

HÉLÈNE DEVEAU

**BIODIVERSITÉ DES BACTÉRIOPHAGES
INFECTANT *LACTOCOCCUS LACTIS***

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Département de biochimie et de microbiologie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

AOUT 2006

© Hélène Deveau, 2006

Résumé

L'objectif de cette thèse consistait à analyser la biodiversité des bactériophages infectant *Lactococcus lactis*. Les bactériophages sont l'une des principales causes d'inhibition de plusieurs procédés de fermentation. L'entrée continue de virions via le lait cru et l'absence d'une méthode efficace d'inactivation complète des phages dans l'industrie laitière empêche leur élimination. L'étude de la biodiversité des phages et de leur évolution permettra une action ciblée et une gestion plus intelligente des stratégies anti-phages actuellement disponibles. Depuis quelques années, la classification courante des phages de lactocoques fait l'objet de critiques. Ainsi, les bactériophages de référence représentant les espèces reconnues dans la littérature ainsi que des phages dont l'espèce n'avait pu être identifiée par diverses méthodes ont été étudiés. Une nouvelle proposition de classification contenant dix espèces de phages de *L. lactis* dont deux nouvelles jamais décrites auparavant a été soumise. De plus, des modifications ont été apportées à la méthode de détection par PCR multiplex des trois espèces prédominantes de phages de *L. lactis*. La seconde partie du projet porte sur la biodiversité des phages de *L. lactis* dans une usine québécoise fabriquant du fromage Cheddar. Ainsi, 25 bactériophages de *L. lactis* ont été isolés, classés dans l'une des espèces connues de phages de *L. lactis* et comparés par leur profil RFLP et leur spectre lytique. Dans la troisième section, l'isolement de huit phages de l'espèce 936 infectant des souches de lactocoques productrices d'exopolysaccharides (EPS) a démontré que les EPS ne représentent pas une barrière efficace contre les phages de cette espèce. Des modifications ont également été proposées pour la méthode de classification des souches EPS⁺ de *L. lactis* par analyse du polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP). Finalement, bien que l'espèce 936 soit la plus fréquemment rencontrée, uniquement deux séquences génomiques complètes étaient disponibles au début de ce projet. L'analyse de la séquence nucléotidique de trois génomes additionnels apporte de l'information supplémentaire sur la biodiversité des phages à l'intérieur d'une même espèce.

Avant-propos

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Sylvain Moineau. Il y a bientôt huit ans, je partais de chez moi tremblante et nerveuse pour ma toute première journée dans son laboratoire. Son support et ses conseils me permettent maintenant d'affronter le « vrai » monde du travail avec confiance. L'une des nombreuses qualités du Dr Moineau est de savoir bien s'entourer, ce qui m'a donné l'occasion de travailler au sein d'une équipe extrêmement dynamique. Un trop grand nombre de gens sont passés dans le laboratoire depuis mon arrivée pour en faire une liste exhaustive mais, je vous rassure, ce fut un plaisir de travailler avec chacun d'eux.

Cependant, je me dois de souligner l'aide précieuse de Steve Labrie qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée au laboratoire et de Denise Tremblay, la maman officielle du laboratoire. Je tiens également à remercier Julie, Isabelle, Nathalie et Simon pour les nombreuses conversations (presque toujours scientifiques) stimulantes et les idées judicieuses. Un merci spécial à Martin Duplessis car, après plus de 20 ans à le côtoyer, je suis toujours impressionnée par son intelligence, sa gentillesse et son sens de l'humour.

Merci aux membres de mon comité aviseur, le Dr Denis Roy et la Dr Gisèle LaPointe, qui me suivent depuis le début de mes études graduées. Merci également au Dr Marie-Rose van Calsteren qui m'a accueillie dans son laboratoire pour certaines analyses. Merci aussi à tous les organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de mes travaux soit, le FCAR (FQRNT), le CRSNG, le Réseau de recherche sur les bactéries lactiques, Novalait, le CQVB, Agriculture et agroalimentaire Canada, l'Institut Rosell-Lallemand inc. et les Producteurs laitiers du Canada.

Finalement, merci à Yanick qui fut le souffre-douleur des jours plus sombres. Merci pour ta patience, ton calme, ton amour... Bref, merci d'être toi! Une partie de cette thèse te revient. J'aimerais terminer ces remerciements avec mes parents, Colette et Fernand. Sans votre support, tout ceci aurait été impossible.

*À mes parents, Coco et Fern,
merci pour tout...*

*Dans le domaine de l'observation, la
chance favorise les esprits préparés.*

Louis Pasteur

*The most exciting phrase to hear in
science, the one that heralds new
discoveries, is not 'Eureka!' but
'That's funny...'*

Isaac Asimov

Table des matières

Résumé.....	II
Avant-propos	III
Table des matières	V
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations.....	X
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 La fermentation et les bactéries lactiques	1
1.1.1 Les lactocoques.....	2
1.2 Les bactériophages.....	4
1.2.1 Taxonomie des virus.....	4
1.2.2 Les phages infectant <i>Lactococcus lactis</i>	10
1.3 Les bactériophages: de l'adsorption à la lyse	12
1.3.1 Adsorption et pénétration de l'ADN.....	13
1.3.2 Réplication et transcription.....	15
1.3.3 Assemblage et encapsidation	16
1.3.4 La lyse.....	20
1.3.5 La lysogénie	20
1.4 La génomique des phages.....	22
1.4.1 Les génomes de phages de lactocoques.....	23
1.5 Le combat contre les phages en industrie	24
1.5.1 Les mécanismes de résistance aux phages présents chez la bactérie.....	25
1.5.2 Les mécanismes d'exclusion des phages.....	32
1.5.3 Les mécanismes artificiels.....	32
1.6 Les exopolysaccharides	34
1.6.1 Les EPS produits par les bactéries lactiques.....	34
1.6.2 Les EPS et les phages	37
1.7 Problématique et objectifs du projet de recherche.....	38
Chapitre 2 Biodiversité et classification des phages de lactocoques.....	39
2.1 Résumé.....	39
2.2 Avant-propos	40
2.2.1 Contribution des auteurs	40
2.2.2 Publication	40
2.3 Abstract.....	41
2.4 Introduction.....	42
2.5 Materials and Methods.....	44
2.6 Results.....	47
2.7 Discussion.....	53
2.8 Acknowledgments	57
2.9 References.....	58
Chapitre 3 Caractérisation de ferments mésophiles mixtes utilisés dans la fabrication de fromage Cheddar de maturation	62
3.1 Résumé.....	62

3.2	Avant-propos	63
3.2.1	Contribution des auteurs	63
3.2.2	Publication	63
3.3	Abstract	64
3.4	Introduction.....	65
3.5	Materials and Methods.....	66
3.6	Results.....	69
3.7	Discussion.....	77
3.8	Acknowledgments	79
3.9	References.....	80
Chapitre 4	Effet des exopolysaccharides sur les interactions phage-hôte chez <i>Lactococcus lactis</i>	82
4.1	Résumé.....	82
4.2	Avant-propos	83
4.2.1	Contribution des auteurs	83
4.2.2	Publication	83
4.3	Abstract	84
4.4	Introduction.....	85
4.5	Materials and Methods.....	87
4.6	Results and Discussion	90
4.7	Acknowledgments	95
4.8	References.....	96
Chapitre 5	Utilisation d'une méthode RFLP pour la caractérisation rapide de souches de <i>Lactococcus lactis</i> productrices d'exopolysaccharides	99
5.1	Résumé.....	99
5.2	Avant-propos	99
5.2.1	Contribution des auteurs	99
5.2.2	Publication	99
5.3	Abstract	100
5.4	Introduction, Methods, Results, and Discussion.....	100
5.5	Acknowledgments	105
5.6	References.....	106
Chapitre 6	Analyse comparative de cinq génomes de phages de l'espèce 936 infectant <i>Lactococcus lactis</i>	107
6.1	Résumé.....	107
6.2	Avant-propos	108
6.2.1	Contribution des auteurs	108
6.2.2	Publication	108
6.3	Abstract.....	109
6.4	Introduction.....	110
6.5	Results.....	112
6.6	Discussion.....	124
6.7	Materials and Methods.....	127
6.8	Acknowledgments	129
6.9	References.....	130
Chapitre 7	Discussion et perspectives	134
7.1	La biodiversité des phages infectant <i>L. lactis</i>	134

7.1.1	L'espèce P335	135
7.1.2	Réflexions sur la classification	136
7.1.3	Le PCR multiplex	139
7.2	Les exopolysaccharides	140
7.2.1	Les EPS dans l'infection par les phages	140
7.2.2	La classification des opérons <i>eps</i>	140
7.3	Espèce 936 : génomes et mécanismes de résistance	141
7.4	Perspectives	142
	Bibliographie	144

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Utilisations des bactéries lactiques pour la fabrication de produits laitiers.....	1
Tableau 1.2: Caractéristiques discriminantes pour l'identification de lactocoques.....	2
Tableau 1.3: Ordre, familles et genres chez les bactériophages.....	7
Tableau 1.4: Classification actuelle des phages infectant <i>Lactococcus lactis</i>	11
Tableau 1.5: Liste des bactériophages de <i>L. lactis</i> dont le génome est séquencé	23
Tableau 1.6: Mécanismes d'avortement de l'infection (Abi) retrouvés chez <i>L. lactis</i>	30
Tableau 1.7: Classification des opérons <i>eps</i> chez <i>L. lactis</i>	36
Table 2.1: List of bacteriophages and host strains used in this study.	45
Table 2.2: Morphological diversity of bacteriophages infecting <i>Lactococcus lactis</i>	50
Table 3.1: Number of plasmid profiles, phenotypes and strains isolated	69
Table 3.2: Strains isolated from starter ML33 and their characteristics.	72
Table 3.3: Number of strains per mixed starter isolated having a particular phenotype.	73
Table 3.4: Strain sensitivity toward isolated phages.....	75
Table 4.1: Bacterial strains and bacteriophages used in this study.....	87
Table 4.2: EPS produced by seven strains and phage-sensitivity of these strains.	92
Table 4.3: Efficiency of plating of phages Q61 to Q68.....	94
Table 4.4: Adsorption percentage of phages Q62, Q63, and Q64	95
Table 5.1: Sugar composition of the EPS and hybridization patterns of total DNA.	101
Table 6.1: Characteristics of phages and their EOP against resistance mechanism.	112
Table 6.2: Coordinates of phage 712 ORFs.....	113
Table 6.3: Coordinates of phage jj50 ORFs.....	114
Table 6.4: Coordinates of phage P008 ORFs.....	115
Table 6.5: Subgroupings of the 936-like sequenced phages.....	118
Table 6.6: Lactococcal strains, plasmids, and bacteriophages used in this study.....	127

Liste des figures

Figure 1.1: Classification des phages au niveau des taxons supérieurs.....	5
Figure 1.2: Représentation des morphologies rencontrées chez les virus bactériens	6
Figure 1.3: Exemples de morphologies particulières rencontrées chez les virus bactériens.	8
Figure 1.4: Représentation d'une classe polythétique.....	9
Figure 1.5: Représentation du cycle lytique et du mécanisme de lysogénie	12
Figure 1.6: Voie d'assemblage de la queue du phage lambda.....	17
Figure 1.7: Phage TP901-1 en microscopie électronique à transmission.....	18
Figure 1.8: Modèle pour l'assemblage de la queue du phage TP901-1	19
Figure 1.9: Comparaison des différents opérons <i>eps</i> chez les lactocoques	35
Figure 2.1: Restriction profile and analysis of DNA by Southern hybridization	48
Figure 2.2: Identification of the lactococcal phage species by multiplex PCR.	52
Figure 2.3: Alignment of the genetic maps of the completely sequenced lactococcal phages belonging to the polythetic P335 species.....	55
Figure 3.1: Plasmid profiles of ML33 and NM33 isolates.	70
Figure 3.2: Restriction patterns of phage isolates.....	74
Figure 4.1: Characterization of lactococcal phages Q61 to Q68	91
Figure 5.1: Differentiation of <i>L. lactis eps</i> gene clusters by the RFLP method	102
Figure 5.2: Localization of restriction sites into the <i>eps</i> gene cluster	103
Figure 5.3: Differentiation of <i>L. lactis eps</i> gene clusters by the modified RFLP method.	105
Figure 6.1: Schematic representation of the genomic organisation of the 936-type phages jj50, sk1, 712, P008, and bIL170.....	116
Figure 6.2: Comparison of the <i>cos</i> terminal regions of the 936-type phages.....	122
Figure 7.1: Arbre phylogénétique basé sur le protéome de 105 phages.....	138
Figure 7.2: Représentation schématique des résultats obtenus avec le RFLP	141

Liste des abréviations

A	Adénine
Abi	Abortive infection (avortement de l'infection)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BIM	Bacteriophage-insensitive mutant
bp	Base pairs (paires de base)
C	Cytosine
°C	Degré Celsius
CLO	Cadre de lecture ouvert
CPS	Polysaccharides capsulaires
CsCl	Chlorure de césium
DIG	Digoxigénine
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EOP	Efficiency of plaquing (efficacité à former des plages de lyse)
EPS	Exopolysaccharides
G	Guanine
G+C	Ratio des paires de nucléotides G-C
GRAS	Generally recognized as safe
ICTV	International Commitee on Taxonomy of Viruses
LPS	Lipopolysaccharides
kb	Kilobase
kpb	Kilo paires de base
min	Minutes
MOI	Multiplicity of infection (multiplicité d'infection)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
ori	Origine de réplication
pb	Paires de base
PCR	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de la polymérase)
PEG	Polyéthylène glycol
pfu	Plaque forming units (unités formant des plages de lyse)
pI	Point isoélectrique
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
R/M	Restriction/Modification
SDS	Sodium dodécylsulfate
T	Thymine
TAE	Tris-acetate EDTA
ufp	Unités formant des plages de lyse
UV	Ultraviolets

Chapitre 1

Introduction

1.1 La fermentation et les bactéries lactiques

Plusieurs procédés de fermentation des breuvages et des aliments sont utilisés pour augmenter la durée de conservation et la saveur de ceux-ci. En fait, ce sont les plus anciens exemples d'utilisation directe des microorganismes par les humains. Plusieurs historiens croient qu'ils seraient apparus peu de temps après le développement de l'agriculture (McGovern *et al.*, 2004) bien que l'origine microbienne de ces phénomènes ne fut comprise que plus tard par Louis Pasteur (1822-1895). Lors de la fabrication de produits laitiers fermentés, on inocule le lait avec un ferment constitué de plusieurs souches bactériennes distinctes (Tableau 1.1). On regroupe sous le vocable de bactéries lactiques une grande variété de genres bactériens à Gram positif utilisés dans l'industrie alimentaire pour leur capacité à métaboliser un sucre en acide lactique. Le genre, l'espèce et la souche utilisés sont sélectionnés en fonction de plusieurs critères technologiques.

Tableau 1.1: Utilisations des bactéries lactiques pour la fabrication de produits laitiers fermentés (d'après Champagne, 1998 et Sharpe, 1979).

Produits	Espèces utilisées	
Babeurre	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Leuconostoc lactis</i>	
Crème sure	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Leuconostoc lactis</i>	
Yogourt	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sous-espèce <i>bulgaricus</i>	
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Fromage	Cheddar	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Streptococcus thermophilus</i>
	Mozarella	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sous-espèce <i>bulgaricus</i>
		<i>Lactobacillus helveticus</i>
	Suisse	<i>Streptococcus thermophilus</i>
		<i>Lactococcus lactis</i>

1.1.1 Les lactocoques

Le genre *Lactococcus* est divisé en cinq espèces: *L. garvieae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum*, *L. piscium* et *L. lactis* (Schleifer *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1990). On distingue les différentes espèces et sous-espèces de lactocoques par des tests microbiologiques (Tableau 1.2) ainsi que par l'analyse de la séquence nucléotidique du gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S (Pu *et al.*, 2002; Salama *et al.*, 1991). Les espèces *L. garvieae* et *L. lactis* ne peuvent cependant pas être différenciées de façon certaine par des tests biochimiques autre que leur résistance à différents antibiotiques (Elliott *et al.*, 1991; Elliott et Facklam, 1996). Les cellules de lactocoques sont ovoïdes et forment de courtes chaînettes de longueur variable. On les retrouve dans des environnements très variés. En effet, les espèces *L. garvieae* et *L. piscium* sont des pathogènes émergents en aquaculture. L'espèce *L. garvieae*, autrefois appelée *Enterococcus seriolicida*, a également été associée à des mammites bovines ainsi qu'à certaines infections humaines en plus d'avoir été retrouvée chez une grande variété de sources animales et dans les sols agricoles (Fefer *et al.*, 1998). L'espèce *plantarum* est associée aux végétaux. La microflore présente dans la viande emballée sous atmosphère modifiée ou dans les légumes congelés est souvent composée, entre autres, de souches de *L. piscium*, *L. raffinolactis* et *L. plantarum* (Pu *et al.*, 2002; Sakala *et al.*, 2002a; 2002b). Des souches de *L. raffinolactis* ont également été retrouvées dans le lait cru et l'environnement des fermes laitières, sur les carottes de jardin ainsi que dans l'estomac et le tractus intestinal de termites et de bovins (Barakat *et al.*, 2000).

Tableau 1.2: Caractéristiques phénotypiques discriminantes pour l'identification des différentes espèces et sous-espèces de lactocoques (d'après Holt *et al.*, 1994; Sakala *et al.*, 2002a; 2002b; Schleifer *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1990).

	<i>Lactococcus</i>							
		<i>piscium</i>	<i>garvieae</i>	<i>plantarum</i>	<i>raffinolactis</i>	<i>lactis</i>		
						<i>cremoris</i>	<i>hordniae</i>	<i>lactis</i>
Fermentation de:								
	Maltose	+	+	+	+	-	-	+
	Raffinose	+	-	-	+	-	-	-
Croissance:								
	à 0°C	+	-	-	-	-	-	-
	à 40°C	-	+	-	-	-	-	+
	avec 4% de NaCl	-	+	+	-	-	-	+
Utilisation de l'arginine		-	+	-	-	-	+	+

Symbole : +, 80% et plus des souches sont positives; -, 80% et plus des souches sont négatives.

L. lactis est la seule espèce à être utilisée par l'industrie alimentaire. Elle se divise en trois sous-espèces: *cremoris*, *hordniae* et *lactis*. Des membres de la sous-espèce *hordniae* ont été isolés à partir d'insectes (Pu *et al.*, 2002) alors que les deux autres sont très présentes dans l'environnement des fermes laitières et participent à près du tiers des fermentations effectuées dans le monde (Brüssow, 2001). Pour la fabrication du cheddar québécois, les souches de *L. lactis* sous-espèce *cremoris* dominent les ferments (Bissonnette *et al.*, 2000). La différence historique entre les sous-espèces *cremoris* et *lactis* est la capacité des souches de *L. lactis* sous-espèce *lactis* de produire de l'ammoniac à partir de l'arginine. Les analyses récentes de 18 souches industrielles démontraient que ce trait phénotypique n'était pas un bon indicateur car, pour trois des souches, le génotype (analyse de l'ARNr 16S) et le phénotype (utilisation de l'arginine) ne correspondaient pas (Pu, *et al.*, 2002). Ces sous-espèces possèdent plusieurs caractéristiques similaires et leurs différences phénotypiques peuvent souvent s'expliquer par la présence d'un plasmide. Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* se divise également en biovar (Sharpe, 1979). Par exemple, *L. lactis* sous-espèce *lactis* biovar *diacetylactis* est utilisée dans la fabrication de la crème sure et du babeurre pour la saveur particulière qu'apporte la production de diacétyl lors de l'utilisation du citrate par ces souches.

Tout dépendant du type de produits fabriqués et des mesures de contrôle prises par l'usine laitière, de 0,1 à 10% des fermentations industrielles connaissent des problèmes causés par les phages. Ces problèmes peuvent passer d'un ralentissement de la fermentation à l'arrêt complet de celle-ci, ce qui engendre des problèmes de saveur et de texture du produit final (Moineau et Lévesque, 2005). Au Canada en 2004, chaque habitant a consommé en moyenne 11,97 kg de fromage (dont 3,78 kg était du cheddar) et 6,28 litres de yogourt. Les recettes totales de la production laitière approchaient le 4,6 milliard de dollars et la production de fromage représente, à elle seule, 33% du lait utilisé au Canada (Source : Centre canadien d'information laitière, Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2005). Les phages demeurent le principal problème lors de ces fermentations en raison de leur réplification rapide, du grand nombre de virions libérés après un cycle d'infection et de la nature liquide du lait et du lactosérum qui favorise leur dispersion.

1.2 Les bactériophages

Il y a bientôt 90 ans qu'on connaît l'existence des phages puisqu'ils ont été décrits pour la première fois par l'anglais Frederick William Twort en 1915 et le montréalais Félix Hubert d'Hérelle en 1917. C'est d'ailleurs à d'Hérelle que l'on doit le nom « bactériophage » qui signifie littéralement mangeur de bactéries (Summers, 2005). Les phages sont ubiquitaires car on les retrouve partout où l'on rencontre des bactéries. Différentes estimations permettent de croire qu'il y aurait environ 10^{30} - 10^{32} bactériophages sur la planète ce qui en fait l'organisme le plus abondant de la biosphère (Hendrix *et al.*, 1999; Rohwer et Edwards, 2002). Depuis leur première observation au microscope électronique en 1959, une somme considérable d'informations sur leur morphologie a été accumulée. Les plus récentes revues sur le sujet rapporte que, depuis, un peu plus de 5000 phages ont été observés (Ackermann, 2001; 2003).

1.2.1 Taxonomie des virus

Depuis plusieurs années, trois domaines sont acceptés en taxonomie. Il s'agit des domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya* (Woese et Fox, 1977). Les virus demeuraient cependant dans une zone grise, leur statut d'organisme vivant pouvant être longuement débattu. Récemment, un quatrième domaine a été proposé : le domaine *Akamara* contenant tous les agents infectieux dits « acellulaires » possédant un génome d'acide nucléique ce qui englobe tous les virus, viroïdes et virusoïdes (Weinbauer, 2004). Le domaine *Akamara* se redivise en deux règnes : *Euviria* (les « vrais » virus) et *Viroidia*. Les phages sont tous du domaine *Akamara* et du règne *Euviria*. Le règne *Euviria* se divise ensuite en deux embranchements selon la nature du matériel génétique (ADN ou ARN). La classe est déterminée par l'arrangement de ce même matériel (Figure 1.1).

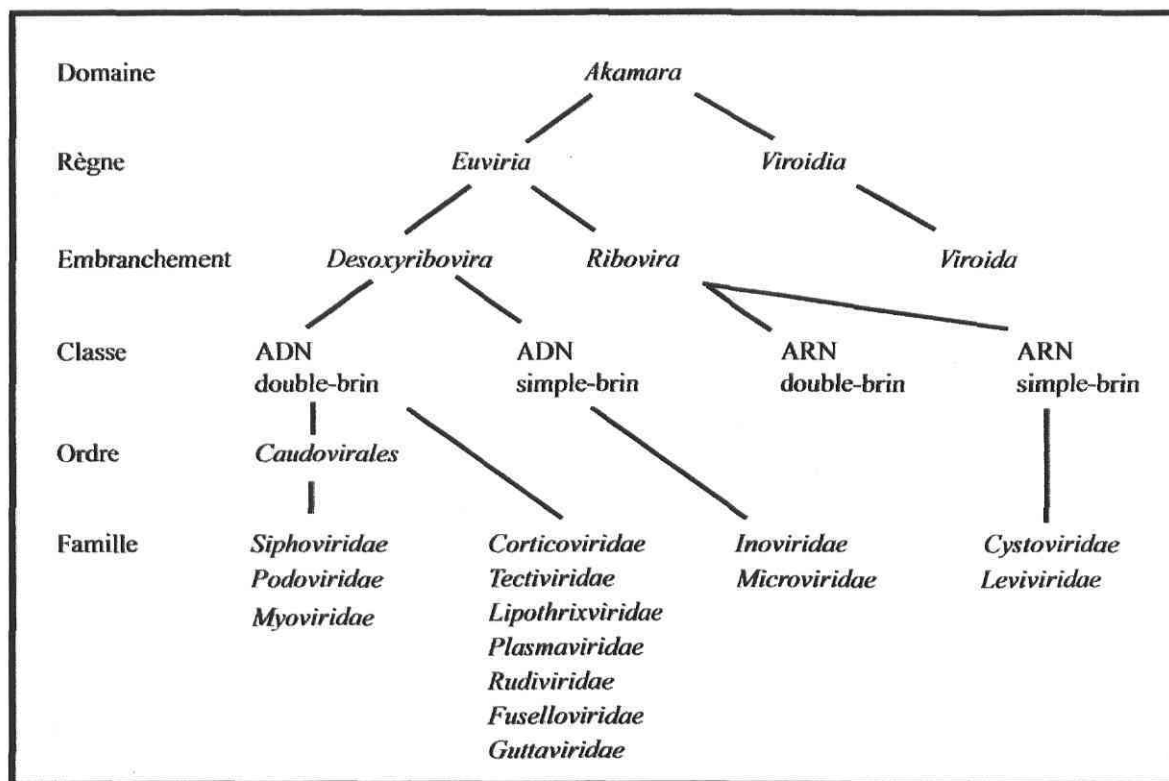


Figure 1.1: Classification des phages au niveau des taxons supérieurs (inspirée de Weinbauer, 2004).

