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (11) (2000), pp.4822-4828.
- [15]- Hemme D., Gaier W., Winters D.A., Foucaud C., Vogel R.F., "Expression of *Lactobacillus casei* ATCC 393 beta-galactosidase encoded by plasmid Plz15 in *Lactococcus lactis* CNRZ 1123", *Lett. Appl. Microbiol.*, 19 (5) (1992), pp.345-348.
- [16]- Herrero M., de Los Reyes-Gavilàn C.J.L., Suàres J.E., "Characterisation of  $\phi$ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*", *Microbiology*, 140 (1994), pp.2585-2590.
- [17]- Hill C., "Bacteriophage and bacteriophage resistant in lactic acid bacteria", *FEMS Microbiol. Rev.* 12 (1993), pp.87-108.
- [18]- Holmes D.S., Quigley M., "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid", *Anal. Biochem.*, 114 (1981), pp.193-197.
- [19]- Hols P., Slos P., Dutot P., Reymund J., Chabot P., Deplace B., Delcour J., Mercenier A., "Efficient secretion of the model antigen M6-gp41E" in *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826, *Microbiology*, 143 (1997), pp.2733-2741.
- [20]- Hubert J.C., Bach M.L., Lacroute F., "Measure of assymetrical transcription of the yeast OMP decarboxylase gene expressed in yeast or in *E. coli*", *Current. Genet.*, 2 (1980), pp.103-107.
- [21]- Huang D.Q., Prevost H., Kihal M., Diviès C., "Instability of plasmid encoding for B-galactosidase in *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*", *J. Basic. Microbiol.*, 34 (1994), pp.23-30.
- [22]- Kihal M, Prevost H., Lhotte M.E., Huang D.Q., Diviès C., "Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*", *J. Appl. Microbiol.*, 22 (1996), pp.219-223.
- [23]- Klaenhammer T. R., "A general method for plasmid isolation in lactobacilli", *Current Microbiol.*, 35 (1984), pp.23-28.
- [24]- Lee Wickner L.J., Chassy B.M., "Molecular cloning and characterisation of cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus casei*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (1985), pp.1154-1161.
- [25]- Leer R.J., van Luijk N., Posno M., Pouvels P.H., "Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014", *Mol. Gen. Genet.*, 234 (2) (1992), pp.265-272.
- [26]- Lerch H.P., Blocker H., Kallwass H., Hoppe J., Tsai H., Collins J., "Cloning, sequencing and expression in

- Escherichia coli* of the D-2-hydroxysocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*", *Gene.*, 78 (1) (1989), pp.47-57.
- [27]- Maassen C.B., Laman J.D., den Bak-Glashouwer M.J., Tielen F.J., van Holten-Neelen J.C., Hoogteijling L., Antonissen C., Leer R.J., Pouwels P.H., Boersma W.J., Shaw D.M., "Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis", *Vaccine.*, 17 (17) (1999), pp.2117-2118.
- [28]- Mandel M., Higa A., Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 (1970), 159-162.
- [29]- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., *Molecular Cloning : A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- [30]- Marteau P., Rambaud J.C., "Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man", *FEMS Microbiol. Rev.*, 12 (1993), pp.207-222.
- [31]- Mercenier A., "Lactic acid bacteria as live vaccines", in : Tannok G.M. (Eds), *Probiotics : a critical review.* Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. (1999), pp. 113-127
- [32]- Meyers G.A., Sanchez D., Elwell L.P., FalKaw S., "Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid desoxyribonucleic acid", *J. Bacteriol.*, 127 (1976), pp.1529-1537.
- [33]- Moscovo M., Suarez J.E., "Characterization of the DNA replication module of bacteriophage A2 and use of its origin of replication as a defense against infection during milk fermentation by *Lactobacillus casei*", *Virology*, 273 (1) (2000), pp.101-111.
- [34]- O'Sullivan T., van Sinderen D., Fitzgerald G., "Structural and functional analysis of pCI65st, a 6,5 Kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6", *Microbiology*, 145 (1999), pp.127-134.
- [35]- Perez-Arellano I., Zuniga M., Perez-Martinez G., "Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*", *Plasmid*, 46 (2) (2001), pp.106-116.
- [36]- Posno M., Leer R.J., van Rijn J.M.M., Lokman B.C., Pouwels P.H., "Transformation of *Lactobacillus plantarum* by plasmid-DNA", in : Ganesan A.T., Hoch J.A. (Eds), *Genetics and biotechnology of bacilli*, vol. 2. Academic Press, Inc., New York, N.Y., (1998), pp. 397-401
- [37]- Salminen S., Isolauri E., Salminen E., "Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier : succesful strains and future challenges", *Anatomie Leeuwenhoek*, 70 (1996), pp.347-358.
- [38]- Scolari G., Torriani S., Vescoco M., "Partial characterization and plasmid linkage of non-proteinaceous antimicrobial compound in a *Lactobacillus casei* strain of vegetable origin", *J. Appl. Microbiol.*, 86 (4) (1999), pp.682-688.
- [39]- Shevelev A.B., Aleoshin V.V., Trachuk L.A., Granovsky A.E., Kogan Y.N., Rumer L.M., Serkina A.V., Semenova E.V., Bushueva A.M., Livshits V.A., Kostrov S.V., Novikova A.S., Chestukhina G.G., "Expression of Bacillar Glutamyl Endopeptidase Genes in *Bacillus subtilis* by a New Mobilizable Single-Replicon Vector pLF", *Plasmid*, 43 (2000), pp.190-199.
- [40]- Shimizu-Kadota M., Shibahara-Sone H., Ishiwa H., "Shuttle plasmid vectors for *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* with a minus origin", *Appl., Environ., Microbiol.*, 57 (11) (1991), pp.67-75.
- [41]- Solaiman D.K., Somkuti G.A., Steinberg D.H., "Construction and characterization of shuttle plasmids for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*" *Plasmid*, 28 (1) (1992), pp.25-36.
- [42]- Solaiman D.K., Somkuti G.A., "Characterisation of a novel *Streptococcus thermophilus* rolling-circle plasmid used for vector construction", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50 (1998), pp.174-180.
- [43]- Takala M., Saris J., Tynkkynen H., "Food-grade host /vector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phospho-beta-galactosidase gene lacG", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60 (5) (2003), pp.564-570.
- [44]- Thompson J.K., Foley S., McConville K.J., Nickolson C., Collins M.A., Predimore R.D., "Complete sequence of plasmid pLH1 from *Lactobacillus helveticus* ATCC15009 : analysis reveals the presence of regions homologous to other native plasmids from the host strain", *Plasmid*, 42 (1999), pp.321-335.
- [45]- Vanderslice P., Copeland W.C., Robertus J.D., "Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a\*", *J. Biological. Chem.*, 261 (1986), pp.15186-15191.
- [46]- Viera J., Messing J., The pUC plasmids, an M 13mp7 derived system for insertional mutagenesis and sequencing with universal primers. *Gene.* 19 (1982), 259-268.
- [47]- Wei M.Q., Ruch C.M., Nonma J.M., Hafner L.M., Epping L.J., Timmus P., "An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation", *J. Microbiol. Methods*, 21 (1995), pp.97-109.
- [48]- Yamamoto N., Takano T., "Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus helveticus* CP53", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60 (12) (1996), pp.2069-2070.
- [49]- Zegers N.D., Kluter E., van Der Stap H., van Dura E., van Dalen P., Shaw M., Baillie L., "Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax", *J. Appl. Microbiol.*, 87 (2) (1999), pp.309-314. □