L'organisme responsable de la nomenclature et de la taxonomie des virus s'appelle l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Cet organisme reconnaît 3 ordres, 73 familles, 287 genres et plus de 1950 espèces pour l'ensemble des virus (Fauquet *et al.*, 2005). La morphologie et la nature du matériel génétique sont les critères sélectifs pour les taxons supérieurs. Cette classification inclut 21 morphotypes distincts chez les virus bactériens (Figure 1.2) qui sont regroupés en 1 ordre, 14 familles et 37 genres (Tableau 1.3).

L'ordre des *Caudovirales* englobe tous les bactériophages qui possèdent une queue, d'où leur nom (*Caudo* vient du latin *cauda* qui signifie queue). Ils ont également tous un génome d'ADN double-brin compacté dans une capsidie protéique isométrique (85% des phages caudés observés) ou allongée (15%). La grande majorité (96%) des virus bactériens connus appartiennent à cet ordre (Ackermann, 2001; 2003). Les espèces bactériennes qu'ils infectent sont très variées. En effet, les eubactéries autant que les archaebactéries peuvent

être sujet à l'infection par des phages caudés. Selon la structure de la queue, les *Caudovirales* sont par la suite divisés en trois familles (Figure 1.2). Le quart des phages caudés possède une longue queue contractile caractéristique de la famille des *Myoviridae*. La présence d'une petite queue non contractile est un phénomène plus rarement observé (14%) et les phages possédant cette morphologie appartiennent à la famille des *Podoviridae*. Finalement, la famille la plus importante de cet ordre (62%) est celle des *Siphoviridae* dont les membres possèdent une longue queue non contractile.

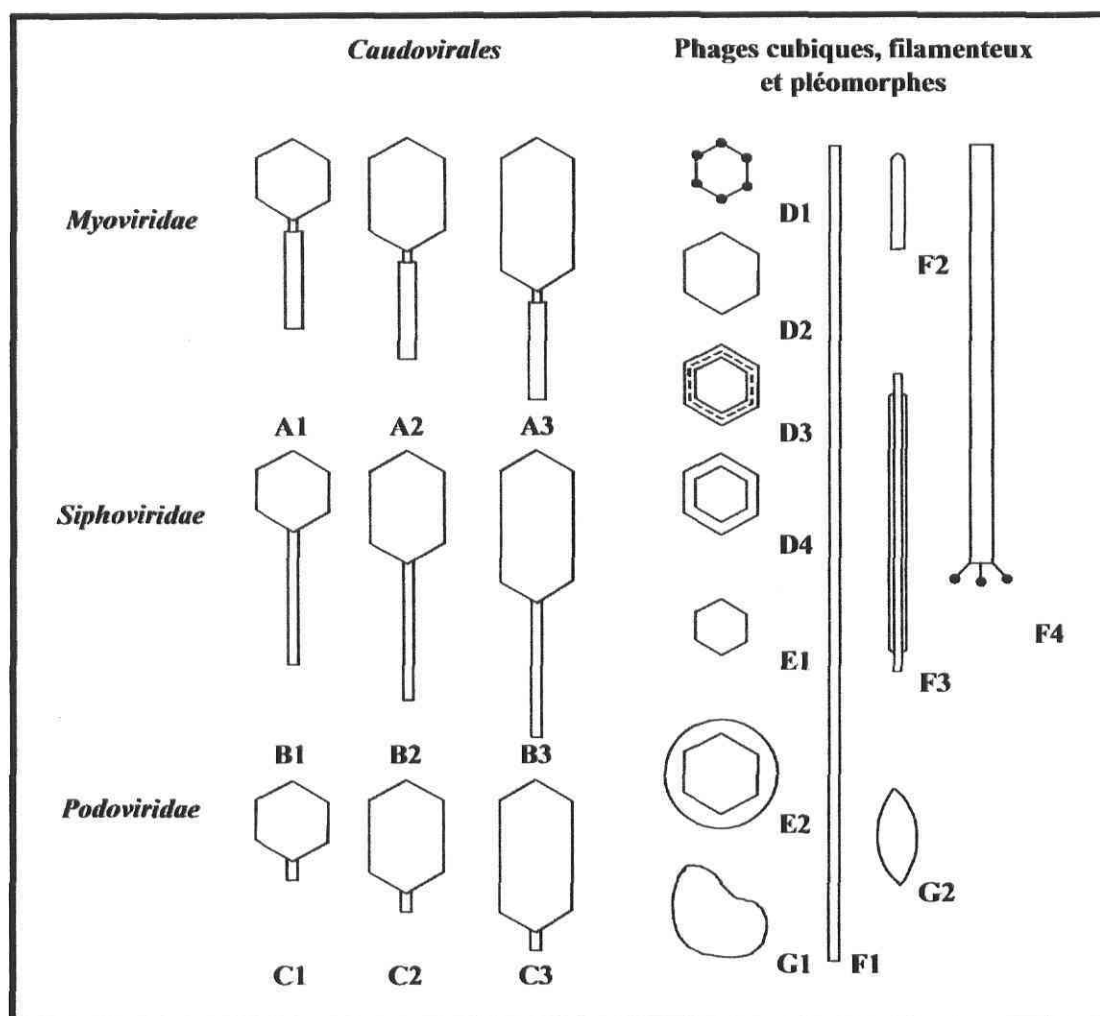


Figure 1.2: Représentation des différentes morphologies rencontrées chez les virus bactériens (adaptée de Ackermann, 2001).

Tableau 1.3: Ordre, familles et genres chez les bactériophages (Ackermann, 2005; Fauquet *et al.*, 2005).

Ordre ou groupe	Famille	Morphotype	Genre	Exemple
Caudovirales	<i>Myoviridae</i>	A	T4-like viruses	T4
			P1-like viruses	
			P2-like viruses	
			Mu-like viruses	
			SPO1-like viruses	
	<i>Siphoviridae</i>	B	lambda-like viruses	λ
			T1-like viruses	
			T5-like viruses	
			L5-like viruses	
			c2-like viruses	
<i>Podoviridae</i>	C	Ψ M1-like viruses	T7	
		φC31-like viruses		
		N15-like viruses		
		T7-like viruses		
		P22-like viruses		
Polyhédral	<i>Microviridae</i>	D1	φ29-like viruses	φX174
			N4-like viruses	
			<i>Microvirus</i>	
			<i>Bdellomicrovirus</i>	
	<i>Corticoviridae</i>	D3	<i>Chlamydiomicrovirus</i>	PM2
			<i>Spiromicrovirus</i>	
			<i>Corticovirus</i>	
<i>Tectiviridae</i>	D4	<i>Tectivirus</i>	PRD1	
		<i>Leviviridae</i>		E1
Filamenteux	<i>Cystoviridae</i>	E2	<i>Allolevivirus</i>	
			<i>Cystovirus</i>	
	<i>Inoviridae</i>	F2	<i>Inovirus</i>	fd
			<i>Plectrovirus</i>	
			<i>Lipothrixviridae</i>	
<i>Betalipothrixvirus</i>				
<i>Gammalipothrixvirus</i>				
Pléomorphique	<i>Rudiviridae</i>	F4	<i>Rudivirus</i>	SIRV-1
	<i>Plasmaviridae</i>	G1	<i>Plasmavirus</i>	L2
	<i>Fuselloviridae</i>	G2	<i>Fusellovirus</i>	SSV1
			<i>Salterprovirus</i>	
	<i>Guttaviridae</i>	G2	<i>Guttavirus</i>	SNDV

Les onze autres familles n'appartiennent à aucun ordre. Il s'agit des phages cubiques, filamenteux et pléomorphes. Ces morphotypes sont cependant rarement observés et ne représentent que 4% des phages décrits dans la littérature (Ackermann, 2001; 2003). La famille *Guttaviridae* et le genre *Guttavirus* ont été proposés et acceptés dans le 8^{ième} rapport de l'ICTV (Fauquet *et al.*, 2005; Häring *et al.*, 2004) mais il semblerait maintenant possible de classer ces phages dans la famille des *Fuselloviridae* (Ackermann, 2005). De nouveaux phages présentant une morphologie particulière ont été observés au cours des dernières années (Figure 1.3). Ces phages seront éventuellement ajoutés à la classification officielle de l'ICTV.

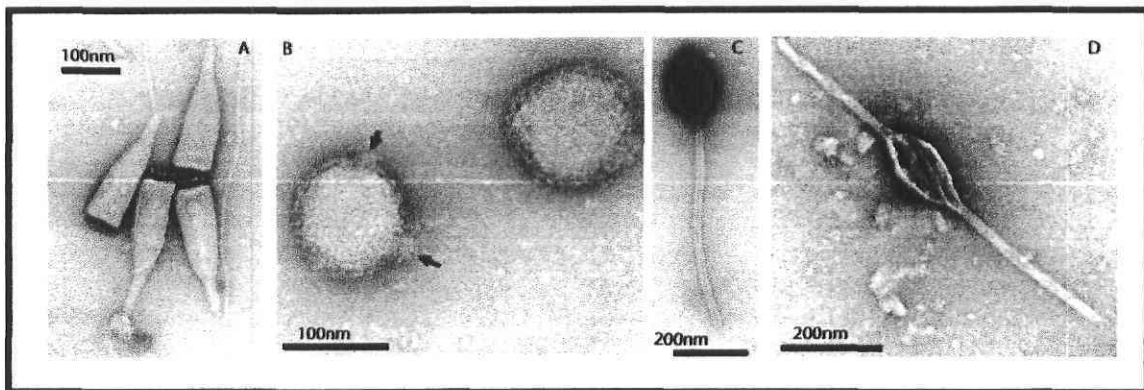


Figure 1.3: Exemples de morphologies particulières rencontrées chez les virus bactériens (adaptée de Häring *et al.*, 2004, 2005; Rachel *et al.*, 2002). Photographie A- Bactériophage ABV représentant de la nouvelle famille *Ampullaviridae*. Photographie B-Bactériophage PSV représentant de la famille *Globuloviridae*. Photographies C et D-Particules virales observées dans un échantillon provenant d'une source thermique.

Contrairement aux taxons supérieurs qui sont assignés selon le morphotype et la nature du matériel génétique, il n'existe pas de critère unique pour délimiter un genre (van Regenmortel *et al.*, 2000). Le mécanisme d'encapsidation du génome (site *cos*, site *pac* ou protéine terminale), le nombre et la masse des protéines structurales, la présence d'un gène codant pour une ADN ou ARN polymérase, d'un module de lysogénie et la forme de la capsid sont autant de critères variant selon le genre défini. Jusqu'à présent, les phages appartenant au même genre viral infectent des genres bactériens identiques ou apparentés. Plusieurs phages n'appartiennent à aucun genre. Donc, il reste beaucoup de travail afin d'établir de façon claire ce taxon.

Le concept d'espèce est encore plus problématique. Tout d'abord, en biologie, une espèce est constituée de membres qui peuvent se reproduire entre eux et dont la descendance est fertile. Cette définition ne s'applique qu'aux organismes sexués. Chez les bactéries, il est possible de définir des caractères communs à tous les membres d'une même espèce malgré l'absence de reproduction sexuée. Ces deux définitions voient l'espèce comme une classe universelle c'est-à-dire que chacun des membres possède certaines caractéristiques communes à tous. Pour les virus, ce concept de classe universelle ne s'applique pas (Ackermann *et al.*, 1992; Maniloff et Ackermann, 1998). L'ICTV définit une espèce virale comme étant une classe polythétique de virus qui constitue une lignée répliquative et qui occupe une niche écologique particulière (Fauquet *et al.*, 2005; Nelson, 2004). Une classe polythétique est un groupe dans lequel aucune caractéristique n'est présente chez tous les membres du groupe mais que chacun des membres partagent assez de similarité avec au moins un autre membre pour qu'on les reconnaisse comme du même groupe (Figure 1.4).

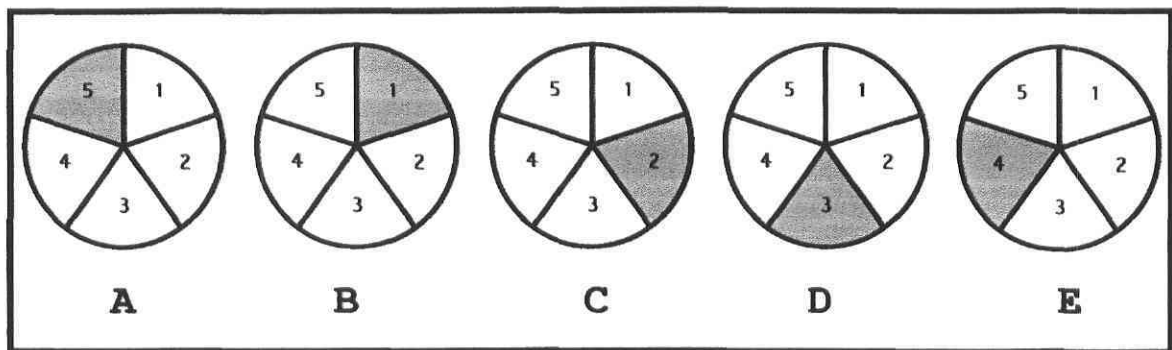


Figure 1.4: Représentation d'une classe polythétique. Chaque cercle représente un membre de l'espèce. Chaque portion du cercle représente une caractéristique. En blanc, la caractéristique est présente; en gris, elle est absente (adaptée de van Regenmortel et Mahy, 2004).

Bien qu'il existe une définition officielle de l'espèce chez les virus, plusieurs espèces demeurent en attente d'une reconnaissance officielle par l'ICTV et sont alors appelées des « tentative species ». Ces différentes propositions d'espèces sont cependant utilisées. La dimension et la présence de structure fine, l'homologie d'ADN et le spectre d'hôte sont autant de critères pouvant décrire une espèce selon l'ICTV.

1.2.2 Les phages infectant *Lactococcus lactis*

Les bactériophages qui infectent des souches de *L. lactis* arrivent au deuxième rang du nombre de phages observés et rapportés dans la littérature (13% des observations) devancés de peu par les phages d'entérobactéries (16%). L'intérêt qu'on leur porte s'explique en grande partie par l'importance des lactocoques en industrie. Ces phages possèdent tous un génome d'ADN double-brin et une queue non contractile. Ils appartiennent donc à l'ordre des *Caudovirales* et à la famille des *Siphoviridae* ou des *Podoviridae* (Ackermann *et al.*, 1984; 1992; Braun *et al.*, 1989; Jarvis *et al.*, 1991). Cependant, la morphologie de leur capsid et la longueur de leur queue demeurent très variées. En effet, on retrouve des phages de morphotype B1, B2, C2 ou C3 (Figure 1.2).

Dans la littérature, les bactériophages infectant *L. lactis* sont divisés en douze espèces selon leur homologie d'ADN et leur morphologie (Tableau 1.4). Dix de ces espèces appartiennent à la famille des *Siphoviridae*. Toutefois, les espèces 936, P335, BK5-T, 1358, 1483, T187 et P107 montrent des caractères morphologiques très semblables. Les espèces P087 et 949 ont une capsid légèrement plus volumineuse (mais toujours isométrique) ce qui est nécessaire car ces deux phages ont un plus gros génome. L'espèce c2, avec sa capsid allongée, diverge des autres *Siphoviridae* infectant les lactocoques. Deux espèces seulement possèdent une courte queue et appartiennent à la famille des *Podoviridae*. En effet, l'espèce P034, avec sa capsid légèrement allongée, a un morphotype C2 alors que l'immense capsid de KSY1 est caractéristique d'un morphotype C3. Cependant, la vaste majorité des phages isolés dans les usines laitières appartiennent aux espèces 936, c2 ou P335 (Bissonnette *et al.*, 2000; Coffey *et al.*, 2001; Moineau *et al.*, 1992; 1996). En conséquence, la plupart des études portant sur les phages de lactocoques ne tiennent compte que de ces trois espèces. Pour caractériser les différents phages d'une même espèce, le profil de restriction de l'ADN du phage ainsi que son spectre lytique sont couramment utilisés (Jarvis, 1984).

Tableau 1.4: Classification actuelle des phages infectant l'espèce bactérienne *Lactococcus lactis* (adapté de Ackermann *et al.*, 1992; Jarvis *et al.*, 1991).

Famille	Espèce	Morphotype	Capside	Queue	
			Diamètre (nm)	Longueur (nm)	Diamètre (nm)
<i>Siphoviridae</i>					
	936	B1	53	159	11
	T187	B1	56	129	11
	1358	B1	53	109	10
	1483	B1	52	127	10
	BK5-T	B1	58	133	11
	P335	B1	54	145	11
	P107	B1	55	152	11
	P087	B1	65	200	16
	949	B1	79	527	14
	c2	B2	60 X41	87	10
<i>Podoviridae</i>					
	P034	C2	64X44	24	10
	KSY1	C3	240X50	30	5

Bien que très utilisée dans le domaine depuis plus de dix ans, cette classification n'est pas encore acceptée par l'ICTV. Il n'existe qu'un seul genre décrit pour les bactériophages infectant des lactocoques. Il s'agit du genre « c2-like viruses ». Pour ce qui est des espèces, l'ICTV n'en reconnaît que deux : *Lactococcus phage bIL67* et *Lactococcus phage c2* constituant chacun une espèce distincte à l'intérieur du genre « c2-like viruses ». Cette tentative ne correspond pas à la réalité car ces deux phages sont génétiquement trop similaires (82% d'identité au niveau nucléotidique lorsque l'on compare l'ensemble de leur génome) pour être classés dans deux espèces distinctes. De plus, le 8^{ième} rapport de l'ICTV mentionne que ces phages sont uniquement tempérés ce qui apparaît erroné, les phages de l'espèce c2 étant, à notre connaissance, tous virulents. Il faut dire que c'est la toute première fois que l'ICTV essaie d'ajouter les espèces dans son rapport ce qui peut expliquer cette tentative imparfaite.

1.3 Les bactériophages: de l'adsorption à la lyse

Depuis la découverte des phages, plusieurs chercheurs ont essayé de comprendre les mécanismes qui régissent leur multiplication. On peut séparer les phages en deux groupes : les phages virulents et tempérés. Les bactériophages virulents commencent leur cycle lytique dès leur entrée dans la cellule tandis que les bactériophages tempérés peuvent prendre deux voies distinctes : le cycle lytique ou la lysogénie. Pour les phages de l'ordre des *Caudovirales*, le cycle lytique comporte plusieurs étapes (Figure 1.5) dont quelques-unes seulement sont bien comprises.

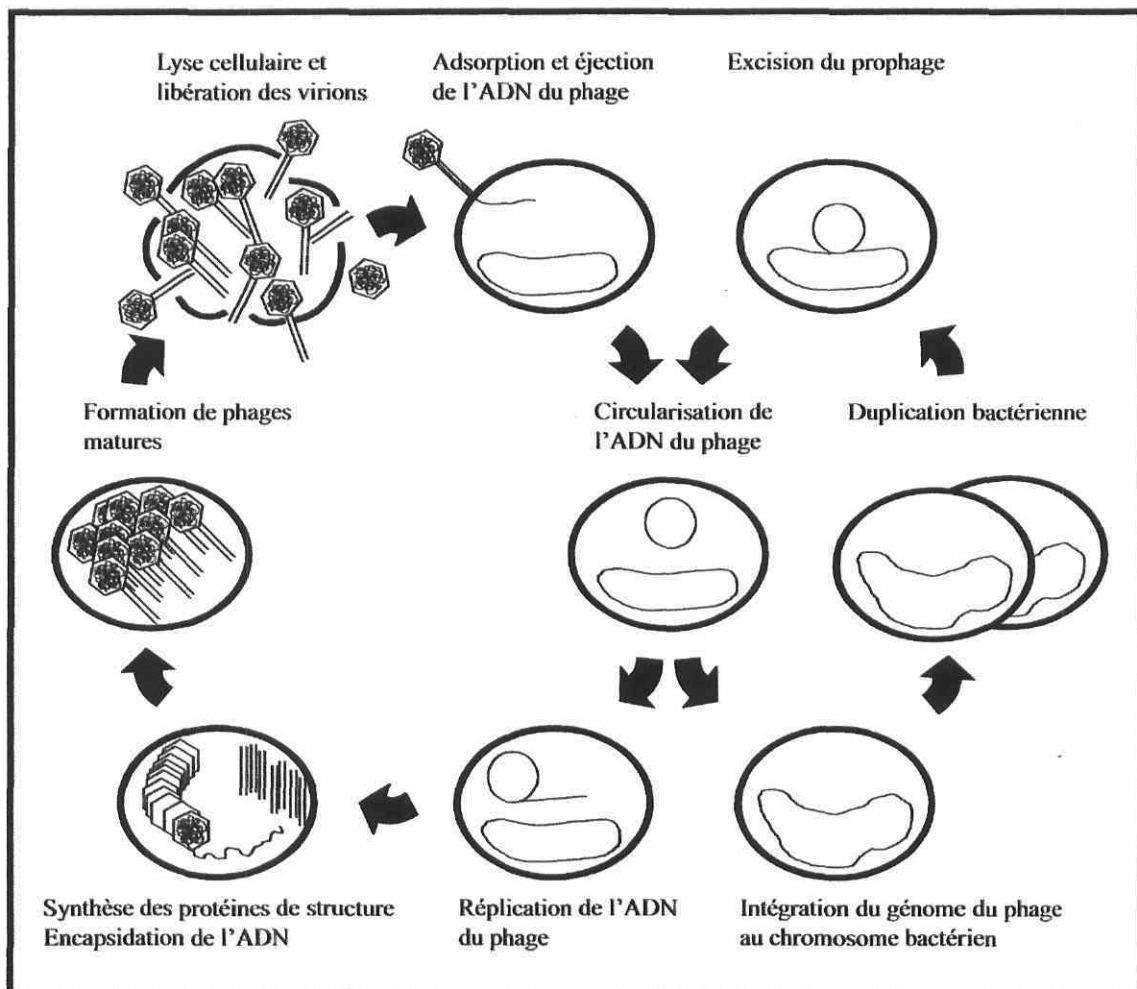


Figure 1.5: Représentation schématique du cycle lytique et du mécanisme de lysogénie d'un bactériophage (adaptée de Labrie, 2004).

1.3.1 Adsorption et pénétration de l'ADN

Tout d'abord, le phage doit s'adsorber à la surface de la cellule bactérienne. Cet attachement est déterminé par la spécificité du phage à un récepteur donné et par l'accessibilité de celui-ci à la surface cellulaire (Sijtsma *et al.*, 1990). La nature du récepteur peut être très variée; il peut s'agir d'une protéine membranaire, d'un composé polysaccharidique (EPS, LPS ou CPS) ou des acides teichoïques et lipoteichoïques associés au peptidoglycan (Geller *et al.*, 2005; Sao-Jose *et al.*, 2004; Sao-Jose *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 1991; Valyasevi *et al.*, 1991). Pour les phages de lactocoques, il a été démontré que la première étape de l'adsorption nécessitait la présence d'une molécule de carbohydrate à la surface cellulaire (Valyasevi *et al.*, 1990; 1991; 1994). Cette étape est généralement réversible bien que pour certains phages de l'espèce 936, cette étape soit irréversible et suffisante à l'éjection de l'ADN phagique dans la cellule (Geller *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 1991). Pour deux phages de cette espèce, deux opérons nécessaires à la synthèse et l'export de la paroi seraient essentiels à l'adsorption du phage (Dupont *et al.*, 2004a). Pour les phages de l'espèce c2, la seconde étape de l'adsorption requiert une protéine membranaire encodée par le gène *pip* (Geller *et al.*, 1993). À ce stade, l'adsorption devient irréversible. La protéine Pip aurait également un rôle dans l'entrée de l'ADN (Montville *et al.*, 1994). On ne connaît aucune autre fonction à ce gène et la protéine n'est pas essentielle à la croissance de la souche. Pour les phages des espèces 936 et P335, l'implication d'une protéine de l'hôte n'a pas été démontrée. Cependant, on ne peut exclure le rôle possible d'une protéine membranaire qui serait essentielle à la croissance de la cellule ce qui expliquerait la difficulté à identifier cette protéine par inactivation génique. Un autre type de molécules est peut-être nécessaire à la seconde étape de l'adsorption à moins qu'un seul récepteur (par exemple, le polysaccharide de la paroi) ne soit suffisant à l'adsorption (Geller *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 1991).

On nomme anti-récepteur ou protéine de liaison au récepteur la protéine du phage responsable de la reconnaissance de l'hôte. Certains phages possèdent plusieurs versions de cette protéine ce qui leur permet d'avoir un spectre lytique élargi. C'est le cas du myovirus P1 (enterobacteriophage) dont la progéniture possède aléatoirement l'une ou l'autre de ces versions (Guttman *et al.*, 2005). Un autre exemple de ce phénomène est la présence de deux

adhésines chez le phage Φ K1-5 lui permettant d'infecter à la fois les souches d'*Escherichia coli* K1 et K5 qui possèdent deux capsules différentes (Scholl *et al.*, 2001). Chez les bactéries lactiques, le premier anti-récepteur qui a été identifié est celui du phage DT1 de *Streptococcus thermophilus* (Duplessis et Moineau, 2001). L'échange de l'*orf18* de ce phage par un cadre de lecture ayant la même fonction mais provenant d'un phage ayant un spectre lytique différent a permis de modifier le spectre du phage chimère. Par la suite, les anti-récepteurs de plusieurs phages des espèces c2 et 936 infectant *L. lactis* ont été identifiés par la même stratégie (Dupont, *et al.*, 2004b; Rakonjac *et al.*, 2005; Stuer-Lauridsen *et al.*, 2003).

Les mécanismes régissant l'entrée de l'ADN linéaire viral dans le cytoplasme ont été étudiés seulement pour quelques phages et de nombreuses questions sont encore sans réponse. L'ADN est transféré de la capsidie à la cellule en passant par la queue. La vitesse de transfert au travers de la membrane et de la paroi cellulaire est très rapide allant même chez certains phages jusqu'à 4 kb/seconde, plus de 10 fois plus rapide que pour des mécanismes comme la conjugaison ou la transformation naturelle (100 pb/seconde). Ce transfert requiert généralement de l'énergie sous forme d'ATP mais il existe des exceptions comme le coliphage T5 qui n'a pas besoin de source d'énergie pour éjecter son ADN. Plusieurs mécanismes différents semblent exister : certains phages utilisent de l'ATP, d'autres le potentiel membranaire et, finalement, quelques-uns (comme le coliphage T7) utiliseraient la transcription et la traduction afin de tirer l'ADN à l'intérieur de la cellule (Guttman *et al.*, 2005; Kutter *et al.*, 2005).

Certains déterminants du spectre lytique ne sont pas directement reliés à l'adsorption et à la reconnaissance de l'hôte (Molineux, 2006). Par exemple, chez le phage 923 de l'espèce c2, il a été démontré qu'un fragment spécifique d'ADN du phage permet d'outrepasser un mécanisme d'inhibition de l'entrée de l'ADN présent chez la souche (Rakonjac *et al.*, 2005). Donc, les mécanismes de résistance aux phages sont également un facteur important dans la détermination du spectre lytique.

1.3.2 Réplication et transcription

Une fois à l'intérieur de la cellule, le génome de la majorité des phages est recircularisé. Selon le type de phages, la présence d'extrémités génomiques cohésives ou redondantes facilite la circularisation de leur ADN. Pour répliquer leur génome, certains phages dépendent entièrement de la machinerie enzymatique de leur hôte tandis que d'autres possèdent leur propre ADN polymérase. La réplication s'initie à une origine de réplication qui peut être unique ou en plusieurs copies dans le génome, particulièrement si ce dernier est de grande taille. Au départ, la réplication s'effectue selon un mécanisme de type θ afin de produire plusieurs copies du génome qui seront utilisées pour la transcription. Par la suite, la réplication passerait à un mode de cercle roulant afin de générer une longue molécule d'ADN linéaire contenant plusieurs copies du génome que l'on nomme concatémère. Ce sont ces molécules qui seront utilisées pour l'encapsidation. Les phages dont le génome demeure linéaire à l'intérieur de la cellule possèdent généralement leur propre ADN polymérase qui reconnaît soit une protéine terminale liée aux extrémités 5' du génome (phage $\Phi 29$ de *Bacillus subtilis*), soit une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux aux extrémités du génome (phage N15 de *E. coli*) (Fauquet *et al.*, 2005; Kutter *et al.*, 2005).

Le génome des phages caudés est transcrit en deux ou trois vagues (Chandry *et al.*, 1994a; Lubbers *et al.*, 1998; Parreira *et al.*, 1996b; Seegers *et al.*, 2004). Les gènes précoces sont transcrits au début de l'infection grâce à des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase de l'hôte. Les produits de ces gènes ont un rôle dans la protection du génome du phage contre les protéases et les enzymes de restriction de l'hôte en plus d'être responsable du détournement de la machinerie cellulaire au service de la production de phages. On y retrouve également les gènes nécessaires à la transcription des gènes médians et tardifs. Les promoteurs de ces derniers ne sont pas directement reconnus par l'ARN polymérase de l'hôte. Les phages emploient différentes stratégies pour produire les deuxième et troisième vagues de transcription (Kutter *et al.*, 2005). Certains produisent leur propre ARN polymérase, d'autres possèdent des protéines modifiant l'affinité de l'ARN polymérase de l'hôte, et enfin, certains phages peuvent fournir un facteur sigma. En général, les gènes

médians codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN alors que les gènes tardifs sont responsables de la morphogenèse des virions relargués.

1.3.3 Assemblage et encapsidation

Une fois les gènes tardifs transcrits, de nombreuses composantes virales sont produites. Pour les myovirus et les siphovirus, la capsidie et la queue sont assemblées par deux voies distinctes mais parallèles. La formation de la queue chez les *Podoviridae* diffère des autres phages caudés. La plaque basale et les autres protéines de la queue sont directement attachées à la capsidie sans étape d'assemblage préalable (Guttman *et al.*, 2005 ; Kutter *et al.*, 2005). L'addition de la queue semble être l'étape limitante lors de l'assemblage du phage (Gaussier *et al.*, 2006).

L'assemblage de la capsidie commence par la formation du complexe du portail sur lequel seront assemblées les protéines majeures de la capsidie. Il sert également d'ancrage à la terminase qui est essentielle à l'encapsidation de l'ADN. Ce processus diffère selon le phage. Les mécanismes d'encapsidation de l'ADN sous forme de concatémère sont énergiquement défavorables et demandent l'utilisation de plusieurs molécules d'ATP. Dans certains cas, le processus d'encapsidation commence à un site unique du génome et se termine exactement au même site générant des extrémités cohésives qui facilitent la recircularisation lors de l'infection. La région reconnue par la terminase est appelée un site *cos* (on parle alors d'un mécanisme d'encapsidation de type *cos*). Pour d'autres phages, la terminase reconnaît un site *pac* unique et coupe dans la région environnante pour démarrer l'encapsidation. Cependant, l'enzyme ne s'arrête qu'une fois la capsidie totalement remplie. Chaque particule virale aura alors un peu plus de 100% du génome initial avec la présence de redondance à chaque extrémité servant à la recircularisation du génome par recombinaison homologue. On parle alors d'un mécanisme de type *pac*. Lorsque l'encapsidation commence et se termine à un site aléatoire, on parle d'un mécanisme d'encapsidation de type «tête-pleine». Exceptionnellement, certains phages encapsident des fragments d'ADN linéaire couvrant exactement la taille du génome. Il s'agit bien souvent de phages dont le génome demeure linéaire après l'infection comme le phage Φ 29. Dans

cette situation, les protéines terminales présentent aux extrémités du brin d'ADN linéaire sont impliquées dans l'encapsidation (Black, 1989; Guttman *et al.*, 2005; Kutter *et al.*, 2005). Une fois l'encapsidation terminée, la terminase est libérée et le complexe du portail sert alors de point d'attache pour la queue.

Chez les phages de *L. lactis*, on observe trois différents mécanismes d'encapsidation. Les espèces c2 et 936 encapsident leur ADN selon un mécanisme de type *cos* (Chandry *et al.*, 1994b; Parreira *et al.*, 1996b; Perrin *et al.*, 1997). L'espèce P335 contient des phages dont le génome a des extrémités cohésives (Boyce *et al.*, 1995) mais également d'autres phages qui utilisent un mécanisme d'encapsidation de type *pac* (Bouchard et Moineau, 2000). Finalement, les phages de l'espèce P034 possèderaient un mécanisme semblable à celui du phage $\Phi 29$ nécessitant des protéines terminales sur leur génome linéaire (Kotsonis, 1999).

Pour les *Myoviridae*, les composantes protéiques entrant dans la formation de la queue contractile sont très nombreuses et l'assemblage est plus complexe que pour les deux autres familles. Le modèle pour l'assemblage de la queue des *Siphoviridae* est basé sur les travaux faits avec le coliphage lambda. Le virion de lambda possède une petite capsidie isométrique (50 nm de diamètre), une queue non-contractile (135 nm de long), une extrémité conique (15 nm de long) et une fibre de queue (23 nm de long). Les gènes impliqués dans la morphogénèse de la queue sont regroupés dans une région génomique qui est exprimée tardivement lors du cycle lytique. La queue du phage lambda est assemblée de l'extrémité distale (celle qui va interagir avec la cellule bactérienne) vers l'extrémité proximale (celle qui va se fixer sur la capsidie). La voie d'assemblage est divisée en trois étapes (Figure 1.6).

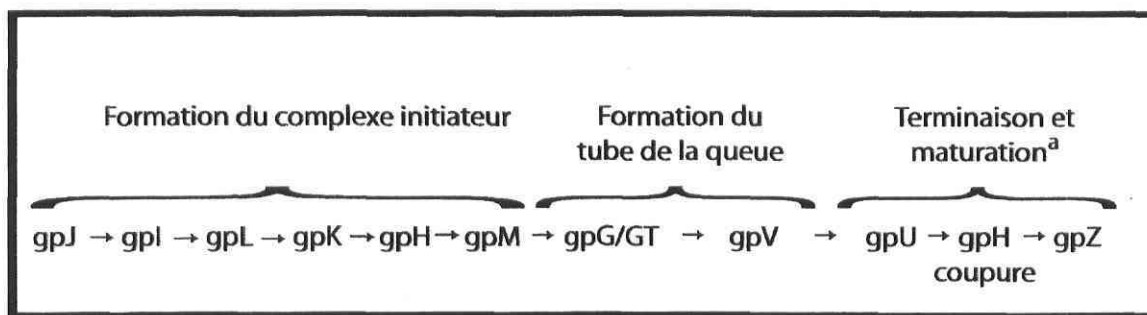


Figure 1.6: Voie d'assemblage de la queue du phage lambda.

^a Maturation désigne la compétence de joindre la capsidie sur l'extrémité de la queue.

L'assemblage de la queue commence par la formation du complexe initiateur composé de six protéines. La construction de phages mutants contenant des délétions du gène *H* a permis d'attribuer à la protéine gpH, la fonction de protéine étalon (Tape measure protein) déterminant la longueur précise de la queue. Le gène *J* code pour la protéine de fibre de la queue (gpJ). La portion N-terminale de gpJ interagit avec les autres membres du complexe. La partie C-terminale de cette protéine constitue la région permettant la fixation du phage sur le récepteur bactérien. Les autres protéines (gpI, gpL, gpK et gpM) sont aussi essentielles à la formation du complexe (Katsura, 1990). Cependant, leurs fonctions précises n'ont pas encore été déterminées. Ensuite, il y a la formation du tube de queue par la polymérisation de la protéine majeure de queue (gpV) sur le complexe initiateur. La structure du tube se compose de 32 disques. Chacun de ces disques correspond à un hexamère de gpV en forme d'anneau (Katsura, 1990). Les protéines gpG/gpGT ne se retrouvent pas dans la structure du virion mature, ce qui suggère une fonction de chaperone ou de protéines de modification. Finalement, les protéines gpU et gpZ sont incorporées à l'extrémité proximale et il y a un clivage de la protéine gpH. Les protéines gpU s'assemblent sous forme d'un hexamère en anneau qui se fixe à l'extrémité proximale de la queue. Le clivage de gpH, la protéine étalon, se fait suite à la fixation de l'anneau gpU sur la queue (Katsura, 1990). Cet anneau participe à la connexion de la capsid sur la queue. La protéine gpZ contribue aussi à la fixation de celle-ci avec la capsid.

Le phage TP901-1 (Figure 1.7) a été proposé comme modèle pour l'assemblage de la queue (Figure 1.8) chez les siphovirus infectant *L. lactis*. (Vegge *et al.*, 2005). TP901-1 est un phage tempéré appartenant à l'espèce P335 de la famille des *Siphoviridae*. La structure du phage est composée d'une capsid isométrique (50 nm), d'une longue queue non contractile (150 nm) et d'une plaque basale composée de deux disques.

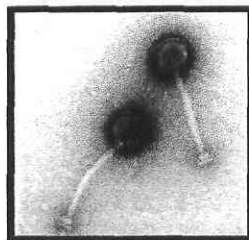


Figure 1.7: Phage TP901-1 en microscopie électronique à transmission (Vegge *et al.*, 2005).

Dans un premier temps, le complexe initiateur est formé grâce aux protéines ORF45 (tape measure protein ou TMP), ORF46 (distal tail protein) et ORF47 (tail fiber protein). La longueur de la queue est déterminée par la portion N-terminale de la protéine TMP qui dépasse le complexe initiateur (Pedersen *et al.*, 2000). La plaque basale est construite sur la structure de la queue par un assemblage indépendant des disques supérieurs et inférieurs constitués des protéines ORF48 et ORF49, respectivement. L'absence de BppU (Upper baseplate protein; ORF48) et de BppL (Lower baseplate protein; ORF49) n'empêche pas la formation de la queue. Cependant, sans BppU, il n'y a pas de plaque basale chez les phages mutants tandis qu'en absence de BppL, seulement le disque inférieur est manquant. La plaque basale est donc composée d'au moins deux protéines : ORF48 et ORF49. Finalement, il a été démontré que l'ORF49 est la protéine de liaison au récepteur du phage TP901-1. Le tube de la queue est par la suite formé par la polymérisation de la protéine majeure de queue (ORF42). Cependant, on ne sait toujours pas si les disques de la plaque basale sont assemblés avant, pendant ou après la formation du tube. Il a été proposé que l'ORF43 et l'ORF43-44 participeraient à la construction de la queue du phage de façon similaire aux protéines gpG et gpGT de lambda (Vegge *et al.*, 2005).

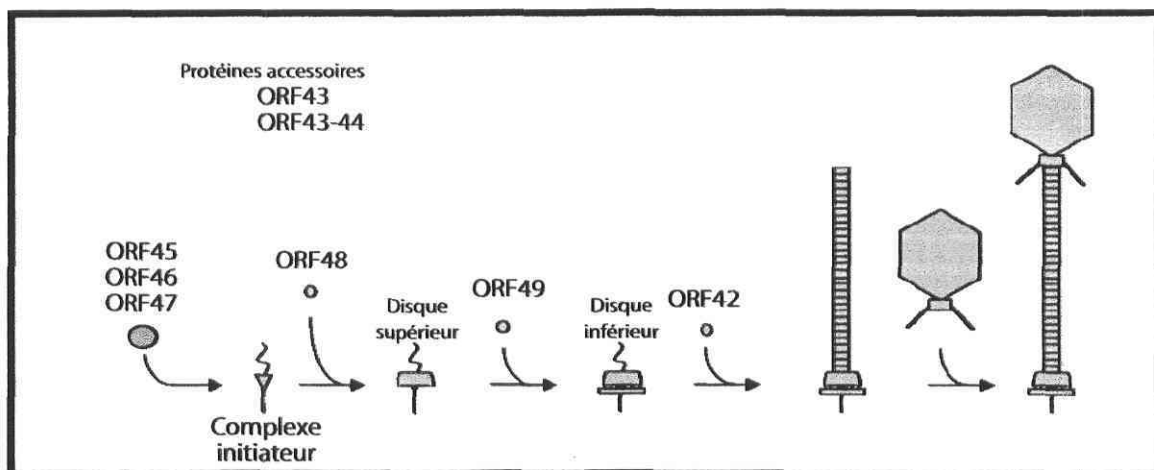


Figure 1.8: Modèle pour l'assemblage de la queue du phage TP901-1 (Vegge *et al.*, 2005).

1.3.4 La lyse

Pour la majorité des phages, les particules virales produites sont libérées par l'action coordonnée d'une paire de protéines : la holine et l'endolysine. La holine forme des pores dans la membrane cytoplasmique permettant ainsi le passage de l'endolysine jusqu'à l'espace périplasmique où elle pourra alors agir sur le peptidoglycan et fragiliser la cellule. Il existe différentes classes d'endolysine : les transglycosylases et les muramidases qui clivent les liens entre l'acide N-acétylmuramique et l'acide N-acétylglucosamine, les amidases qui hydrolysent le lien entre le résidu N-acétylmuramique et la L-alanine en première position sur la chaîne polypeptidique latérale et finalement les peptidases qui coupent à l'intérieur de la chaîne polypeptidique ou dans les ponts inter-chaînes (Loessner, 2005). Jusqu'à présent chez les phages de lactocoques, on observe seulement des muramidases et des amidases (Labrie, 2004; Labrie *et al.*, 2004). Une fois le peptidoglycan fragilisé, la cellule devient extrêmement sensible au stress osmotique. Le coliphage N4 est une exception au système holine/endolysine. En effet, la libération de la progéniture de ce phage se produit lorsque le nombre de particules virales est tellement élevé que cela provoque l'explosion de la cellule. Aucune holine ou endolysine n'est alors nécessaire (Kutter *et al.*, 2005).

1.3.5 La lysogénie

Lors de l'infection par un phage tempéré, les premières minutes sont déterminantes car le phage peut alors s'intégrer au chromosome bactérien ou entrer immédiatement dans un cycle de réplication tout comme un phage virulent. Grâce aux nombreux travaux avec le coliphage lambda, on connaît maintenant deux gènes (*cro* et *cI*) impliqués dans la régulation de cette étape. Il existe deux régions promotrices critiques : une pour la transcription des gènes nécessaires au cycle lytique et une pour l'entrée en lysogénie. Les gènes requis pour l'établissement et le maintien de la lysogénie sont organisés en un module compact. Parmi ces gènes, on retrouve ceux codant pour les régulateurs de la lysogénie (*cro*

et *cI*), l'intégrase et la protection contre la surinfection. Cependant, plusieurs cadres de lecture ouverts localisés dans ce module n'ont encore aucune fonction d'attribuée.

Chez le coliphage lambda, l'opérateur nommé O_R permet la liaison des deux répresseurs (CI ou Cro). Cet opérateur est constitué de trois sites de liaison, comportant chacun une région répétée inversée similaire mais non identique, nommés O_{R1} , O_{R2} et O_{R3} . L'opérateur O_R est lié aux promoteurs P_{RM} et P_R qui sont responsables de la transcription de *cI* et *cro*, respectivement. Les répresseurs Cro ou CI se lient aux sous-unités de l'opérateur avec une affinité différente. Le répresseur CI lie de façon préférentielle O_{R1} , suivi de O_{R2} et O_{R3} alors que Cro possède une affinité inverse, de O_{R3} à O_{R1} ce qui permet la modulation entre un cycle lytique ou une entrée en lysogénie. La protéine CI active sa propre transcription et réprime celle des gènes impliqués dans le cycle lytique alors que la protéine Cro fait l'inverse. C'est donc le ratio entre ces deux protéines qui détermine la voie que prendra le phage (Kutter *et al.*, 2005; Svenningsen *et al.*, 2005). La région impliquée dans la lysogénie fut étudiée pour plusieurs bactériophages de bactéries lactiques et les régulateurs de la lysogénie (genetic switch) fonctionnent de façon comparable à ceux du coliphage lambda (Johansen *et al.*, 2003; Labrie, 2004). Chez les lactocoques, les espèces 936 et c2 ne contiennent que des phages virulents alors que l'espèce P335 a été assignée à des phages tempérés et virulents.

Les prophages (phages intégrés au chromosome bactérien) ont parfois perdu d'importantes parties de leur génome et n'ont plus la capacité d'initier un cycle lytique et de produire des particules virales. Ces prophages défectifs demeurent ainsi dans le chromosome bactérien de façon permanente, devenant un bassin important de gènes impliqués autant dans l'évolution et la diversité de la bactérie hôte que dans celle des autres phages infectant cette bactérie. On estime que 5 à 20% des génomes bactériens sont composés de prophages effectifs ou non (Brüssow, 2001; Canchaya *et al.*, 2004; Casjens, 2003; Desiere *et al.*, 2002). En effet, les génomes bactériens dont la séquence est actuellement disponible contiennent en moyenne trois prophages (Casjens, 2005). Ceci illustre bien la co-évolution phage-hôte.

1.4 La génomique des phages

Le nombre de génomes de phages dont la séquence est complète a explosé au cours des dix dernières années. En date du 29 juillet 2006, il y en avait 379 disponibles sur le site internet du NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'organisation modulaire de ces génomes a été confirmée par de nombreuses analyses bioinformatiques (Hendrix *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2002). Cette organisation facilite la recombinaison entre les différents phages et favorise ainsi la diversité génétique de ceux-ci. Elle rend cependant difficile une classification classique car l'évolution n'est plus linéaire (de la cellule mère à la cellule fille) mais ressemblerait plutôt à une toile car des phages relativement éloignés l'un de l'autre peuvent partager certains modules d'ADN. La comparaison d'un grand nombre de génomes entre eux a mené à trois propositions de regroupement des phages basées sur des analyses génétiques comparatives. Deux de ces propositions tentent d'englober le plus de phages possible alors que la troisième se concentre davantage sur les phages infectant les bactéries lactiques.

Tout d'abord, une comparaison globale de l'ensemble des cadres de lecture ouverts retrouvés dans les génomes des bactériophages a permis d'obtenir un arbre phylogénétique (Rohwer et Edwards, 2002). Cependant, la morphologie du virion n'a pas été considérée alors qu'elle est le critère de base de la classification actuelle. Dans plusieurs cas, le manque d'information sur la structure du phage ne permet pas de comparer les nouveaux regroupements avec les anciens. Une autre équipe de recherche a proposé de regrouper les phages par module. Cette proposition permet à un phage d'appartenir à plusieurs groupes en même temps ce qui reflète plus efficacement l'évolution modulaire des phages (Lawrence *et al.*, 2002). Quoique très précise et informative, cette classification est excessivement lourde à gérer. Finalement, chez les bactéries lactiques, il a été proposé d'utiliser un groupe de gènes impliqués dans la morphogénèse du phage afin de simplifier la classification (Proux *et al.*, 2002). Bien qu'il soit logique d'utiliser ces gènes puisque la classification courante utilise principalement la morphologie, ces gènes ne représentent qu'une très petite partie du génome et la classification peut alors être biaisée.

1.4.1 Les génomes de phages de lactocoques

À ce jour, 14 séquences génomiques complètes de phages infectant *L. lactis* sont disponibles dans les bases de données (Tableau 1.5). Presque tous les phages dont le génome est séquencé appartiennent à l'une des trois espèces prédominantes : neuf sont de l'espèce P335, deux de l'espèce c2 et deux de l'espèce 936. Le génome du phage BK5-T de l'espèce du même nom a également été séquencé. L'analyse de cette séquence démontre que cette espèce devrait être fusionnée à l'espèce P335 (Labrie et Moineau, 2002). L'intérêt pour l'espèce P335 s'explique à la fois par sa présence dans les usines et par sa grande diversité génétique. D'ailleurs, cette espèce contient à la fois des phages virulents et tempérés, ce qui augmente les possibilités de recombinaison homologue entre ses membres et favorisent ainsi leur diversité génétique (Bouchard et Moineau, 2000; Durmaz et Klaenhammer, 2000). Bien que le génome d'un phage de l'espèce P034 soit séquencé (le phage ϕ asc28), les données ne sont pas encore publiées.

Tableau 1.5: Liste des bactériophages de *L. lactis* dont le génome est complètement séquencé.

Phage	Espèce	Mécanisme d'encapsulation	Taille du génome (pb)	Nombre de CLO ^b	Numéro d'accèsion GenBank	Références
bIL285	P335	prophage ^a	35538	62	AF323668	Chopin <i>et al.</i> , 2001
bIL286	P335	prophage ^a	41834	61	AF323669	Chopin <i>et al.</i> , 2001
bIL309	P335	prophage ^a	36949	56	AF323670	Chopin <i>et al.</i> , 2001
TP901-1	P335	pac	37667	56	AF304433	Brøndsted <i>et al.</i> , 2001
Tuc2009	P335	pac	38347	56	AF109874	Seegers <i>et al.</i> , 2004
ul36	P335	pac	36798	59	AF349457	Labrie et Moineau, 2002
rIt	P335	cos	33350	50	U38906	van Sinderen <i>et al.</i> , 1996
phiLC3	P335	cos	32172	51	AF242738	Blatny <i>et al.</i> , 2004
4268	P335	cos	36596	49	AF489524	-
BK5-T	BK5-T	cos	40003	63	AF176025	Boyce <i>et al.</i> , 1995
c2	c2	cos	22172	39	L48605	Lubbers <i>et al.</i> , 1995
bIL67	c2	cos	22195	37	L33769	Schouler <i>et al.</i> , 1994
bIL170	936	cos	31754	64	NC001909	Crutz-Le Coq <i>et al.</i> , 2002
sk1	936	cos	28451	54	NC001835	Chandry <i>et al.</i> , 1997
asc28	P034	protéines terminales	18762	26	non disponible	Kotsonis, 1999

^a Le mécanisme d'encapsulation n'a pas été analysé.

^b CLO: cadre de lecture ouvert

1.5 Le lutte contre les phages en industrie

Dans une usine, les sources de phages sont principalement le lait, le lactosérum et possiblement les souches lysogènes utilisées dans les ferments. Tout comme les sources, les solutions aux problèmes de phages à l'usine sont variées. Des solutions dites techniques comme un meilleur système de ventilation, une amélioration de la configuration des usines, la rotation des produits fabriqués et la formation du personnel permettent de diminuer la dissémination et la multiplication des phages à l'intérieur même de l'usine (Coffey *et al.*, 2001; Moineau, 1999; Moineau et Lévesque 2005).

Ces solutions peuvent cependant être insuffisantes. C'est pourquoi des stratégies microbiologiques sont également utilisées. On peut faire une rotation des ferments selon leur sensibilité aux phages, ce qui requiert une bonne connaissance de l'historique de la population de phages dans l'usine. Lorsque deux ferments contiennent des souches sensibles aux mêmes phages, leur utilisation successive est alors à proscrire. En effet, le phage est souvent en trop faible quantité pour entraîner un problème lors de la première fermentation. Cependant, le phage peut se multiplier sur une souche du premier ferment et atteindre un seuil critique si une souche du deuxième ferment est également sensible à ce même phage.

Lorsqu'une souche d'intérêt montre une sensibilité à plusieurs phages et devient inutilisable, la sélection de mutants spontanés résistants aux phages (appelé BIM ou « bacteriophage insensitive mutant ») ou l'introduction de mécanismes de résistance dans cette souche deviennent des alternatives intéressantes. En effet, certaines souches possèdent naturellement des mécanismes de résistance aux phages qui peuvent être transférés à d'autres souches. De plus, plusieurs prophages possèdent des mécanismes d'exclusion des autres phages. Les gènes codant pour ces mécanismes peuvent être ajoutés à une souche sélectionnée. Finalement, la connaissance actuelle du cycle lytique des phages de lactocoques et l'ère de la génomique à mener plusieurs équipes à proposer des mécanismes dits artificiels produits de l'imagination humaine mais inspirés fortement de nos connaissances actuelles sur les bactériophages et leur relation avec leur hôte.

Cependant, l'utilisation de ces nouvelles souches peut entraîner l'émergence de phages mutants capables d'infecter ces cellules. On peut également introduire différents mécanismes à l'intérieur de la même souche et ainsi produire une série de souches isogéniques résistantes qui pourront être utilisées en rotation afin d'éviter de sélectionner des phages insensibles à l'un de ces mécanismes (Moineau et Lévesque, 2005).

Chez l'espèce P335, les prophages (inductibles ou non) jouent un rôle dans l'apparition de phages insensibles aux mécanismes de résistance. Ces phages mutants sont bien souvent issus d'un événement de recombinaison homologue entre le génome d'un phage virulent infectant la souche et l'ADN du prophage (Bouchard et Moineau, 2000; Durmaz et Klaenhammer, 2000). Pour éviter ce phénomène, l'utilisation de souches ne contenant pas de prophages pourrait être une solution. Cependant, la lyse des cellules par l'induction des prophages lors de la maturation de certains fromages participerait au développement des saveurs (Coffey *et al.*, 2001).

1.5.1 Les mécanismes de résistance aux phages présents chez la bactérie

Certaines souches de *L. lactis* possèdent des mécanismes naturels de résistance aux phages dont plusieurs ont été étudiés (Forde, 1999b; Josephsen et Neve, 2004). Quatre groupes de résistance ont été identifiés: les mécanismes d'inhibition de l'adsorption, d'inhibition de l'éjection de l'ADN, les systèmes de restriction/modification (R/M) et les mécanismes d'avortement de l'infection (Abi). Globalement, ces mécanismes agissent à divers moments au cours du cycle lytique. La cellule a donc la possibilité d'avoir plusieurs lignes de défense contre les phages. On mesure la puissance d'un mécanisme en calculant l'efficacité du phage à former des plages de lyse (EOP) sur une souche par rapport à une autre.

1.5.1.1 Inhibition de l'adsorption et de la pénétration de l'ADN

L'inhibition de l'adsorption représente la première ligne de défense contre les phages. Ce phénomène peut être dû soit à l'absence d'un récepteur (BIM), soit à la présence d'une molécule qui masque le récepteur ou qui entre en compétition avec lui (généralement codé

par un plasmide). Au moins dix plasmides impliqués dans l'inhibition de l'adsorption des phages de lactocoques ont été rapportés dans la littérature. Pour cinq d'entre eux, il a été démontré que la production d'un composé extracellulaire (potentiellement des exopolysaccharides) était impliquée dans la résistance (Akcelik et Tunail, 1992; De Vos *et al.*, 1984; Forde et Fitzgerald, 1999a; 1999b; Gopal et Crow, 1993; Josephsen et Neve, 2004; Lucey *et al.*, 1992).

Dans le cas des systèmes d'inhibition de l'entrée de l'ADN, l'adsorption du phage à la surface bactérienne a lieu mais son ADN n'atteint pas le cytoplasme. Ainsi, il ne peut pas s'y répliquer. Un seul mécanisme de ce type a été découvert sur un plasmide de lactocoques. Il s'agit du plasmide pNP40 mais les gènes et protéines impliqués dans ce mécanisme n'ont pas encore été identifiés (Garvey *et al.*, 1996).

Pour les souches sensibles aux phages de l'espèce c2, il est possible de sélectionner des mutants spontanés (BIM) du gène *pip* (Geller *et al.*, 1993). Le rôle de Pip dans la cellule étant encore vague, ce mécanisme est parfois considéré comme un mécanisme d'inhibition de l'adsorption, parfois comme un mécanisme d'inhibition de l'entrée de l'ADN (Coffey et Ross, 2002; Josephsen et Neve, 2004; Moineau et Lévesque, 2005). Malgré les études sur ces sujets, l'inhibition de l'adsorption ou de la pénétration de l'ADN phagique sont encore des phénomènes peu compris au niveau moléculaire.

1.5.1.2 Systèmes de restriction/modification

Les systèmes de restriction/modification (R/M) sont les mécanismes de résistance aux phages les mieux étudiés car ils ont une grande utilité en recherche. En fait, la découverte de ces enzymes a marqué un point tournant dans le domaine de la biologie moléculaire. Le mode d'action de ces mécanismes de résistance est très bien connu et caractérisé. Ils ont été retrouvés chez une vaste gamme d'espèces bactériennes et sont généralement formés de deux composantes : une endonucléase et une méthylase. Lorsque l'ADN étranger entre dans la cellule, il est coupé par une enzyme de restriction qui reconnaît des sites spécifiques tandis que l'ADN bactérien est déjà protégé par des méthylations sur ces sites. Ces

mécanismes ont l'avantage de ne pas être spécifiques à une espèce phagique mais bien à toute molécule d'ADN possédant les sites de reconnaissance requis.

Il existe quatre différents groupes de systèmes R/M. On classe les mécanismes sur la base de leur besoin d'un co-facteur, des sous unités entrant dans leur composition, de leur site de reconnaissance et de leur site de coupure. Les mécanismes de type I sont composés de trois protéines : la méthylase (M), l'endonucléase (R) et une troisième sous unité responsable de la spécificité (S). Les sites de coupure de l'endonucléase se retrouve à l'extérieur du site de reconnaissance de l'enzyme (variable, jusqu'à une distance de 1000 pb du site de reconnaissance). Les mécanismes de type II sont formés des deux sous-unités de base soit l'endonucléase (R) et la méthylase (M). Le site de coupure se retrouve dans le site de reconnaissance ou adjacent à celui-ci. Plusieurs systèmes des type II ne coupent l'ADN qu'une fois qu'ils ont lié au moins deux copies de leur site de reconnaissance. Plus de 3650 mécanismes de ce type sont rapportés dans la littérature pour une panoplie d'espèces bactériennes. Les systèmes R/M de type III agissent de façon similaire au type I car leur site de coupure est à l'extérieur du site de reconnaissance. Dans les deux cas, la translocation d'ADN semble être utilisée afin de passer d'un site à l'autre. Cependant, le type III est moins complexe que le type I car on remarque l'absence de la troisième sous-unité (S). Les R/M de type IV ne coupe que l'ADN ayant été modifié (présence de méthylations, d'hydroxyméthylations et/ou de glyco-hydroxyméthylations). Ces enzymes reconnaissent deux sites modifiés séparés par 40 à 3000 nucléotides et coupent ensuite entre ces sites (Josephsen et Neve, 2004; O'Driscoll *et al.*, 2004; Tock et Dryden, 2005).

Cependant, les systèmes R/M sont une barrière imparfaite pour prévenir l'invasion de la cellule par de l'ADN extérieur. La sensibilité d'un phage à un système R/M est directement proportionnelle au nombre et à la distribution des sites de reconnaissance présents dans le génome du phage. Si le nombre de sites de reconnaissance dans le génome du phage est faible, la sensibilité de ce phage au mécanisme R/M le sera aussi. De plus, si ces sites sont très éloignés l'un de l'autre, il sera difficile pour l'enzyme d'en lier deux à la fois (ce qui est souvent nécessaire pour les enzymes de type II). Des mutations ponctuelles aux sites de reconnaissance peuvent être involontairement sélectionnées par la présence de mécanismes R/M, ce qui entraîne l'apparition de phages moins sensibles. L'ADN phagique peut être

accidentellement méthylé par la méthylase du système. Il y a alors apparition de phages dont le génome est méthylé qui ne sont plus affectés par ce système R/M. Ainsi, ils pourront se multiplier en grand nombre sur cette souche. Toutefois, ces phages redeviennent sensibles après un passage sur un hôte alternatif sans R/M. Certains phages, comme le phage P1, encapsident avec leur ADN des protéines accessoires capables de lier l'ADN. Ces protéines protègent l'ADN contre les systèmes de restriction en rendant inaccessible les sites de reconnaissance et de coupure. L'activité des mécanismes R/M peut également être modifiée par une protéine du phage soit en stimulant l'activité de la méthylase (ce qui augmente le nombre de méthylations accidentelles) ou par la destruction des co-facteurs nécessaires à l'endonucléase. On observe un phénomène semblable avec le coliphage T7 (Atanasiu *et al.*, 2002). Bien que celui-ci n'encapside pas la protéine Ocr responsable de la protection contre les R/M, cette protéine est produite dès le début du cycle d'infection. Les phages peuvent acquérir le gène codant pour la méthylase ce qui les rend résistants de façon permanente au système R/M associé à cette méthylase (Hill *et al.*, 1991; Moineau *et al.*, 1995; Tock et Dryden, 2005). Il est également reconnu que les génomes de phages ont un nombre limité de sites de restriction (Moineau *et al.*, 1993).

Chez les lactocoques, 20 différents systèmes R/M furent isolés et étudiés. Cinq de ces mécanismes correspondent au type I, neuf au type II et un au type III. Finalement, cinq de ces systèmes ne correspondent à aucun des groupes reconnus (Josephsen et Neve, 2004; O'Driscoll *et al.*, 2004).

1.5.1.3 Mécanisme d'avortement de l'infection (Abi)

Les Abis sont des mécanismes de défense qui préviennent la prolifération intracellulaire des phages et qui ne sont pas des systèmes de restriction/modification. Les stades initiaux d'expression des gènes viraux sont normaux. Contrairement à ce qui est observé avec les autres types de systèmes anti-phage, la cellule hôte meurt suite à l'infection car son chromosome est dégradé très tôt lors du cycle lytique du phage. Phénotypiquement, ces mécanismes sont caractérisés par une absence ou une diminution de la taille des plages de lyse (faible nombre de phages relargués) ainsi que par la mort cellulaire. Les Abi forment un groupe hétérogène de barrières pouvant agir à divers endroits du cycle lytique

(transcription, traduction, réplication du génome, encapsidation, assemblage ou lyse). Il peut également s'agir d'une protéine toxique dont l'expression et/ou l'activité est dépendante d'une protéine codée par le génome du phage.

Bien que, pour les lactocoques, la séquence nucléotidique des gènes de 21 Abi soit connue, le mode d'action de ces différents Abi demeure nébuleux (Chopin *et al.*, 2005; Forde et Fitzgerald, 1999b; Josephsen et Neve, 2004). La grande majorité de ces Abi sont codés par des plasmides. Ils sont composés de un ou deux gènes à l'exception d'AbiS et AbiR (Josephsen et Neve, 2004; Yang *et al.*, 2006). Le mécanisme AbiS n'est constitué d'aucun cadre de lecture ouvert tandis que AbiR est constitué de quatre cadres de lecture distincts. En fait, le fragment d'ADN conférant le phénotype de résistance pour AbiS contient trois répétitions d'une région possédant une haute identité en acide nucléique avec la région du site *cos* des phages de l'espèce 936 (Josephsen et Neve, 2004). Il se pourrait que cette région titre des facteurs du phage, limitant ainsi sa réplication.

On observe que très rarement de l'homologie entre les séquences protéiques des Abi, ce qui ne permet pas de tirer des conclusions globales sur leur mode d'action. Certains sont efficaces contre une seule espèce de phages tandis que d'autres sont efficaces contre les phages des trois espèces prédominantes. Cependant, les phages de l'espèce 936 sont sensibles à tous les systèmes Abi connus (Tableau 1.6) possiblement parce qu'ils sont utilisés régulièrement dans le protocole menant à la découverte d'un Abi. La sensibilité à un système Abi peut varier à l'intérieur d'une même espèce. Ces différences de sensibilité sont parfois analysées afin de mieux comprendre le mode d'action des mécanismes Abi. Pour la plupart, les connaissances actuelles se limitent souvent à l'étude de leur effet sur la réplication de l'ADN du phage et sur la transcription/traduction des gènes.

Les protéines AbiA (Durmaz et Klaenhammer, 2000) et AbiK (Bouchard et Moineau, 2000) partagent 23% d'identité. Il semble donc possible que leur mode d'action soit semblable. Un motif de transcriptase inverse a été retrouvé dans les deux séquences protéiques. Récemment, un modèle fut proposé afin d'expliquer le mode d'action d'AbiK (Fortier *et al.*, 2005). La protéine AbiK synthétiserait un ADN complémentaire à partir d'un ARN jusqu'à présent non-identifié. Dans les cellules AbiK⁺ infectées par un phage, le brin d'ADN complémentaire, libéré après la dégradation du gabarit d'ARN, serait alors lié

par une protéine du phage appelée Sak (apparentée à la famille des protéines Erf et Rad52 liant l'ADN simple brin) qui le protégerait contre une dégradation par les exonucléases cellulaires. L'appariement de cet ADN simple-brin avec les ARN messagers complémentaires produits par la suite empêcherait leur traduction. Les phages résistants à ce mécanisme possèdent une mutation dans le gène codant pour la protéine Sak.

Tableau 1.6: Mécanismes d'avortement de l'infection (Abi) retrouvés chez *Lactococcus lactis* (adapté de Chopin *et al.*, 2005; Josephsen et Neve, 2004)

Mécanisme	Nombre de CLO ^a	Efficace contre	Numéro d'accension GenBank	Références
AbiA	1	936, c2 et P335	U17233	Hill <i>et al.</i> , 1990; Coffey <i>et al.</i> , 1991
AbiB	1	936	M77708	Cluzel <i>et al.</i> , 1991
AbiC	1	936	M95956	Durmaz <i>et al.</i> , 1992
AbiD	1	936 et c2	U10992	McLandsborough <i>et al.</i> , 1995
AbiD1	1	936	L35176	Anba <i>et al.</i> , 1995
AbiE	2	936	U36837	Garvey <i>et al.</i> , 1995
AbiF	1	936 et c2	U36837	Garvey <i>et al.</i> , 1995
AbiG	2	936 et c2	U60336	O'Connor <i>et al.</i> , 1996
AbiH	1	936 et c2	X97651	Prévots <i>et al.</i> , 1996
AbiI	1	936 et c2	U38973	Su <i>et al.</i> , 1997
AbiJ	1	936	U41294	Deng <i>et al.</i> , 1997
AbiK	1	936, c2 et P335	U35629	Émond <i>et al.</i> , 1997
AbiL	2	936 et c2	U94520	Deng <i>et al.</i> , 1999
AbiN	1	936 et c2	Y11901	Prévots <i>et al.</i> , 1998
AbiO	1	936 et c2	I61427	Prévots et Ritzenthaler, 1998
AbiP	1	936	U90222	Domingues <i>et al.</i> , 2004
AbiQ	1	936 et c2	AF001314	Émond <i>et al.</i> , 1998
AbiR	4	936 et c2	AF216814	Twomey <i>et al.</i> , 2000
AbiS	0	936	AJ132009	Josephsen et Neve, 2004
AbiT	2	936 et P335	AF4830000	Bouchard <i>et al.</i> , 2002
AbiU	2	936, c2 et P335	AF188839	Dai <i>et al.</i> , 2001

^a CLO: cadre de lecture ouvert

La protéine AbiP est ancrée à la membrane et capable de lier de l'ARN ou de l'ADN simple-brin indépendamment de la séquence nucléotidique. Deux phages de l'espèce 936 (bIL66M1, AbiP^S et bIL170, AbiP^R) montrant une sensibilité différente à ce mécanisme de résistance ont été utilisés afin d'étudier les facteurs du phage impliqués dans la sensibilité. Le gène e6_{bIL170} confère une résistance à AbiP. Cependant, aucune fonction n'a pu être

associée à ce gène ou au produit de ce gène ce qui ne donne aucune information sur le mode d'action d'AbiP (Chopin *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2004a). AbiP partage 22% d'identité en acides aminés avec le mécanisme AbiC et l'analyse informatique des structures secondaires potentielles des deux protéines donne des résultats similaires. Cependant, leur point isoélectrique et leurs effets sur le cycle lytique du phage diffèrent, ce qui semble indiquer deux modes d'action distincts (Domingues *et al.*, 2004b; Durmaz *et al.*, 1992).

Le mécanisme AbiD1 interfère avec un gène codant pour une endonucléase essentielle homologue à RuvC et qui est conservée chez les phages des espèces c2 et 936 (43% d'identité au niveau protéique). Ici encore, un facteur provenant du phage, par exemple l'*orf1* du phage bIL66, est nécessaire à l'expression du phénotype de résistance. En effet, la traduction du gène *abiD1* est fortement réprimée en absence de phages et c'est le produit de l'*orf1* du phage qui lève cette régulation. Une fois la protéine AbiD1 produite, celle-ci interagirait avec l'endonucléase de type RuvC essentielle au développement de nouveaux virions. Cependant, aucun homologue de l'*orf1* n'a été retrouvé chez les phages de l'espèce c2 sensible à AbiD1, ce qui laisse croire que d'autres protéines peuvent également lever la répression de la traduction d'AbiD1 (Bidnenko *et al.*, 2002; Chopin *et al.*, 2005).

Dans le cas d'AbiF, un fragment de 324 pb correspondant au site *cos* et à la région avoisinante du phage sk1 (AbiF^R) est suffisant pour diminuer l'efficacité de ce système contre le phage 712 (Rincé *et al.*, 2000). Il est cependant impossible pour l'instant d'expliquer l'implication exacte du site *cos* ou de la région avoisinante dans le phénotype d'avortement de l'infection. Les protéines AbiD, AbiD1 et AbiF possèdent entre 28 et 46% d'identité entre elles (Chopin *et al.*, 2005), ce qui pourrait suggérer un mode d'action similaire, mais les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas de supporter cette hypothèse.

Chez les cellules AbiB⁺ (Parreira *et al.*, 1996a), il a été démontré qu'un produit des gènes précoces des phages de l'espèce 936 est responsable de la synthèse ou de la stimulation d'une activité RNase dans les cellules infectées. La protéine AbiB aurait donc soit une activité RNase latente stimulé par un produit du phage, soit elle interagit avec un produit du

phage pour stimuler l'activité d'une RNase bactérienne, soit elle active une RNase codé par le génome du phage.

1.5.2 Les mécanismes d'exclusion des phages

Lorsqu'un phage a la capacité de s'intégrer au chromosome bactérien et de demeurer dans la cellule sous forme de prophage, il possède souvent un système naturel qui lui permet d'empêcher la souche hôte d'être infectée à nouveau. Par exemple, *Sie*₂₀₀₉ est un système d'exclusion du phage tempéré *Tuc*₂₀₀₉ contre les phages de l'espèce 936. Chez les lactocoques, ce type de mécanisme a parfois été relié à des mécanismes d'inhibition de l'entrée d'ADN phagique (McGrath *et al.*, 2002). Contrairement aux autres mécanismes anti-phages naturels des bactéries qui peuvent être introduits par conjugaison du plasmide, l'utilisation des systèmes d'exclusion nécessite que la cellule soit sensible au phage tempéré dont le génome contient ce mécanisme ou que le gène soit d'abord inséré dans un vecteur afin de pouvoir être transféré dans une autre souche.

1.5.3 Les mécanismes artificiels

Des systèmes de résistance aux phages dits artificiels furent construits au cours des dernières années et sont inspirés des connaissances accumulées sur la réplication des phages. Il existe plusieurs types de mécanismes artificiels comme l'utilisation d'anticorps, le système *Per*, l'utilisation d'ARN anti-sens et le suicide induit de la cellule (triggered suicide) (Coffey *et al.*, 2001; Moineau et Lévesque, 2005; Sturino et Klaenhammer, 2004).

Récemment, l'utilisation d'anticorps de lama surproduits dans la levure a été proposée afin de neutraliser les phages dans le lait. Les anticorps peuvent être ajoutés à tout moment lors du processus de transformation du lait. Ces anticorps reconnaissent une protéine du phage impliquée dans la reconnaissance de l'hôte et agissent donc comme un mécanisme d'inhibition de l'adsorption (Ledebøer *et al.*, 2002). Cette protéine de phage peut également être ajoutée et compétitionner avec le phage pour le récepteur à la surface cellulaire.

La présence de l'origine de réplication (*ori*) d'un phage dans un vecteur plasmidique à haut nombre de copies diminue grandement l'efficacité à former des plages de lyse de ce phage et de phages apparentés. L'*ori* présent sur le plasmide est alors en compétition avec l'*ori* du phage en cours d'infection pour les facteurs de réplication et cela retarde le développement des virions. Ce système est appelé Per pour « phage encoded resistance » (Hill *et al.*, 1990; McGrath *et al.*, 1999; O'Sullivan *et al.*, 1993).

L'augmentation rapide du nombre de génomes dont la séquence nucléotidique complète est disponible ainsi que la caractérisation d'un certain nombre de protéines de phage a permis un progrès rapide de l'utilisation des ARN anti-sens. Ces ARN sont utilisés afin d'interférer avec le développement du phage en inhibant la traduction de gènes nécessaires au cycle lytique. L'ARN anti-sens hybride avec l'ARN messager et prévient donc la traduction de celui-ci en protéine (Sturino et Klaenhammer, 2004).

Le dernier système, appelé « triggered suicide », consiste à placer un gène codant pour une protéine toxique pour la cellule sous le contrôle d'un promoteur inductible lors de l'infection par un phage (Djorgjevic et Klaenhammer, 1997; Djorgjevic *et al.*, 1997; Sturino et Klaenhammer, 2004). La cellule bactérienne a donc une croissance normale jusqu'à ce que le phage produise le facteur nécessaire à la reconnaissance de ce promoteur qui induira alors le « suicide » de la cellule.

Contrairement aux systèmes naturels de défense contre les phages, les systèmes artificiels sont efficaces que contre un nombre limité de phages. Comme ils agissent à un endroit très précis du cycle lytique, le phage doit obligatoirement posséder la région d'ADN ou la protéine reconnue par ces systèmes. De plus, à l'exception de l'utilisation d'anticorps, ils demandent tous que la cellule bactérienne soit transformée avec un vecteur contenant les gènes responsables du phénotype de résistance. Ce type de transformation est hautement réglementé dans l'industrie alimentaire car la législation entourant l'utilisation des souches ainsi transformées est très stricte (Coffey *et al.*, 2001; Moineau et Lévesque, 2005). Ainsi, ces souches doivent être approuvées par les diverses agences gouvernementales avant d'être utilisées. Puisque la résistance qu'ils confèrent est présentement limitée, à notre connaissance, aucun de ces systèmes artificiels n'est utilisé à l'échelle industrielle.

1.6 Les exopolysaccharides

Certaines souches bactériennes produisent des polysaccharides qu'ils sécrètent à l'extérieur de la cellule. Il existe trois groupes de polysaccharides extracellulaires: les polysaccharides capsulaires (CPS), les exopolysaccharides (EPS) et les lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont composés d'une partie polysaccharidique et d'une partie lipidique ce qui les distingue des deux autres groupes. Les CPS et les EPS sont composés d'unités répétées de polysaccharides formés d'un seul sucre (homopolysaccharide) ou de plusieurs sucres distincts (hétéropolysaccharides). On retrouve les EPS libres dans le milieu après leur synthèse alors que les CPS demeurent attachés à la paroi (Broadbent *et al.*, 2003; Sutherland, 1985).

Les polysaccharides auraient un rôle dans la protection des cellules contre la dessiccation, la phagocytose, l'attaque phagique, la tension d'oxygène, les antibiotiques et autres composés toxiques en plus de leur permettre une meilleure adhérence aux surfaces (De Vuyst et Degeest, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1999; Looijesteijn *et al.*, 2001). Ils sont impliqués à plusieurs niveaux dans la virulence de certains pathogènes en augmentant l'adhérence aux tissus, en diminuant la reconnaissance du pathogène par le système immunitaire ou en protégeant les cellules contre l'action des antibiotiques. Dans l'industrie alimentaire, on les utilise pour leurs propriétés épaississantes, stabilisantes et gélifiantes (Cerning, 1990; 1995; De Vuyst et Degeest, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1999; Looijesteijn *et al.*, 2001).

1.6.1 Les EPS produits par les bactéries lactiques

Les agents stabilisants actuellement utilisés dans les aliments ne proviennent pas toujours d'organismes de grade alimentaire. Par exemple, le xanthane est un polysaccharide produit par *Xanthomonas campestris*, un phytopathogène. Les bactéries lactiques sont de grade alimentaire ou « GRAS » (generally recognized as safe) ce qui leur confère un avantage face à des agents gélifiants provenant de phytopathogènes. En effet, les EPS des bactéries lactiques peuvent être produits *in situ* lors de la fermentation, contrairement aux agents

courants qui doivent être purifiés et ajoutés aux produits. Puisque l'utilisation d'additifs lors de la production de produits laitiers fermentés n'est pas permise dans certains pays, la disponibilité de souches de bactéries lactiques possédant des fonctionnalités d'intérêt technologique contribue à l'amélioration de la qualité de ces produits.

L'utilisation de souches productrices d'EPS dans la fabrication de produits laitiers comme le yogourt, le babeurre et les produits fermentés contenant une faible concentration en matières grasses diminue la synérèse et joue un rôle dans la rhéologie des laits fermentés (De Vuyst et Degeest, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1999; Looijesteijn *et al.*, 2001). En général, les bactéries lactiques produisent des hétéropolysaccharides composés d'unités répétées de disaccharides à heptasaccharides. Ils contiennent du glucose, du galactose et du rhamnose en différents ratios, mais peuvent parfois contenir d'autres types de résidus.

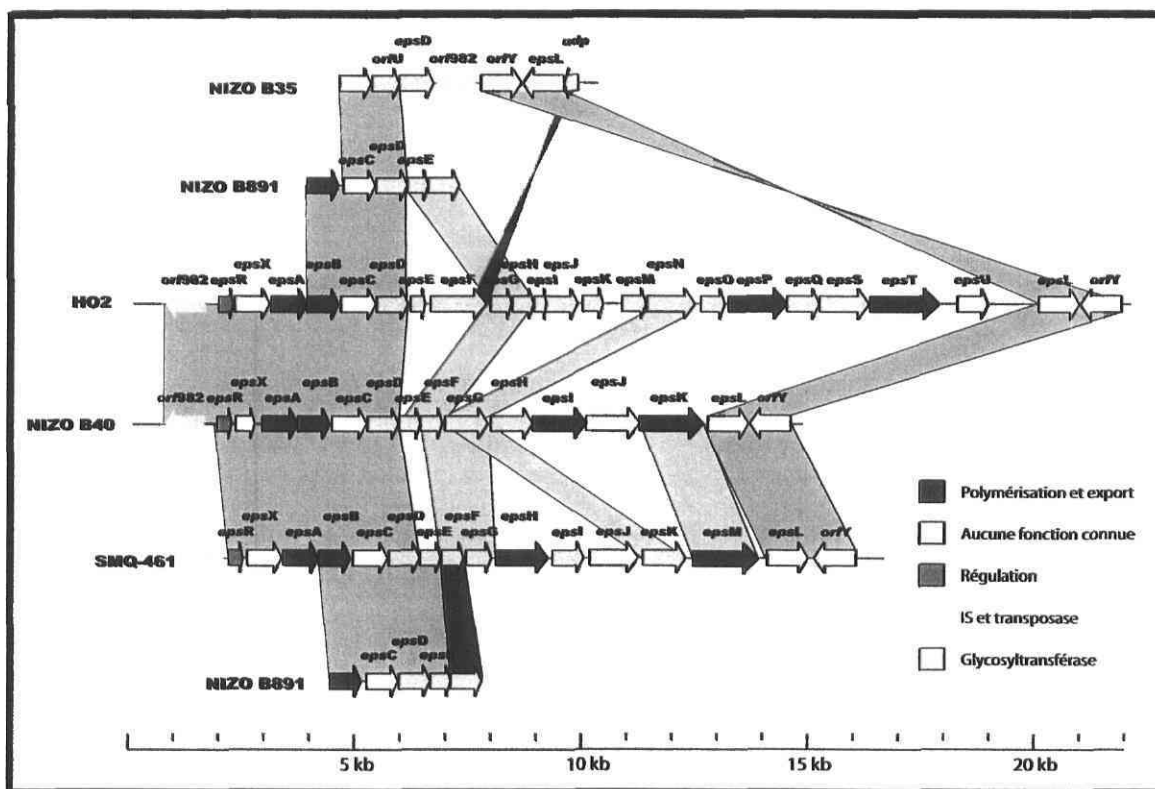


Figure 1.9: Comparaison des différents opérons *eps* chez les lactocoques. Les régions reliées en gris possèdent plus de 80% d'identité au niveau des acides aminés; en bleu foncé, entre 60 et 80%; en bleu pâle, moins de 60% (Numéro d'accèsion GenBank: NIZO B35, AF100297; NIZO B891, AF100298; HO2, AF142639; NIZO B40, AF036485; SMQ-461, AY741550).

Au cours des dernières années, quelques structures d'EPS de lactocoques ont été analysées (Gruter *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1990; Van Casteren *et al.*, 2000a; 2000b). À ce jour, trois opérons *eps* ont été complètement séquencés chez les lactocoques (Dabour et LaPointe, 2005; Forde et Fitzgerald, 2003; Van Kranenburg *et al.*, 1997; 1999). La séquence partielle de deux autres opérons est également disponible (Figure 1.9). On retrouve de l'homologie avec les opérons *eps* et *cps* de différents genres et espèces telles que *Bacillus*, *Enterobacter*, *Neisseria meningitidis*, *Rhizobium meliloti*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*.

Les souches de *L. lactis* EPS⁺ ne produisent qu'une quantité très faible d'exopolysaccharides. La température d'incubation, la composition du milieu et le pH sont autant de facteurs influant sur la quantité finale d'EPS produits (Cerning, 1995). Ainsi, l'analyse de la composition de ces EPS n'est pas une tâche facile car l'extraction et la purification en quantité suffisante pour l'analyse demande de traiter des volumes de culture de départ très importants. De plus, la technique d'extraction est longue (7 jours) et la pureté du matériel obtenu n'est souvent pas suffisante à l'analyse sans une étape supplémentaire de purification sur colonne (Sephacryl). Une méthode rapide de classification des souches de *L. lactis* productrices d'EPS a été proposée par Van Kranenburg (Tableau 1.7). Pour classer les souches, des sondes correspondant à deux gènes hautement conservés chez les opérons *eps* des lactocoques (*epsB* et *epsD*) sont utilisées. L'ADN total des souches est préalablement digéré avec l'enzyme *SacI*, séparé par électrophorèse et transféré sur une membrane de nylon. Selon la taille des fragments qui hybrident avec les sondes, on peut présumer de la composition en sucre de l'EPS produit. Ainsi, il est facile d'étudier un plus grand nombre de souches productrices d'EPS en un temps plus court.

Tableau 1.7: Classification des opérons *eps* chez *L. lactis* (Van Kranenburg *et al.*, 1997).

Groupe	Souche	Taille des fragments (kb)		Présence des sucres ^a		
		<i>epsB</i>	<i>epsD</i>	Gal	Glu	Rha
I	NIZO B40	7,5	0,4	+	+	+
	SBT 0495	7,5	0,4	+	+	+
II	NIZO B35	7,5	15	+	-	-
	H414	7,5	15	+	-	-
III	MLT2	6,5	12	+	+	-
	NIZO B891	6,5	12	+	+	-

^a Gal, galactose; Glu, glucose; Rha, Rhamnose.

1.6.2 Les EPS et les phages

Dans la littérature, l'implication des polysaccharides dans l'infection par les phages varie selon l'espèce bactérienne et le phage. Tout d'abord, les phages utilisent parfois un polysaccharide comme récepteur. Les EPS, CPS ou LPS deviennent alors essentiels à l'infection. Chez *Escherichia coli*, les phages sont souvent spécifiques à un type de capsule particulier, comme c'est le cas pour les coliphages K1 et K5 qui n'attaquent que la souche bactérienne du même nom (*E. coli* K1 ou *E. coli* K5) (Clarke *et al.*, 2000; Hanfling *et al.*, 1996; Scholl *et al.*, 2001). On peut observer un phénomène comparable chez *Vibrio cholerae* O139 où la perte de la capsule entraîne une résistance aux phages (Attridge *et al.*, 2001). Certains phages peuvent également posséder une dépolymérase qui dégrade les polymères de sucres afin de libérer la surface cellulaire et la rendre disponible pour l'infection (Hughes *et al.*, 1998).

Paradoxalement, chez les lactocoques quelques études suggèrent que les polysaccharides peuvent protéger la cellule contre l'infection en masquant les récepteurs (voir section 1.5.1.1). Plusieurs autres exemples concrets de ce paradoxe peuvent être énumérés. Chez *Streptococcus pneumoniae*, il a été démontré que la présence de la capsule confère une résistance contre certains phages (Bernheimer et Tiraby, 1976). Pour la souche *Rhizobium meliloti* M11S, les LPS sont essentiels à l'infection par le phage NM8 alors que les EPS la protègent (Defives *et al.*, 1996).

L'utilisation des souches de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides est en augmentation depuis quelques années. Plus une souche est utilisée, plus il y a de chance que des phages attaquant cette souche émergent à l'usine. À ce jour, peu d'études ont été réalisées sur les bactériophages s'attaquant aux lactocoques producteurs d'EPS (Saxelin *et al.*, 1979; Sozzi *et al.*, 1978).

1.7 Problématique et objectifs du projet de recherche

Les souches de *L. lactis* étant très utilisées par l'industrie laitière, la présence de phages les infectant est problématique. L'étude des interactions entre le phage et son hôte permet d'améliorer nos moyens de contrôle contre ces phages. Cette thèse de doctorat traite de la biodiversité des bactériophages de *L. lactis* afin d'améliorer nos connaissances générales sur ces virus. Pour se faire, cinq objectifs seront détaillés dans les prochains chapitres. À l'exception des trois espèces prédominantes, les autres phages de lactocoques sont très peu étudiés. Ils représentent tout de même une source potentielle de phages en industrie et un bassin potentiel de nouveaux gènes. Depuis quelques années, la classification actuelle des phages de lactocoques fait l'objet de critiques (Jarvis, 1994; Labrie et Moineau, 2002; Moineau *et al.*, 1995). Avec la présence de la collection de phages Félix-d'Hérelle dans le laboratoire, nous étions dans une position unique pour revoir cette classification. Des phages dont l'espèce était inconnue ont également été analysés. Ainsi, une nouvelle classification des phages de *L. lactis* est proposée au chapitre 2. Au chapitre 3, une étude a été entreprise sur la biodiversité des phages de *L. lactis* dans une usine québécoise fabriquant du fromage Cheddar. Cette étude visait à estimer la diversité des phages dans l'usine afin d'élaborer une stratégie de rotation des ferments (chapitre 3). La plupart des travaux sur les phages de lactocoques portent sur ceux infectant des souches de *L. lactis* non-productrices d'EPS. L'isolement de phages infectant des souches de lactocoques productrices d'EPS a permis d'étudier le rôle des EPS dans l'infection par les phages chez cette espèce bactérienne (chapitre 4). Des modifications à la méthode de classification des souches EPS⁺ de *L. lactis* par l'analyse du polymorphisme de la taille des fragments de restriction de l'opéron *eps* ont également été proposées au chapitre 5. Bien que les membres de l'espèce 936 soient les plus fréquemment isolés, uniquement deux séquences génomiques complètes étaient disponibles au début de ce projet. L'analyse de la séquence nucléotidique de trois génomes additionnels et de la sensibilité de ces phages à divers mécanismes de type Abi apporte de l'information supplémentaire sur les mécanismes évolutifs de ces phages et sur les gènes/protéines potentiellement impliqués dans le phénotype de résistance/sensibilité aux Abi (chapitre 6).

Chapitre 2

Biodiversité et classification des phages de lactocoques

2.1 Résumé

Lors de cette étude, une révision en profondeur de la classification des phages infectant *Lactococcus lactis* a été effectuée. Des phages de référence ainsi que des phages non-classés provenant de diverses collections internationales ont été comparés par des hybridations ADN-ADN, des observations en microscopie électronique et l'analyse de séquences génomiques. La nouvelle classification proposée réduit le nombre d'espèces de douze à dix. Deux nouveaux phages (Q54 et 1706) ne montre aucun lien avec les espèces de l'ancienne classification et appartiennent donc à de toutes nouvelles espèces. La méthode PCR multiplex actuellement utilisée pour détecter les phages des trois espèces prédominantes (936, c2 et P335) a été améliorée et testée contre des membres des autres espèces. Aucun d'entre eux ne donne d'amplicon PCR confirmant ainsi la spécificité de cet outil de détection. Cependant, la méthode ne détecte pas tous les phages appartenant à l'espèce hautement diversifiée P335 où on ne retrouve aucune région d'ADN conservée dans tous les génomes. Les phages caractérisés lors de cette étude ont été déposés au Centre de référence pour les virus bactériens Félix-d'Hérelle et représentent la communauté virale la plus diverse provenant de l'environnement laitier.

2.2 Avant-propos

2.2.1 Contribution des auteurs

J'ai réalisé la purification des phages et de leur ADN, l'analyse de leur homologie par hybridation de type Southern, leur observation en microscopie électronique et tous les travaux se rattachant à l'amélioration de la technique de PCR multiplex. J'ai également rédigé l'article. Simon Labrie a analysé les génomes de phages de l'espèce P335 et produit la figure 2.3. Dr Marie-Christine Chopin a contribué à la rédaction de l'article. Finalement, le Dr Sylvain Moineau a supervisé le projet et participé activement à la rédaction de l'article.

2.2.2 Publication

Deveau, H., S. J. Labrie, M.-C. Chopin et S. Moineau. 2006. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4338-4346.

2.3 Abstract

In this study, an in-depth review of the classification of *Lactococcus lactis* phages was performed. Reference phages as well as unclassified phages from international collections were analyzed by stringent DNA-DNA hybridizations, electron microscopy observations, and sequence analyses. A new classification scheme for lactococcal phages is proposed that reduces the current twelve groups to eight. However, two new phages (Q54 and 1706), which are unrelated to known lactococcal phages, may belong to new emerging groups. The multiplex PCR method currently used for the rapid identification of phages from the three main lactococcal groups (936, c2, and P335) was improved and tested against the other groups, none of which gave a PCR product, confirming the specificity of this detection tool. However, this method does not detect all members of the highly diverse P335 group. The lactococcal phages characterized here were deposited in the Felix d'Herelle Reference Center for Bacterial Viruses and represent a highly diverse viral community from the dairy environment.

2.4 Introduction

Strains of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* are used by the dairy industry to acidify milk during the manufacture of fermented products such as cheese, buttermilk, and sour cream. The use of various *L. lactis* strains is essential for controlling virulent phages that are responsible for most milk fermentation collapses (41). Lactococcal phages are ubiquitous in the dairy environment as they are found in raw milk and survive pasteurization (13, 36). Due to their negative effects on fermentation as well as their biodiversity within this ecological niche, numerous lactococcal phages have been isolated and characterized with the overall aim of improving phage control strategies. Currently, only coliphages have received more attention than lactococcal phages (1, 2). All known *L. lactis* phages have a double-stranded genome and a non-contractile tail. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), *L. lactis* phages are members of the *Caudovirales* order, an extremely large, morphologically and genetically diverse group that encompasses over 95% of all known phages (37). This order contains three families: the *Myoviridae* (long contractile tails), *Siphoviridae* (long non-contractile tails), and *Podoviridae* (short tails). Lactococcal phages are mainly members of the *Siphoviridae* family with a few from the *Podoviridae* family.

Over a decade ago, a classification scheme, which was mainly based on phage morphology and DNA homology criteria, was developed for lactococcal phages (3, 4, 7, 25, 32). It is made up of twelve lactococcal phage groups and has been successfully used for comparing lactococcal phages isolated from around the world. It rapidly became obvious that the vast majority of lactococcal phages belong to one of three main groups: 936, c2, and P335. Consequently, most studies on lactococcal phages have dealt with these groups. For example, a multiplex PCR method is now available to rapidly assign newly isolated phages to one of these three main groups (29). Moreover, 14 complete lactococcal phage genomic sequences are now available in public database (www.ncbi.nlm.nih.gov), including ten from the P335 group, two from the c2 group, and two from the 936 group. The genome of phage ascc ϕ 28 from a fourth species (P034) was also reported a few years ago (27, 28) but

the sequence is not yet available. Many other lactococcal phage genome projects are also underway.

The cataloging scheme for lactococcal phages has been under scrutiny lately due to the comparative analysis of an increasing number of genomic sequences and the recurring emergence of new virulent phages (14, 42). For instance, comparative genome analysis has led to a proposal to merge the BK5-T species with the P335 species, reducing the number of lactococcal phage species to eleven (30). Based on DNA-DNA hybridization studies, others have also suggested to include the 1483 and T187 species into the P335 group (24, 30, 43, 47).

Despite the strategies developed to control phages, this biotechnological problem still remains the most common cause of slow or incomplete milk fermentation. The biodiversity and the evolution of the phage populations are partly responsible for the difficulty in controlling them. Phage populations in dairy factories are also in a dynamic state and their composition must be closely monitored to ensure the efficacy of the current control strategies that are based, in part, on the phage species sensitivity of *L. lactis* strains (40, 42). Consequently, the aim of this study was to reassess the classification system of *L. lactis* phages.

2.5 Materials and Methods

Bacterial strains, phages, and media. The *Lactococcus lactis* strains and bacteriophages used in this study are listed in Table 2.1. Strains were grown at 30°C in M17 broth (51) supplemented with 0.5% glucose (GM17) (Quélab) unless otherwise specified. All phages were propagated from a single plaque as described previously (19). High phage titers were obtained using the method of Jarvis (22). To obtain maximal titers and/or visible plaques, some phages (1483, 949, P087, P369, KSY1, and 1706) and their respective hosts were incubated at 22°C for 24 hours. Glycine (0.5%) was also added to the top agar to increase plaque size and facilitate phage enumeration (33). The induction of lactococcal prophages was performed as described previously (41). When needed, phage lysates were concentrated with PEG (12, 22, 23) and purified on a discontinuous-step CsCl gradient (49). Ultracentrifugation was performed using a Beckman SW41 Ti rotor at 35,000 rpm for 3 h.

Phage DNA analysis. The genomic DNAs of phages ul36, r1t, 1706, Q54, c2, and bIL170 were isolated using Maxi Lambda DNA purification kits (Qiagen) according to previously described modifications (18). The DNAs of phages P369, 1483, 1358, 949, 1138, P087, and KSY1 were isolated from CsCl-purified phages as reported elsewhere (12). Lastly, the DNAs of phages T189, bIL168, BK5-T, GR6, and CB17 were isolated using a previously described protocol (41). Restriction endonucleases (Roche Diagnostics) were used as recommended by the manufacturer. After restriction, phage DNA samples were heated for 10 min at 70°C to avoid possible cohesive end ligation. The DNA fragments were separated on 0.8% agarose gels in 1X TAE buffer and visualized by UV photography after staining with ethidium bromide. The phage DNA was transferred to positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics) by capillary blotting as described by Sambrook and Russell (49). Phage genomic DNAs used as probes were randomly labeled with Dig High-Prime labeling kits (Roche Diagnostics). Prehybridizations, hybridizations, washes, and detection by chemiluminescence (CDP-star) were performed as suggested by the manufacturer (Roche Diagnostics).

Table 2.1: List of bacteriophages and host strains used in this study.

Family	Phage	Species		<i>L. lactis</i> host	Reference	Source
		New	Old ^a			
<i>Siphoviridae</i>						
	bIL170	936	936	IL1403	15	U. Laval ^c
	c2	c2	c2	LM0231	35	U. Laval ^c
	CB17	c2	Unclassified ^b	SMQ-436	This study	This study
	GR6	c2	Unclassified ^b	SMQ-361	This study	This study
	1483	P335	1483	111	23, 24	U. Laval ^c
	r1t	P335	P335	R1K10	34, 55	U. Laval ^c
	T189	P335	T187	205.RV	47	B. Geller ^d
	ul36	P335	P335	SMQ-86	30	U. Laval ^c
	BK5-T	P335	BK5-T	H2	17	F. K. Vogensen ^e
	949	949	949	ML8	23	U. Laval ^c
	bIL168	949	Unclassified ^b	IL16	-	This study
	P087	P087	P087	C10	7, 32	H. Neve ^f
	1358	1358	1358	582	23	U. Laval ^c
	1706	1706	Unclassified ^b	SMQ-450	This study	C. Fremaux ^g
	Q54	Q54	Unclassified ^b	SMQ-562	This study	This study
<i>Podoviridae</i>						
	1138	P034	Unclassified ^b	SMQ-450	This study	C. Fremaux ^g
	P369	P034	P034	F7/2	7, 32	H. Neve ^f
	KSY1	KSY1	KSY1	IE-16	50	U. Laval ^c

^a Species from previous classification (25).

^b Unclassified by multiplex PCR (29).

^c Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses, Université Laval, Québec, Canada (www.phage.ulaval.ca).

^d Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.

^e Department of Food Science, The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), Frederiksberg, Denmark.

^f Institute of Microbiology, Federal Dairy Research Center, Kiel, Germany.

^g Danisco, Dangé Saint-Romain, France.

Electron microscopy. First, 1.5 ml of phage lysate (10^8 - 10^9 pfu/ml) was centrifuged for 1 h at 4°C (24,000 g). The supernatant (approx. 1.4 ml) was gently discarded. The remaining lysate was diluted twice by the addition of 1 ml of ammonium acetate (0.1 M, pH 7.5) and centrifuged (1 h at 24,000 g, 4°C). The phage solution (15 µl) was mixed with the stain (15 µl of 2% phosphotungstic acid, pH 7.5) on a nickel Formvar-Carbon coated grid (Pelco

International). The liquid was removed after 1 min by touching the edge of the grid with blotting paper. Phage morphology was observed using a JEOL 1230 transmission electron microscope at 80 kV. Dimensions of the phages are the means of at least 10 specimens.

PCR and DNA sequencing. For the multiplex PCR, the DNA template was made up of phage lysate treated with DNase (final concentration 1 µg/ml, 30 min at 37°C). The conditions and primers were as previously described (29). PCR products corresponding to the genes coding for the major capsid proteins (*mcp*) of c2-like phages GR6 and CB17 were sequenced on both strands using specific oligonucleotides (29) and an ABI Prism 3700 apparatus from the genomic platform at the Centre Hospitalier de l'Université Laval. The 16S rDNA genes were amplified for strains *L. lactis* SMQ-450 and SMQ-562 using domain bacteria-specific primers SSU27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG'3) and SSU1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT'3).

Bioinformatic analysis. Computer-assisted DNA analyses were performed using version 10.3 of the Genetics Computer Group sequence analysis software package, including GenBank release 146.0, GenPept release 146.0, UniProt release 4.3, Swiss-Prot release 46.3, TrEMBL release 29.3, NREF release 1.64, PROSITE release 18.45, Pfam release 14.0, REBASE release 503, and the ClustalW website (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). PSI-BLAST and Advanced Blast Search 2.1 were also used for sequence comparisons with databases (5).

Nucleotide sequence accession numbers. The complete genomic sequences of the P335-like phages analyzed in this study are available under the following GenBank accession numbers: 4268 (AF489524), bIL285 (AF323668), bIL286 (AF323669), bIL309 (AF323670), BK5-T (AF176025), phiLC3 (AF242738), r1t (U38906), TP901-1 (AF304433), Tuc2009 (AF109874), and ul36 (AF349457). For the c2-like phages, in addition to the complete genomic sequences of phages c2 (L48605) and bIL67 (L33769), the nucleotide sequences of the genes coding for the major capsid protein are available for phage eb1 (AF152410), Q44 (AF152412), Q38 (AF152411), CB17 (DQ110947), and GR6 (DQ110948). Complete genomic sequences are available for the 936-like phages sk1 (NC_001835) and bIL170 (NC_001909).

2.6 Results

Selection of the lactococcal phages. As a first step, a representative of each of the 12 previously recognized lactococcal phage species was obtained (Table 2.1). Whenever possible, we selected a phage for which the complete genomic sequence was already available. Seven reference phages [949, 1358, 1483, c2, KSY1, bIL170 (936 species), and ul36 (P335 species)] were obtained from the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses (www.phage.ulaval.ca) at Université Laval (Quebec City, Canada). Phage T189 was provided by B. Geller (Oregon State University, USA) and was used as a representative of the T187 species since phage T187 is no longer available. Phages P087 and P369 (P034 species) were provided by H. Neve (Institute of Microbiology, Federal Dairy Research Center, Germany) and phage BK5-T was provided by F. K. Vogensen (KVL University, Denmark). Unfortunately, we could not obtain a viable representative of the P107 species, not even from the laboratory that originally isolated this phage (32). All the samples provided failed to generate the restriction profile for P107 (7) and all the P107 lysates contained a phage that belonged to the 936 species (data not shown). This lactococcal reference phage thus appears to be extinct. We also included prophage r1t as another representative of the P335 species because it shares only 11% nucleotide identity with the virulent P335-like phage ul36 (30). Lastly, six unclassified lactococcal phages (bIL168, CB17, GR6, Q54, 1138, 1706) obtained from various collaborators were also included in this study. Whenever possible, the DNA restriction profiles of these phages were compared to published profiles to confirm their identity.

Analysis of genomic DNA by Southern hybridization. DIG-labeled genomic probes were produced from each of the previously described lactococcal species and were hybridized with the restricted genomes of the 18 phages studied. To take into account the genetic diversity previously observed within the P335 species (30), a genomic probe was made from each of the two representatives (r1t and ul36) of this group.

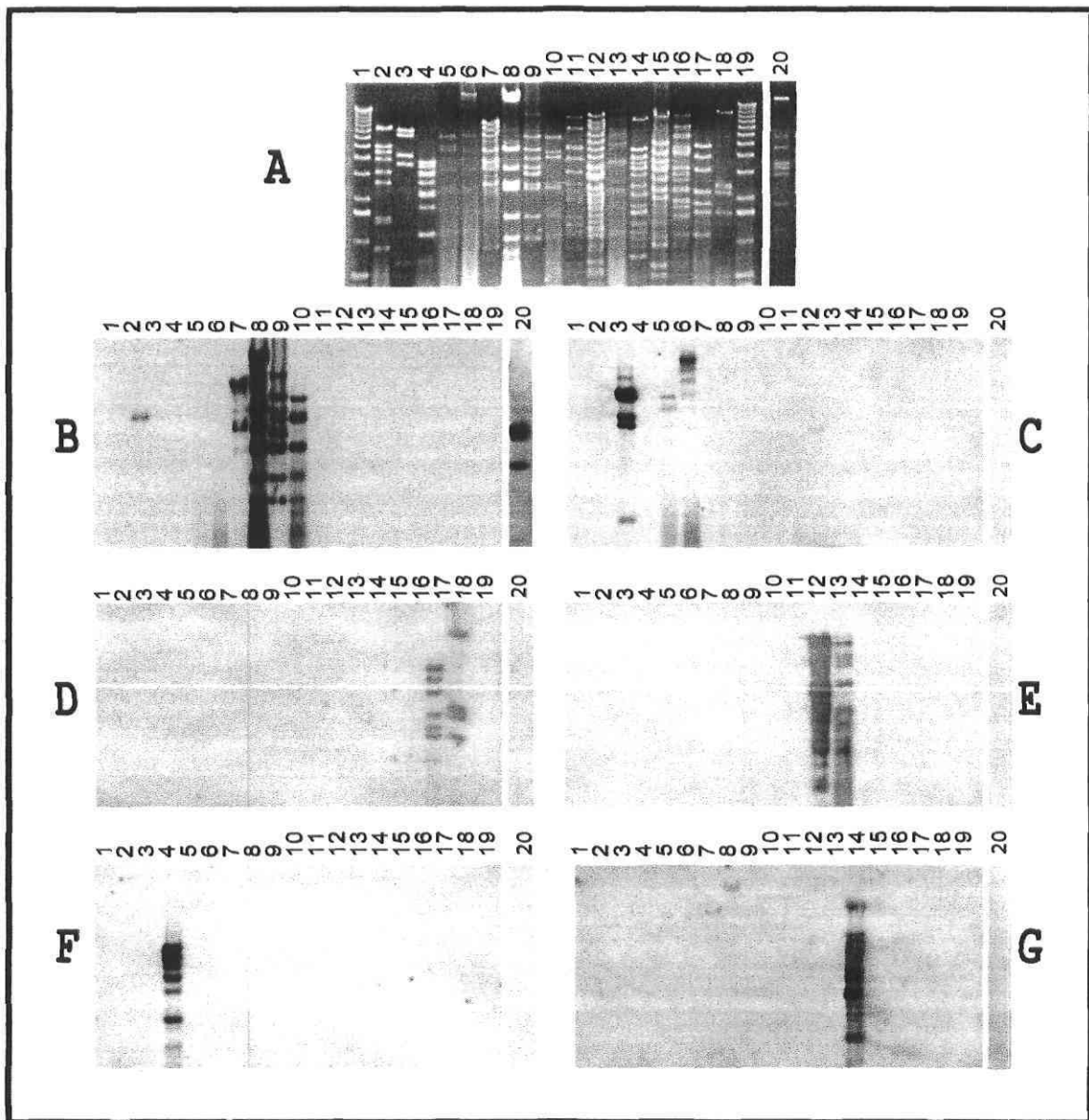


Figure 2.1: Panel A, restriction profile of lactococcal phages analyzed in this study. Panel B, analysis of phage genomic DNA by Southern hybridization using the complete genome of phage r1t as a probe; Panel C, c2-probe; Panel D, P369-probe; Panel E, 949-probe; Panel F, Q54-probe; Panel G, 1706-probe. Lanes 1 and 19, 1 kb DNA ladder (Invitrogen); lane 2, phage bIL170 (genome digested with EcoRV); lane 3, c2 (EcoRI); lane 4, Q54 (EcoRI); lane 5, GR6 (EcoRI); lane 6, CB17 (EcoRI); lane 7, ul36 (EcoRV); lane 8, r1t (EcoRV); lane 9, 1483 (EcoRV); lane 10, T189 (EcoRV); lane 11, P087 (EcoRV); lane 12, 949 (EcoRV); lane 13, bIL168 (EcoRV); lane 14, 1706 (EcoRV); lane 15, 1358 (EcoRI); lane 16, KSY1 (AsnI); lane 17, P369 (EcoRV); lane 18, 1138 (EcoRV).

Phages bIL170, KSY1, P087, and 1358 only hybridized with themselves (data not shown), which is in agreement with previous reports (7, 23, 25). Phages 1483, T189, and BK5-T (Figure 2.1, panel B) shared homology with P335 phages r1t and ul36. A weak hybridization signal of the r1t probe with the restricted genome of bIL170 (936 species) was also noted (Figure 2.1, panel B). Based on the complete genomes of bIL170 (15) and r1t (55), this area was identified as a 950-bp region that shares 91% nucleotide identity (14) and codes for the neck passage structure protein (9). The significance of this protein remains to be investigated as not all members of these two phage groups possess this morphological feature. The c2-genomic probe strongly hybridized with the genome of the unclassified phages CB17 and GR6 (Figure 2.1, panel C). The P369 probe strongly hybridized with the genome of phage 1138 (Figure 2.1, panel D). Likewise, the genome of phage bIL168 clearly hybridized with the 949 probe (Figure 2.1, panel E).



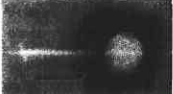


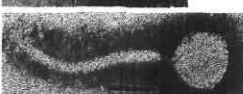



None of the probes from the known lactococcal phage species hybridized with the genomes of phage Q54 or 1706. A Q54 probe and a 1706 probe also failed to hybridize with the other lactococcal phage genomes (Figure 2.1, panels F and G respectively).

Phage morphology. The 18 lactococcal phages were observed by transmission electron microscopy to determine their morphology (Table 2.2). Some of these phages have already been characterized and our observations were in agreement with published data (3, 7, 23, 25). Fifteen phages had a long non-contractile tail and belonged to the *Siphoviridae* family while three phages (P369, KSY1, 1138) had a short tail and belonged to the *Podoviridae* family. Phages sharing DNA-DNA homology had the same morphotype (1) but some morphological features (tail length, presence of a collar structure, baseplate) slightly varied. For example, phage bIL170 has a collar structure that is absent in phage sk1 (data not shown). Only one additional gene is necessary for the presence of this structure (9, 15). Moreover, it is known that the tape measure protein determines the tail length and that a mutation in its gene can lead to tail size variations (45, 56).

Phage 1706, which share no homology with the other phages analyzed in this study, had a morphology not previously reported for lactococcal phages (Table 2.2). The size of the capsid of phage 1706 was similar to P087 but its non-contractile tail was longer. On the other hand, the morphology of phage Q54 resembles that of phage c2. Host strains for these

phages, *L. lactis* SMQ-450 (host for 1706) and *L. lactis* SMQ-562 (host for Q54), are used commercially in mesophilic starter cultures to make fermented milk products. The identity of the bacterial species was confirmed by 16S sequencing (data not shown). Moreover, host range analyses revealed that *L. lactis* SMQ-450 was sensitive to the lactococcal phages 1706 and 1138 while *L. lactis* SMQ-562 was sensitive to lactococcal phages Q54 and 949.

Table 2.2: Morphological diversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis*.

Family	Species	Phage	Capsid diameter (nm)	Tail width (nm)	Tail length (nm)	Electron micrograph ^a
<i>Siphoviridae</i>	936	bIL170	50	11	126	
	P335	ul36	49	7	104	
	1358	1358	45	10	93	
	c2	c2	54 X 41	10	95	
	Q54	Q54	56 X 43	11	109	
	P087	P087	59	14	163	
	949	949	70	12	490	
	1706	1706	58	11	276	
	<i>Podoviridae</i>	P034	P369	57 x 40	5	19
KSY1		KSY1	223 X 45	6	32	

^a Bars represent 50 nm.

Based on DNA-DNA hybridization and morphology results, 16 of the phages studied here could be classified into eight groups (Table 2.1). The two remaining phages (1706 and Q54), which were unrelated to the others, might be members of new emerging groups.

Multiplex PCR test for the identification of phages. As indicated previously, a multiplex PCR method is available to identify the three predominant lactococcal phage groups for which the sequences of several members is known, namely, 936, c2, and P335-like phages (29). The accuracy of this method was checked on the 18 selected phages (Figure 2.2). As expected, PCR amplicons of the predicted size were obtained for the reference phages c2, bIL170 (936 species), and r1t (P335 species). Interestingly, phage 1483 gave a PCR product of a size expected for a P335-like phage. This observation, together with DNA-DNA hybridization results (Figure 2.1, panel B), suggested that it may belong to the P335 group (Figure 2.2). We failed to obtain a PCR product with the other 14 phages. The negative PCR results with phages ul36 and BK5-T (P335 species) have been discussed in the past and are due to the absence of the target region in their genome (29, 30).

Surprisingly, the multiplex PCR method (29) failed to identify phages CB17 and GR6 as members of the c2 species. The two primers (c2A and c2B) used to amplify a 474-bp product specific to c2-like phages are based on two conserved regions (20 nucleotides) in the gene coding for the major capsid protein. The regions covering both primers were sequenced on phages CB17 and GR6 and compared with similar sequences in public databases (Figure 2.2, Panel C). The c2A-primer regions in phages CB17 and GR6 are identical to the same sequences for other c2-like phages. However, the c2B primer contained three nucleotide mismatches (Figure 2.2, Panel C). Of particular interest was the mismatch at the 3'-end that corresponds to the wobble base of the serine codon. A new oligonucleotide (c2C) was designed in which the 20-mer was shifted one nucleotide to avoid the 3' codon base. The multiplex PCR method was retested using the c2A/c2C primer pair. The three c2-like phages (c2, CB17, GR6) generated a 475-pb PCR product while the 14 lactococcal phages of the other species did not generate PCR products (Figure 2.2, Panel B). To confirm the efficacy of this new set of c2-specific primers, 13 other distinct c2-like phages (bIL67, Q44, eb1, ml3, HD1, HD2, HD4, HD7, HD25, HD26, GR3, GR4, and

CB27) were tested. A PCR product of the expected size was obtained with all of them (data not shown).

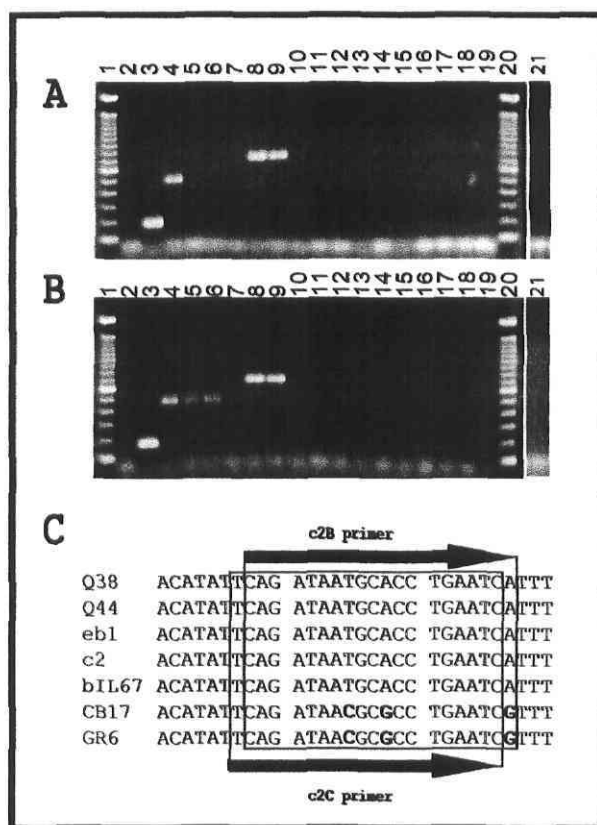


Figure 2.2: Identification of the lactococcal phage species using the method of multiplex PCR. Panel A, the three pairs of primers previously described (29) were used in the PCR. Panel B, c2B-primer (used in panel A) was replaced by c2C-primer. Lanes 1 and 19, 1kb DNA ladder (Invitrogen); lane 2, negative control; lane 3, bIL170; lane 4, c2; lane 5, GR6; lane 6, CB17; lane 7, Q54; lane 8, r1t; lane 9, 1483; lane 10, ul36; lane 11, T189; lane 12, P087; lane 13, 949; lane 14, bIL168; lane 15, 1706; lane 16, 1358; lane 17, KSY1; lane 18, P369; lane 19, 1138. Panel C, analysis of the region covered by the primers c2B and c2C for c2-like phages for which the gene coding for the major capsid protein is available in GenBank.

2.7 Discussion

The lactococcal phage classification system was first set up to characterize these phages and provide better ways to control phage infections. This pragmatic classification (7, 25) has been universally applied and has led to a comparison of lactococcal phage collections worldwide, providing valuable results. However, more sequence data, together with the isolation of new phages and the absence of an international reference collection housing reference phages, led us to revise the previous classification and to deposit all the phages used in this study in the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses (www.phage.ulaval.ca). In our opinion, this phage set represents the best-characterized bank of viruses that share a well-defined ecological niche and that infect a single bacterial species.

Of the twelve phage groups previously described (7, 25), one appeared extinct (P107) while three others (1483, T187, and BK5-T) were merged with the P335 group, reducing the number of lactococcal phage groups from twelve to eight. Nonetheless, additional lactococcal phage groups may exist. For example, phages 1706 and Q54, which were unrelated to the other phages, could be members of two novel groups. The genomic analysis of these new phages is currently underway and will likely shed light on their origins and relationships with known lactococcal phages.

As indicated above, no member of the P107 species could be retrieved from any collection and thus could not be analyzed in this study. Unfortunately, this is not the first time that a lactococcal phage has been lost. Two previous studies reported the isolation of three phages of the *Myoviridae* family that infect *L. lactis*. Phage RZh was described prior to 1970 but has been since lost (53). The second lactococcal myophage was named c10III, but this classification remains uncertain since no contracted sheath was observed (26). In fact, the description and electron micrographs of phage c10III are very similar to phage P087 used in the study reported here, and both infect the same *L. lactis* strain (C10). However, since phage c10III is no longer available, the hypothetical relationship with phage P087 could not be investigated. A third putative lactococcal *Myoviridae* was observed by transmission electron microscopy but could not be propagated (52). In the same study, a rare phage with

a C1-morphotype (isometric capsids, short tail) was also observed but was not amplified (52). The loss of these phages points to the need to deposit key phage representatives in public repositories and, ideally, in more than one collection around the world to ensure continued access to them and the reproducibility of future studies.

Three phage groups were merged with P335 due to the high degree of genome mosaicism in this species. Sequencing data revealed that P335 phages have variable genomes that share only 10–33% homology (14). This gradient of genetic diversity is likely the consequence of recombination within an infected cell of the genomes of incoming lytic and prophage DNA (6, 41). Some members (such as phage ul36) are particularly prone to such recombination (6, 41). This genome plasticity is likely a way to adapt to a new environment via host and phage resistance mechanisms. From a classification point of view, DNA-DNA hybridizations (Figure 2.1) and a comparative analysis of the ten P335-like genomes (Figure 2.3) showed that the P335-like phages are a perfect example of a polythetic species. Indeed, the P335 species is composed of interconnected isolates with shared properties or modules. However, no single attribute is shared by all known members of this species. Such a mosaic structure makes it unfeasible to detect all the members of this species using either a single phage genome as a probe for DNA-DNA hybridizations or a single pair of primers for PCR assays (30). Previously, it was suggested that a dUTPase gene (Figure 2.3) could be used as a target for the PCR detection of P335 phages because, at the time, it was found in all genomes of P335-like phages for which the complete sequence was available (30). However, no dUTPase gene was found in the recently analyzed genome of the virulent phage 4268 (P335 species).

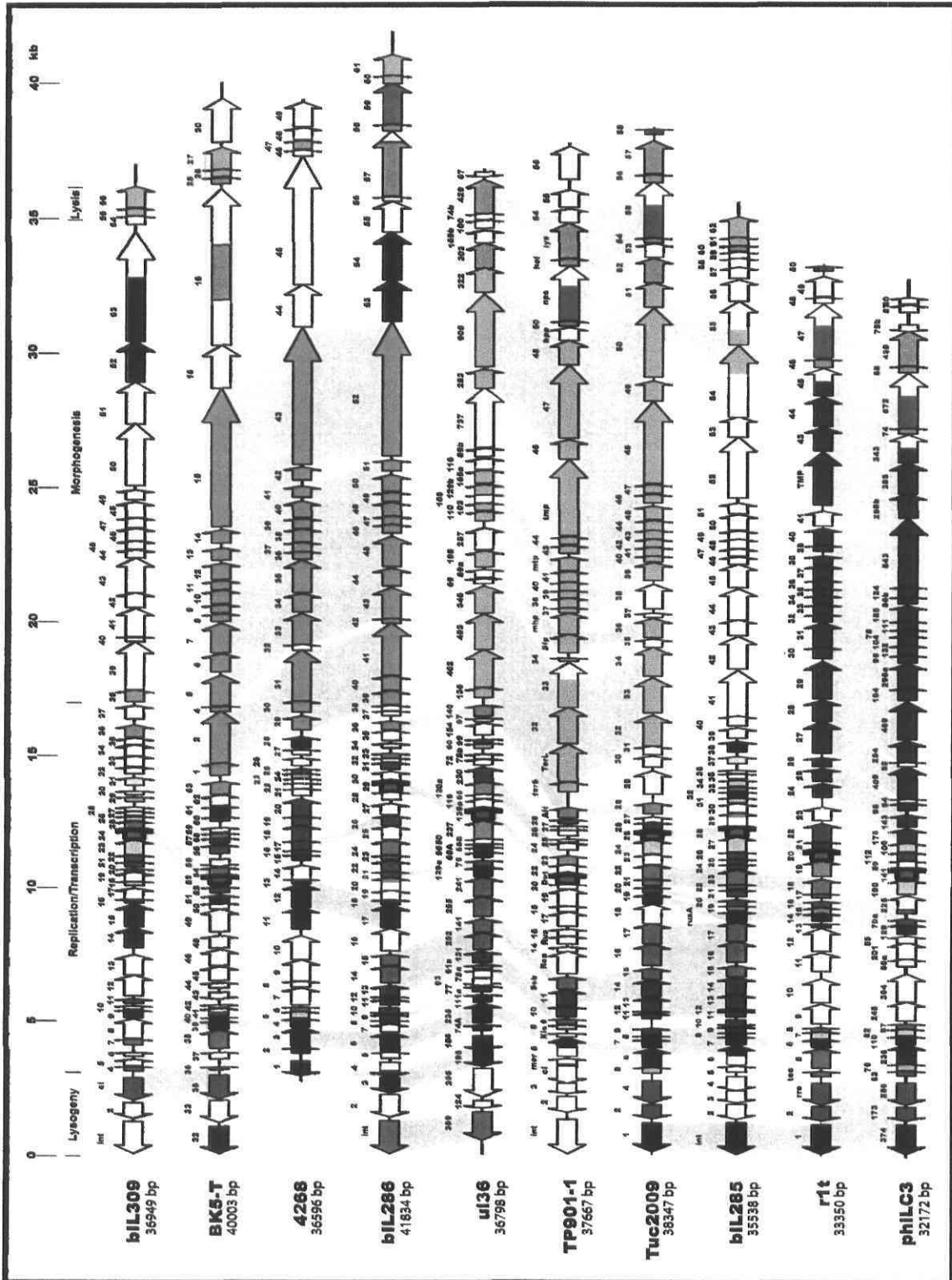


Figure 2.3: Alignment of the genetic maps of the completely sequenced lactococcal phages genomes belonging to the polythetic P335 species. The deduced proteins sharing more than 60% amino acid identity are represented using the same color and linked using grey shading when possible. ORFs with unique sequence are displayed in white.

The above results are indicative of the great biodiversity of lactococcal phages. However, phages from genetically different groups do not have the same commercial importance. Three predominant groups (936, c2, and P335) account for 98% of known lactococcal phages and are responsible for most dairy fermentation breakdowns (39, 40). One could speculate on why members of these three lactococcal phage groups predominate in this ecological niche. Clearly, the systematic use of selected *L. lactis* hosts with specific industrially relevant properties has led to the amplification of these phages in dairy factories. Some of them even survive, to various degrees, the pasteurization process (13, 36). However, one remarkable feature is the relative ease with which phages from these three species can propagate and reach high titers compared to the other lesser-known lactococcal phages. Undoubtedly, this basic fitness parameter likely explains their widespread distribution and recovery. Other lactococcal phage species are more often isolated from raw milk rather than from failed fermentations. These phages may not propagate efficiently in a factory environment, which is characterized by higher temperatures, rapid growth of would-be host strains, and mechanical constraints. For some of these species, it has also been difficult to obtain high titers in laboratory conditions and plaques are usually very small. For example, lactococcal phages of the *Podoviridae* family (P034 and KSY1) have a long latent period that may explain the lower titers (27, 50). Moreover, we observed large numbers of capsids without tails during our electron microscopic observations, indicating that phages with longer tails (949, P087, and 1706) were easily damaged (data not shown). Thus, like other viral communities, rare phages most probably serve as a “bank” and can become abundant in response to very specific environmental conditions (8). Then again, phages Q54 and 1358 are not frequently isolated but were easily amplified using standard protocols. They may represent emerging groups. It will be interesting to analyze these phages in greater detail to gain a better understanding of their propagation and genetic make-up.

In this study, electron microscopic observations, Southern hybridizations, and comparative sequence analyses (when complete genomes were available) were used to classify lactococcal phages into ten groups. Phage classification has always been a subject of controversy (20, 31, 44, 48). For example, it has been suggested that P335 be split into three separate groups, namely r1t, Sfi11, and Sfi21 (16, 46). This proposal was based on the

comparative genomics of a structural gene module (capsid or tail) and on the study of phages active against *Streptococcus thermophilus* strains. Considering that P335-like phages are prone to genetic recombination through homologous recombination (6, 41) and that comparative complete genome analyses have illustrated the polythetic nature of this species, it may be premature to separate them into different groups. Moreover, despite the fact that *L. lactis* and *S. thermophilus* are used in dairy fermentation processes, they are very different bacterial species. *S. thermophilus* appears to be a species that has only recently emerged, that has a clonal structure (21), and that is sensitive to only one known polythetic species of temperate/lytic phages (10). In contrast, *L. lactis* strains are diverse and, as shown in this work, they are sensitive to several genetically unrelated groups of phages. It thus seems a risky exercise to attempt to classify lactococcal phages by singling out one method as a universal taxonomic scheme (44, 54).

The revised classification of lactococcal phages and the improved multiplex PCR test presented in this work provide the basic knowledge and methodology needed to rapidly identify phages responsible for fermentation breakdowns and to follow the evolution of subdominant phages. It also underlines the need to study the viruses in a given ecological niche as a whole by correlating phenotypic properties with genomic comparisons. Up to now, the only lactococcal phages characterized are members of the three predominant groups. The characterization of rare phages will likely provide additional information on their biodiversity.

2.8 Acknowledgments

We would like to thank Hans-Wolfgang Ackermann, Steve Labrie, Denise Tremblay, and Alain Chopin for helpful discussions, Claudia Bergeron, Geneviève Rousseau, Christophe Frémaux, Horst Neve, and Finn Vogensen for providing phages and hosts, and Gene Bourgeau for his editorial assistance. Hélène Deveau is the recipient of a graduate student scholarship from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). This study was funded by a strategic grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

2.9 References

1. **Ackermann, H.-W.** 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol.* **146**:843-857.
2. **Ackermann, H.-W.** 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* **154**:245-251.
3. **Ackermann, H.-W., E. D. Cantor, A. W. Jarvis, J. Lembke, and J. A. Mayo.** 1984. New species definitions in phages of Gram-positive cocci. *Intervirology* **22**:181-190.
4. **Ackermann, H.-W., M. S. Dubow, A. W. Jarvis, L. A. Jones, V. N. Krylov, J. Maniloff, J. Rocourt, R. S. Safferman, J. Schneider, L. Seldin, T. Sozzi, P. R. Stewart, M. Werquin, and L. Wünsche.** 1992. The species concept and its application to tailed phages. *Arch. Virol.* **124**:69-82.
5. **Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
6. **Bouchard, J. D., and S. Moineau.** 2000. Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology* **270**:65-75.
7. **Braun, V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis, and M. Teuber.** 1989. Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2551-2560.
8. **Breitbart M., and F. Rohwer.** 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* **13**:278-284.
9. **Brondsted, L., S. Ostergaard, M. Pedersen, K. Hammer, and F. K. Vogensen.** 2001. Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: Evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* **283**:93-109.
10. **Brüssow, H., and F. Desière.** 2001. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.* **39**:213-222.
11. **Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson, and A. J. Hillier.** 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* **26**:49-64.
12. **Chibani Azaiez, S. R., I. Fliss, R. E. Simard, and S. Moineau.** 1998. Monoclonal antibodies raised against native major capsid proteins of lactococcal c2-like bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4255-4259.
13. **Chopin, M. C.** 1980. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J. Dairy Res.* **47**:131-139.
14. **Chopin, A., A. Bolotin, A. Sorokin, S.D. Ehrlich, and M.-C. Chopin.** 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.* **29**:644-651.
15. **Crutz-Le Coq, A.-M., B. Cesselin, J. Commissaire, and J. Anba.** 2002. Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. *Microbiology* **148**:985-1001.

16. **Desiere, F., S. Lucchini, C. Canchaya, M. Ventura, and H. Brüssow.** 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:73-91.
17. **Desiere, F., C. Mahanivong, A. J. Hillier, P. S. Chandry, B. E. Davidson, and H. Brüssow.** 2001. Comparative genomics of lactococcal phages: insight from the complete genome sequence of *Lactococcus lactis* phage BK5-T. *Virology* **283**:240-252.
18. **Deveau, H., M. R. Van Calsteren, and S. Moineau.** 2002. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4364-4369.
19. **Emond, E., B. J. Holler, I. Boucher, P. A. Vandenberg, E. R. Vedamuthu, J. K. Kondo, and S. Moineau.** 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism AbiK from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1274-1283.
20. **Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:2192-2197.
21. **Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. D. Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault, and M. Kleerebezem.** 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:435-463.
22. **Jarvis, A. W.** 1978. Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:785-789.
23. **Jarvis, A. W.** 1984. Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:343-349.
24. **Jarvis, A. W.** 1994. Relationships by DNA-DNA homology between lactococcal phages 7-9, P335 and New Zealand lactococcal phages. *Int. Dairy Journal.* **5**:355-366.
25. **Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, and M. Teuber.** 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* **32**:2-9.
26. **Keogh, B. P., and P. D. Shimmin.** 1974. Morphology of the bacteriophages of lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **27**:411-415.
27. **Kotsonis, S. E.** 1999. Detection and characterization of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis*. Ph. D. thesis. University of Melbourne, Australia.
28. **Kotsonis, S. E., I. B. Powell, and A. J. Hillier.** 1998. Analysis of ascc ϕ 28, a *Lactococcus lactis* phage of a rare morphotype. *Aust. J. Dairy Technol.* **53**:132.
29. **Labrie, S., and S. Moineau.** 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:987-994.
30. **Labrie, S., and S. Moineau.** 2002. Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* **296**:308-320.
31. **Lawrence, J. G., G. F. Hatfull, and R. W. Hendrix.** 2002. Imbroglios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* **184**:4891-4905.

32. **Lembke, J., U. Krisch, A. Lompe, and M. Teuber.** 1980. Isolation and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic) streptococci. *Zentbl. Bakteriol. Abt. Orig. C.* **1**:79-91.
33. **Lillehaug, D.** 1997. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *J. Appl. Microbiol.* **83**:85-90.
34. **Lowrie, R. J.** 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **27**:210-217.
35. **Lubbers, M. W., N. R. Waterfield, T. P. Beresford, R. W. Le Page, and A. W. Jarvis.** 1995. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4348-4356.
36. **Madera, C., C. Monjardin, and J. E. Suarez.** 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7365-7371.
37. **Maniloff, J., and H.-W. Ackermann.** 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the other *Caudovirales*. *Arch. Virol.* **143**:2051-2063.
38. **Mikkonen, M., L. Raisanen, and T. Alatossava.** 1996. The early gene region completes the nucleotide sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* phage LL-H. *Gene* **175**:49-57.
39. **Moineau, S.** 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:377-382.
40. **Moineau, S., and C. Lévesque.** 2005. Control of bacteriophages in industrial fermentation, p. 286-296. *In* E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
41. **Moineau, S., S. Pandian, and T. R. Klaenhammer.** 1994. Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1832-1841.
42. **Moineau, S., D. Tremblay, and S. Labrie.** 2002. Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications. *ASM News* **68**:388-393.
43. **Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu, and P. A. Vandenberg.** 1995. Cloning and sequencing of *LlaDCHI* restriction/modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae DpnII* system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2193-2202.
44. **Nelson, D.** 2004. Phage taxonomy: we agree to disagree. *J. Bacteriol.* **186**:7029-7031.
45. **Pedersen, M., S. Ostergaard, J. Bresciani, and F. K. Vogensen.** 2000. Mutational analysis of two structural genes of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 involved in tail length determination and baseplate assembly. *Virology* **276**:315-328.
46. **Proux, C., D. van Sinderen, J. Suarez, P. Garcia, V. Ladero, G. F. Fitzgerald, F. Desiere, and H. Brussow.** 2002. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **184**:6026-6036.
47. **Relano, P., M. Mata, M. Bonneau, and P. Ritzenthaler.** 1987. Molecular characterization and comparison of 38 virulent and temperate bacteriophages of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:3053-3063.

48. **Rohwer, F., and R. Edwards.** 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* **184**:4529-4235.
49. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
50. **Saxelin M. L., E. L. Nurmiäho, M. P. Korhola, and V. Sundman.** 1979. Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*. *Can. J. Microbiol.* **25**:1182-1187.
51. **Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine.** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**:807-813.
52. **Teuber, M., and J. Lembke.** 1983. The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**:471-478.
53. **Tikhonenko, A. S.** 1970. *Ultrastructure of bacterial viruses*. Plenum Press, N.Y.
54. **van Regenmortel, M. H., and B. W. Mahy.** 2004. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:8-13.
55. **van Sinderen, D., H. Karsens, J. Kok, P. Terpstra, M. H. Ruiters, G. Venema, and A. Nauta.** 1996. Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* **19**:1343-1355.
56. **Vegge, C.S., L. Brøndsted, H. Neve, S. McGrath, D. van Sinderen, and F. K. Vogensen.** 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol.* **187**:4187-4197.

Chapitre 3

Caractérisation de ferments mésophiles mixtes utilisés dans la fabrication de fromage Cheddar de maturation

3.1 Résumé

Soixante et onze souches différentes de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ont été isolées à partir de sept ferments mixtes utilisés pour la production de fromage Cheddar vieilli. Les isolats ont été caractérisés par leurs profils plasmidiques et leurs caractéristiques de croissance dans le lait (avec et sans glucose, acides aminés ou les deux). Deux ferments mixtes sont très hétérogènes, puisqu'ils contenaient de 18 à 24 souches différentes de *L. lactis*, trois ferments mixtes possédaient entre sept et neuf souches distinctes alors que deux ferments sont relativement homogènes ne contenant que deux ou trois souches. Plusieurs souches au contenu plasmidique similaire se comportent de façon différente lors d'une croissance dans le lait, indiquant une variabilité des phénotypes. Seulement 20% des souches isolées peuvent croître dans le lait sans ajout de nutriments supplémentaires. Environ le tiers des souches ne se répliquent pas dans le lait même si du glucose et des acides aminés sont ajoutés. Parallèlement, 25 bactériophages virulents ont été isolés à partir d'échantillons de lactosérum issus de fermentation avec les sept ferments mixtes. Dix-huit phages appartiennent à l'espèce 936 et sept à l'espèce c2. Seulement treize des 71 souches sont insensibles aux 25 phages. Presque toutes les souches sensibles ne répliquent qu'une seule espèce de bactériophage. Finalement, les phages de l'espèce 936 ont un spectre d'hôte plus large que ceux de l'espèce c2.

3.2 Avant-propos

3.2.1 Contribution des auteurs

Frédéric Bissonnette a réalisé l'isolement des souches de *L. lactis*, leur caractérisation, la détermination du spectre lytique et la rédaction de l'article. Steve Labrie a participé à l'isolement et la caractérisation des phages SL et contribué à la rédaction de l'article. J'ai travaillé à l'isolement et à la caractérisation des phages HD, à la détermination de leur spectre lytique sur les souches bactériennes à l'étude et à la rédaction de l'article. Dr Maryse Lamoureux a fait don des échantillons de lactosérum, a assuré la liaison entre l'entreprise de transformation laitière et le laboratoire et collaboré à la rédaction de l'article. Finalement, le Dr Sylvain Moineau a supervisé le projet et participé activement à la rédaction de l'article.

3.2.2 Publication

Bissonnette, F., S. Labrie, H. Deveau, M. Lamoureux et S. Moineau. 2000. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **83**:620-627.

3.3 Abstract

Seventy-one different *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains were isolated from seven mesophilic mixed starters used in the manufacture of aged Cheddar cheese in Canada. Based on plasmid profiles and growth in milk (with or without glucose, casamino acids or both), two mixed starters were highly heterogeneous, containing at least 18 to 24 distinct *L. lactis* strains. Three mixed starters were comprised of seven to nine strains, whereas two starters were relatively homogeneous, containing two or three strains. Many strains with similar plasmid profiles behaved differently during growth in milk, indicating variability in the phenotypes. Only 20% of the strains could grow in plain milk, whereas 30% could not grow in milk even if supplemented with glucose and casamino acids. Twenty-five lactococcal bacteriophages were also isolated from whey samples with single strains as hosts. Eighteen phages belonged to the 936 species and seven to the c2 species. Thirteen strains were insensitive to all 25 phages. Almost all sensitive strains were phage species-specific. The 936-like phages had a broader host range.

3.4 Introduction

Lactococci have been used in the production of fermented dairy products for centuries. Based on microbiological and biochemical characteristics, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* is the preferred organism for the manufacture of aged Cheddar cheese (27). Various strains of *cremoris* are now widely used in commercial mesophilic starter cultures. However, the routine industrial applications of these starters have highlighted their susceptibility to bacteriophages that naturally occur in milk. Furthermore, phage infections are still the most common cause of disturbed milk fermentations (1, 13).

Mesophilic cultures for Cheddar cheeses are mainly divided into two groups, defined or mixed. Most defined starters consist of a blend of two or three well-characterized *cremoris* strains. These strains are ideally phage-unrelated (not attacked by the same phage isolates) to prevent possible lysis of the starter and subsequent fermentation failure. Rotation of defined starters is also implemented to keep phage populations at a minimum level.

Mixed starters are composed of undefined numbers and ratios of *L. lactis* strains, which make them less susceptible to a complete fermentation failure (7, 8, 11). Some mixed starters may even contain phages that coexist with the bacterial strains (24). These cultures are, however, less predictable and more difficult to control under conditions of mechanized cheese making (11). In Canada, many aged Cheddar cheeses are still made with mixed starter cultures because defined starters have failed to provide the expected flavour and quality (14).

When a strain used in a defined starter is found sensitive to a particular phage, the priority action is to replace it with a phage-unrelated strain or a phage-resistant derivative (for review see 1). It is virtually impossible to remove phage-sensitive strains from mixed starters. Thus, the availability of distinct *cremoris* strains is widely sought by dairy microbiologists to guarantee the long-term maintenance of defined starter cultures (18, 20).

As stated by many scientists (10, 18, 19, 20, 26), limited phage-unrelated *cremoris* strains are available for the dairy industry. The addition of such strains would be welcomed in the development of new mesophilic starters. Unfortunately, *cremoris* strains are rarely isolated

from nature while *L. lactis* subsp. *lactis* strains have been frequently isolated from environmental samples such as green plants (18, 19, 20, 26). Salama *et al.* (18, 20) found *cremoris* strains in several raw milk samples. The natural habitat of *cremoris* strains, however, remains to be confirmed (18). Moreover, their ability to make good Cheddar cheese still needs to be addressed. Mixed starters may be a genuine source of *cremoris* strains. Since these starters are extensively employed, they are also exposed to phages and thus, may contain phage-insensitive strains.

The aim of the study was to isolate *cremoris* strains from mixed starters with the long-term goal to develop new defined starters. Seven mesophilic mixed starters, which have been used for over 20 yr to produce premium Canadian-aged Cheddar cheeses, were analyzed for their strain diversity. More than 70 distinct *cremoris* strains were isolated. Twenty-five lytic phages were also isolated from whey samples obtained from dairy plants using one or more of the aforementioned mixed starters. Host range assays showed that all starters contained phage sensitive and insensitive strains.

3.5 Materials and Methods

Mixed starters and bacterial strains

Lactococcus lactis strains used in this study were isolated from seven mesophilic mixed starters (JR58, ML33, NM33, PA48, PJ302, RG70, SL41). Each mixed starter was inoculated (1 %) into heat-treated (121 °C, 10 min) nonfat dry milk (11 % wt/vol, NFD, Agropur, Granby, Qc, Canada) and incubated at 24 °C for 12 h. Isolated colonies were obtained by serial dilutions plated on Turner medium (25). From each culture, 30 colonies were randomly selected, streaked on Elliker plates (Difco, Detroit, MI), and incubated 48 h at 30 °C. One colony per plate was inoculated into Elliker broth and incubated overnight at 30 °C. Cells were centrifuged, resuspended in Elliker broth supplemented with 10 % glycerol, and stored at -80 °C. Bacterial isolates were identified using the starter name as prefix followed by a number.

Plasmid profiles and growth characteristics of *L. lactis* strains

Plasmid DNA from *L. lactis* strains was purified by the method of O'Sullivan and Klaenhammer (17) but with the following modifications: Two phenol/chloroform extractions were performed and sodium acetate was replaced by potassium acetate. Electrophoresis was performed on a 0.8 % agarose gel in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) (21). Plasmid DNA was stained with ethidium bromide and photographed under UV illumination. Bacterial isolates were then inoculated into NFDM and incubated at 30 °C for 16 h. Isolates that did not clot milk were grown in NFDM supplemented with 0.25 % Casamino Acids (Difco), 0.5 % glucose, or both.

DNA extraction for species and subspecies identification

Total DNA was obtained using the protocol of O'Sullivan and Klaenhammer (17) modified as follows: the addition of 3 % SDS and 0.2 N NaOH was replaced by the addition of 10 % SDS with a vigorous vortexing; the pH of the potassium acetate was adjusted to 7 rather than 4.8. The DNA preparation was then boiled for 10 min and chilled on ice for 5 min. One microliter of DNA was placed on a nylon membrane (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) and exposed to UV light for 2 min. Prehybridization and hybridization were performed at 42 °C in Dig Easy Hyb buffer (Roche Diagnostics) with probe 212RLa for the identification of the *Lactococcus* genus and 68RCa for the *cremoris* subspecies (19). Probes were labeled using the DIG oligonucleotides 3'-end labeling kit (Roche Diagnostics). The washing steps were completed as recommended by the manufacturer. The chemiluminescence was detected with CSPD as a substrate. Control strains were *L. lactis* subsp. *cremoris* LM0230, *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, and *Streptococcus thermophilus* SMQ-301. The strain LM0230 is a plasmid-free derivative of *Lactococcus lactis* C2. Although 16S RNA probing has placed strain C2 as a *cremoris* genotype, phenotypically it types out as a *lactis* (19, 20).

Whey samples and phage isolation

Twenty-eight whey samples were obtained from plants using one of the seven mixed starters. Whey samples were amplified for phages on their respective starter and tested on single strains obtained from the mixed starter using a spot test as described previously (13, 14), except that Elliker was used as a culture medium. This assay provided a sensitive host for the phage isolation and amplification. Six well-defined plaques were analysed per whey sample (14). High phage titer was obtained by the method of Jarvis (3).

Restriction analysis of phage DNA and host range

Phage DNA was isolated (16), treated with RNase A and digested with *EcoRI* or *EcoRV*, as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics). Restriction fragments were heat-treated (70 °C for 10 min) and electrophoresed on a 0.8 % agarose gel in TAE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized by UV. Phages with different restriction profiles were designated by the prefix HD or SL followed by a number. The host range was established against the isolated *L. lactis* strains as described previously (14).

Phage species identification

Phage species were identified by DNA-DNA hybridization assays (13). The genome of three reference phages was digested with *EcoRV*, randomly labeled with the DIG high prime labeling kit (Roche Diagnostics), and used as probe (20). Phage Q38 was selected as the representative of the c2 species (13), phage p2 of the 936 species (15), and phage ul36 of the P335 species (14).

3.6 Results

Plasmid profiles

After growth in milk and plating on Turner medium, thirty colonies per mixed starter were picked at random and analyzed for their plasmid content. The number of distinct plasmid profiles was variable among the seven mixed starters studied (Table 3.1). The mixed starters could be roughly divided into two groups. The first group included the starters ML33 and JR58, which had a very complex composition, as 22 and 15 plasmid profiles were distinguished, respectively (Table 3.1 and Fig. 3.1A). The second group (NM33, PA48, PJ302, RG70, and SL41) contained between 2 and 5 plasmid profiles among the thirty colonies tested (Table 3.1 and Fig. 3.1B).

Table 3.1: Number of plasmid profiles, phenotypes, and strains isolated from each mixed starters.

Starter	Plasmid profiles	Phenotype ^a	Strains isolated ^b
JR58	15	4	18
ML33	22	5	24
NM33	2	1	2
PA48	2	5	7
PJ302	5	5	9
RG70	3	2	3
SL41	3	6	8

^a The phenotypes studied are based on the need of glucose and/or casamino acids to produce a curd after 16 hours at 30 °C. The six phenotypes encountered were growth in milk without supplements, need of glucose, need of casamino acids, need of both, slow growth and not able to clot supplemented milk.

^b Based on plasmid profiles and phenotypes.

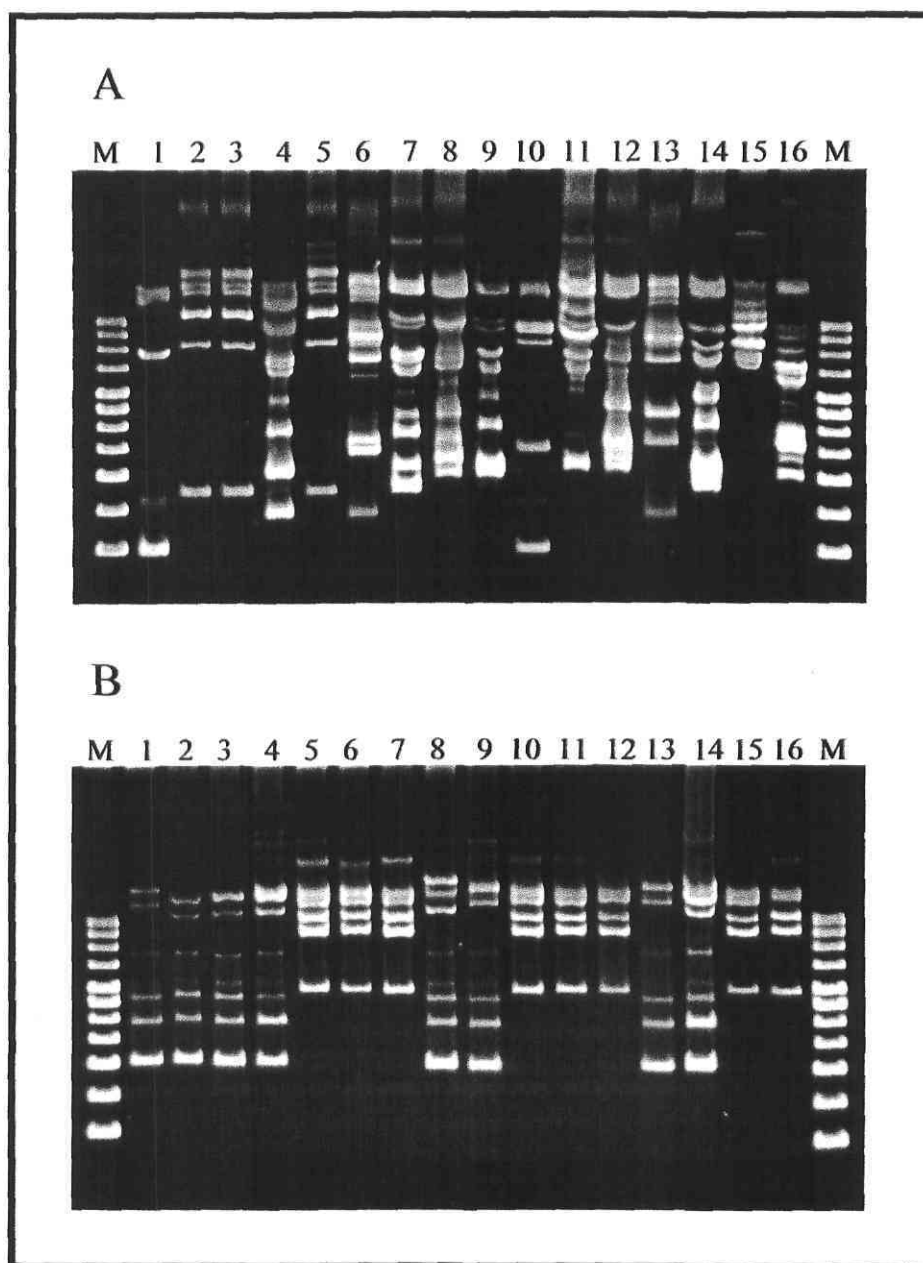


Figure 3.1: Plasmid profiles of ML33 and NM33 isolates. A) Plasmid profiles of ML33 isolates. Lanes: M; Supercoiled DNA ladder (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 kb; Gibco/BRL); 1, ML33-7; 2, ML33-9; 3, ML33-11; 4, ML33-12; 5, ML33-13; 6, ML33-14; 7, ML33-15; 8, ML33-17; 9, ML33-18; 10, ML33-19; 11, ML33-20; 12, ML33-21; 13, ML33-22; 14, ML33-23; 15, ML33-24; 16, ML33-26. B) Plasmid profiles of NM33 isolates. Lanes: 1, NM33-1; 2, NM33-2; 3, NM33-4; 4, NM33-5; 5, NM33-7; 6, NM33-8; 7, NM33-11; 8, NM33-12; 9, NM33-13; 10, NM33-14; 11, NM33-15; 12, NM33-16; 13, NM33-19; 14, NM33-18; 15, NM33-20; 16, NM33-21. Plasmid profile of each isolate is identified using their respective number.

Growth characteristics

All 210 isolates were tested for their ability to coagulate milk at 30 °C. In the absence of growth or lactic acid production, isolates were tested in milk supplemented with casamino acids and/or glucose. The phenotype was then compared to the plasmid profile and groups were determined based on those specifications (Table 3.1). A total of 71 strains were distinguished from the 210 isolates. An example of strain classification is given in Table 3.2 for starter ML33. Interestingly, only 20% (14/71) of the strains could ferment plain milk, whereas 30 % (21/71) were unable to clot milk supplemented with glucose and/or casamino acids (Table 3.3). The mixed starters JR58 and ML33 remained highly complex, whereas PA48, PJ302, and SL41 contained a phenotypically more heterogeneous population than expected from the plasmid profiles (between 7 and 9 strains out of the 30 colonies tested). Finally, the mixed starters NM33 and RG70 were similar to defined cultures as they contained 2 and 3 strains, respectively.

Species and subspecies identification

The species and subspecies of the 71 strains were determined using DNA probes specific for the 16S RNA (19). All strains were genotypically identified as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* since they hybridized with both probes (data not shown).

Table 3.2: Strains isolated from starter ML33 and their characteristics.

Strain representative	Growth in milk (M)	Growth in M + C	Growth in M + G	Growth in M + C + G	Profile group ^b
ML33-5	+	+	+	+	A
ML33-7	+	+	+	+	U
ML33-22	+	+	+	+	U
ML33-19	-	+	-	+	U
ML33-10	-	-	-	+	U
ML33-12	-	-	-	+	U
ML33-20	-	-	-	+	U
ML33-1 ^a	-	+	+	+	A
ML33-6 ^a	-	+	+	+	U
ML33-14 ^a	-	+	+	+	U
ML33-16 ^a	-	+	+	+	B
ML33-23 ^a	-	+	+	+	U
ML33-24 ^a	-	+	+	+	U
ML33-26 ^a	-	+	+	+	U
ML33-27 ^a	-	+	+	+	U
ML33-29 ^a	-	+	+	+	U
ML33-30 ^a	-	+	+	+	U
ML33-2	-	-	-	-	C
ML33-8	-	-	-	-	U
ML33-15	-	-	-	-	U
ML33-17	-	-	-	-	B
ML33-18	-	-	-	-	U
ML33-21	-	-	-	-	U
ML33-25	-	-	-	-	U

^a Slow growing strains.

^b Plasmid group A includes 7 isolates, B has 2, C has 2, and U stands for unique plasmid profile.

M : Milk; G : 0.5 % glucose added; C : 0.25 % casamino acid added

Table 3.3: Number of strains per mixed starter isolated having a particular phenotype.

Starter	Minimum media needed to clot milk					
	M	M + C	M + G	M + C + G	M (Slow)	Not able to curdle
JR58	2	7			1	8
ML33	3	1		3	10	7
NM33	2					
PA48	2	1	1		1	2
PJ302	2	3	1		1	2
RG70	2				1	
SL41	1	2	1	1	1	2
Total	14	14	3	4	15	21

Note : Strains are individual or groups of isolates sharing identical plasmid profiles and phenotype.

M : Milk; G : 0.5 % glucose added; C : 0.25 % casamino acid added; M (slow) : Slow growing strains taking 20 hours or more at 30°C to clot milk.

Phage isolation, restriction patterns, and species identification

Phage isolation was carried out from 28 whey samples. Using lawn made with a single strain isolated from the respective mixed starter, 6 plaques were amplified per whey. In total, phage DNA was isolated from 168 amplifications and digested with *EcoRV* or *EcoRI* (Fig. 3.2). Twenty-five different lactococcal phages were identified. Eight whey samples contained multiple phages (up to 3). Eight phages (HD2, HD4, HD5, HD6, HD7, HD15, HD26, SL11) were also found in several samples. Phage HD4 was most frequently found, being isolated from four whey samples. DNA-DNA hybridizations were conducted to identify the species of the 25 lactococcal phages (4). Seven of them hybridized with the c2 probe (28%) and the 18 others hybridized with the 936 probe (72%). No phages were members of the P335 species. It is noteworthy that whey samples containing multiple phages had members of only one species.

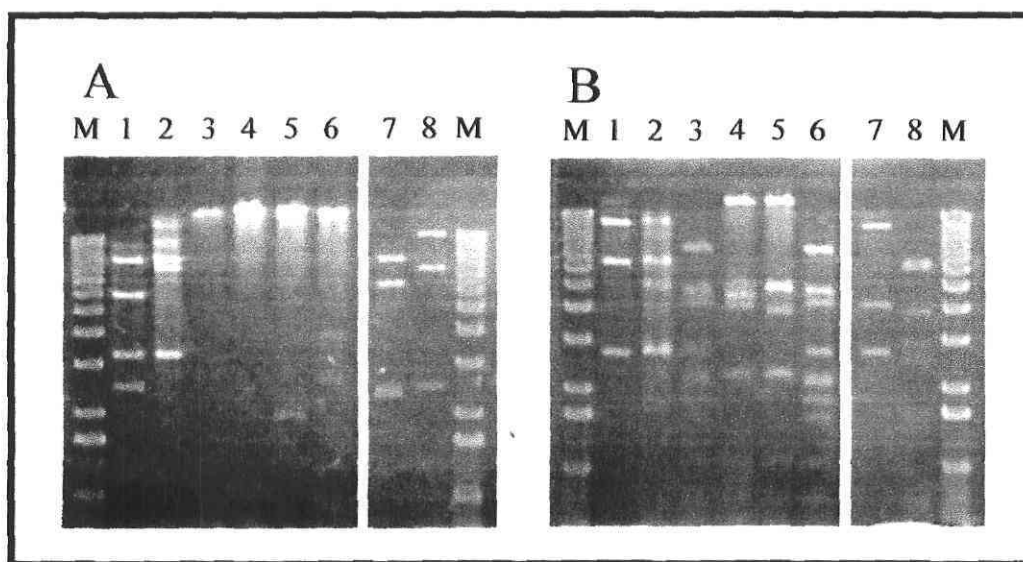


Figure 3.2: Restriction patterns of phage isolates (A : *EcoRI*, B : *EcoRV*). Lanes : M, 1kb DNA ladder (0.5, 1.0, 1.6, 2.0, 3.0, 4.0, 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 9.2, 10.2, 11.2, 12.2kb, Gibco/BRL); 1, phage HD1; 2, HD2; 3, HD3; 4, HD5; 5, HD6; 6, HD24; 7, HD26; 8, HD28.

Host range

The *cremoris* strains were tested for their sensitivity to the isolated phages. The twenty-one strains unable to clot supplemented milk were not included in the assay because they are unlikely to be used in defined cultures. Eleven other strains were discarded as they were unable to grow in top agar and they were also difficult to maintain. Thus, 39 strains were tested against the 25 phages (Table 3.4). The seven mixed starters contained phage-sensitive strains and five starters contained phage-insensitive strains. Overall, 13 strains were insensitive to all phages tested and 26 strains were phage-sensitive, including the strain RG70-1, which was attacked by 10 different phages. Fourteen phage spectra were identified indicating that different strains were infected by the same phages (e.g. JR58-5, -9, -17, and ML33-26) (Table 3.4).

Twenty phages (80 %) could propagate on strains present in two or more starters, whereas five phages (20 %) were starter-specific. Phage HD26 (c2 species) was able to infect strains present in four mixed starters (NM33, PA48, RG70, and SL41). Phages SL5, SL6, SL7, and SL8 (936 species) had a broader host range and could propagate on 15 of the 39 strains tested. Despite having dissimilar restriction profiles, these four phages could infect the same 15 strains.

Five of the seven mixed starters were sensitive to members of only one phage species. Starters JR58, ML33, and PJ302 were attacked by only 936-like phages, while PA48 and NM33 were only sensitive to c2-like phages. Starters RG70 and SL41 could replicate members of both phage species. At the strain level, all sensitive strains, with the exceptions of strains RG70-1 and RG70-27, were phage species-specific. Mixed starter ML33 contained strains able to propagate 14 of the 25 phages isolated in this study. RG70 allowed the replication of 11 phages.

3.7 Discussion

Mixed starter cultures are a potential source of unique phage-insensitive *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains. Mixed starters analyzed in this study have been used for over twenty years in the production of high-quality Canadian aged Cheddar cheese and isolation of premium strains for cheesemaking was anticipated. These starters were previously (M. Lamoureux, personal communication) found to contain only *cremoris* strains, based on microbiological and biochemical criteria (arginine hydrolysis, inability to grow in the presence of 4 % NaCl) (22). Here, a molecular technique (16S rRNA specific DNA probe) was used to confirm these results.

Since only 30 colonies were picked per mixed starter, some strains were probably not isolated due to their low concentration. Nonetheless, the dominant strains were most likely recovered. The number of strains was surprisingly high for two starters (JR58 and ML33). The strain diversity within a starter may be explained by a number of factors. Lactococcal plasmids may have been lost over time. Conjugative plasmids may have been transferred from one strain to another. Insertion, deletion or point mutation within plasmids may also account for this genotype and phenotype heterogeneity. There is also the possibility of rearrangement or integration into the host chromosome. On the other hand, two mixed starters were remarkably homogeneous (NM33 and RG70) suggesting that the extrachromosomal elements are highly stable in these strains and/or that these proficient strains are highly fit to grow in milk.

Many studies reported the grouping of lactococcal strains based on plasmid profiles (6, 8, 11, 23). While it may be valid in some cases, this study confirmed that isolates having identical plasmid profiles might still be distinct using growth characteristics or phage typing. This phenomenon was also observed by other scientists (7, 11). Similarly, some isolates showed identical phage sensitivity but had different plasmid profiles. Thus, a combination of factors should be used to discriminate between strains. We proposed that for *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, plasmid profiles, phage resistance, and growth in milk (supplemented or not) should at least be used in association to differentiate between strains. Looking for other phenotype or genotype would, in all likelihood, lead to the conclusion

that there is no absolute scheme for grouping isolates into strains. The genotype did not always fit the phenotype as reported in the case of the *cremoris* subspecies with the lactate dehydrogenase gene (26) and 16S probes (18).

Surprisingly, many strains from the mixed starters were unable to clot milk without nutritional supplementation. Their growth was most likely supported by other strains. Since the lactose utilization genes are plasmid-encoded (12), the absolute requirement of glucose for growth in milk could be due to the loss of the plasmid or a mutation. McKay *et al.* (12) already reported high rates of spontaneous losses of lactose metabolism in lactococci. Comparable reasons could explain the need of casamino acids, as the proteinase genes are also plasmid-encoded. Several peptidases or peptide/amino acid transport systems may also be mutated or lost (for review see 9). Slow acid producers occur quite frequently in some mixed starters. They needed between 24 to 40 hours at 30 °C to produce a curd in milk (data not shown). Wang *et al.* (28) reported slow milk-coagulating lactococci (48 hours or more to coagulate milk at 21 °C) that resulted from a deficiency in aspartate synthesis.

In an epidemiological study conducted in 1990, Moineau *et al.* (14) reported that members of the c2 species (57 %) were the most frequently found in Canadian dairy plants. Periodic phage population surveys have been proposed to reevaluate phage control programs (13). In this study, the 936-like phages (72 %) were found to be the predominant lactococcal phage species in cheese plants using mixed strain starters composed of *cremoris* strains only. Very few c2-like phages were isolated, whereas no lytic P335 phages could be found in the whey samples tested. In general, c2-like phages have been reported to have a broader host spectrum than 936-like phages (2, 11, 14). However, in this study, 936-like phages had a much broader spectrum. Four phages could even propagate on 15 different strains from three mixed starters. These results also suggest that the rotation of mixed starters can allow the maintenance of specific phages within a dairy plant.

Almost all phage-sensitive strains, as well as five mixed starters, were phage-species specific. It seems that a phage-sensitive strain is more likely to be infected by homologous phages (same species) rather than by heterologous phages (different species). These findings support the hypothesis that new phages develop from existing phages within a species, by point mutation and/or recombination (5, 7, 15). Thus, a strain/starter rotation

strategy based on phage-species sensitivity rather than on phage isolates is likely to be more successful (13). For example, an optimum rotation of these mixed cultures could be to use a 936-sensitive starter (JR58, ML33 and PJ302) followed by a c2-sensitive starter (PA48 and NM33). Due to their sensitivity to diverse phages, starters RG70 and SL41 should be avoided in a starter rotation program.

Thirteen strains of *L. lactis* subsp. *cremoris* were insensitive to the 25 phages tested. Phage receptors may be absent or defective in these strains or they could contain natural anti-phage systems. Other microbiological and biochemical analyses (proteinase, peptidase, autolysis, lysogeny, antimicrobial activity, phage resistance mechanisms, production, concentration, storage) are underway to further characterize these strains. Since they were isolated from starters used in the manufacture of high-quality Cheddar cheeses, they may possess characteristics needed for development of new mesophilic defined starters.

3.8 Acknowledgments

We are very grateful to J. Anba for providing the strain IL1403 and to E. Vedamuthu for helpful discussions. F.B. was supported by graduate scholarships from the Abitibi-Consolidated and the Fonds FCAR. S.L. is also a recipient of a Fonds FCAR graduate scholarship. This work was funded by strategic grants from FCAR-Novalait-CQVB and NSERC.

3.9 References

1. **Allison, G. E., and T. R. Klaenhammer.** 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **8**:207.
2. **Heap, H. A., and A. W. Jarvis.** 1980. A comparison of prolate and small isometric headed lactic streptococcal bacteriophages. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* **15**:75.
3. **Jarvis, A. W.** 1978. Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:1031.
4. **Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, and M. Teuber.** 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* **32**:2.
5. **Jarvis, A.W., and J. Meyer.** 1986. Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:566.
6. **Johansen, E., and A. Kibenich.** 1992. Characterization of *Leuconostoc* isolates from commercial mixed strain mesophilic starter cultures. *J. Dairy Sci.* **75**:1186.
7. **Josephsen, J., N. Andersen, H. Behrnt, E. Brandsborg, G. Christiansen, M. B. Hansen, S. Hansen, E. Waagner Nielsen, and F. K. Vogensen.** 1994. An ecological study of lytic bacteriophages of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated in a cheese plant over a five year period. *Int. Dairy J.* **4**:123.
8. **Josephsen, J., and E. W. Nielsen.** 1988. Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a Cheddar starter used for five years without rotation. *Milchwissenschaft* **43**:219.
9. **Kunji, E. R. S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, and W. N. Konings.** 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:187.
10. **Lawrence, R. C., T. D. Thomas, and B. E. Terzaghi.** 1976. Reviews of the progress of dairy science : cheese starters. *J. Dairy Res.* **43**:141.
11. **Lodics, T. A., and L. R. Steenson.** 1990. Characterization of bacteriophages and bacteria indigenous to a mixed-strain cheese starter. *J. Dairy Sci.* **73**:2685.
12. **McKay, L. L., K. A. Baldwin, and E. A. Zottola.** 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **23**:1090.
13. **Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu, and P. A. Vandenberg.** 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* **79**:2104.
14. **Moineau, S., J. Fortier, H.-W. Ackermann, and S. Pandian.** 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Québec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38**:875.
15. **Moineau, S., S. Pandian, and T. R. Klaenhammer.** 1993. R/M systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:197.
16. **Moineau, S., S. Pandian, and T. R. Klaenhammer.** 1994. Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1832.

17. **O'Sullivan, D. J., and T. R. Klaenhammer.** 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2730.
18. **Salama, M. S., T. Musafija-Jeknic, W. E. Sandine, and S. J. Giovannoni.** 1995. An ecological study of lactic acid bacteria : isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **78**:1004.
19. **Salama, M., W. Sandine, and S. Giovannoni.** 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1313.
20. **Salama, M. S., W. E. Sandine, and S. J. Giovannoni.** 1993. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3941.
21. **Sambrook, J., F. Fritsh, and T. E. Maniatis.** 1987. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. **Sharpe, E.** 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *J. Soc. Dairy Technol.* **32**:9.
23. **Shieh, Y.-S. C., G. M. Dunny, R. A. Ledford, and P. M. Walsh.** 1987. Sensitivity of commercial Cheddar cheese starter isolates to bacteriophage associated with wheys. *J. Dairy Sci.* **70**:2022.
24. **Stahouders, J., and G. J. M. Leenders.** 1984. Spontaneously developed mixed-strain cheese starters. Their behavior towards phages and their use in the Dutch cheese industry. *Neth. Milk Dairy J.* **38**:157.
25. **Turner, G. E., and E. F. Nelson.** 1951. Enumeration of lactic *Streptococcus* bacteriophages by a two-layer plate method for plaques. *J. Dairy Sci.* **34**:754.
26. **Urbach, E., B. Daniels, M. S. Salama, W. E. Sandine, and S. J. Giovannoni.** 1997. The *ldh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:694.
27. **Vedamuthu, E. R., W. E. Sandine, and P. R. Elliker.** 1966. Flavor and texture in Cheddar cheese. I. Role of mixed strain lactic acid starter cultures. *J. Dairy Sci.* **49**:144.
28. **Wang, H., W. Yu, T. Coolbear, D. O'Sullivan, and L.L. McKay.** 1998. A deficiency in aspartate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 causes slow milk coagulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1673.

Chapitre 4

Effet des exopolysaccharides sur les interactions phage-hôte chez *Lactococcus lactis*

4.1 Résumé

Dans cette étude, huit phages différents (Q61 à Q68) infectant des souches de *Lactococcus lactis* produisant des exopolysaccharides (EPS) ont été isolés à partir de 47 échantillons de babeurre provenant de 13 usines nord-américaines. Ces résultats démontrent que les souches EPS⁺ sont sensibles aux phages virulents. Les huit phages sont membres de l'espèce 936 indiquant qu'il n'existe pas de différences significatives entre les phages infectants les souches EPS⁺ et EPS⁻. Le spectre lytique de ces phages effectué sur 19 souches de *L. lactis* (7 EPS⁺ et 12 EPS⁻) se limite cependant à deux souches productrices d'EPS : SMQ-419 et SMQ-420. Les cinq autres souches EPS⁺ (H414, MLT2, MLT3, SMQ-461, SMQ-575) sont insensibles. La composition en sucre des EPS a été déterminée. Les EPS produits par les souches MLT3, SMQ-419 et SMQ-575 contiennent du glucose, du galactose et du rhamnose. Ceux produits par H414 ne contiennent que du galactose. Les EPS synthétisés par MLT2, SMQ-420 et SMQ-461 sont faits de glucose et de galactose. Ces résultats indiquent que la composition des EPS n'a pas d'effet direct sur la sensibilité aux phages. Le plasmide codant pour l'opéron *eps* a été curé des deux souches sensibles aux phages. Les dérivés curés demeurent sensibles aux phages ce qui indique que les EPS ne sont pas nécessaire à l'infection. L'analyse de l'adsorption de ces phages montre que la production d'EPS ne confère pas un phénotype de résistance aux phages.

4.2 Avant-propos

4.2.1 Contribution des auteurs

J'ai réalisé l'isolement et la caractérisation des phages, la détermination du spectre lytique des souches et la rédaction de l'article. La purification des exopolysaccharides ainsi que leur analyse ont été faites en collaboration avec la Dr Marie-Rose van Calsteren. Finalement, le Dr Sylvain Moineau a supervisé le projet et participé activement à la rédaction de l'article.

4.2.2 Publication

Deveau, H., M.-R. van Calsteren et S. Moineau. 2002. The effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4364-4369.

4.3 Abstract

In this study, we report that *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharides (EPS) are sensitive to virulent phages. Eight distinct lytic phages, named Q61 to Q68, specifically infecting EPS⁺ strains, were isolated in 47 buttermilk samples obtained from 13 North American factories. The eight phages were classified within the 936 species using the multiplex PCR method indicating that these phages are not fundamentally distinct from those infecting EPS⁻ *L. lactis* strains. The host range of these phages was determined on 19 *Lactococcus* strains including seven EPS⁺ and 12 EPS⁻ cultures. Three phages (Q62, Q63 and Q64) attacked only the EPS⁺ strain SMQ-419 whereas the five other phages (Q61, Q65, Q66, Q67, and Q68) infected only the EPS⁺ strain SMQ-420. The five other EPS⁺ strains (H414, MLT2, MLT3, SMQ-461, SMQ-575) as well as the 12 EPS⁻ strains were insensitive to these phages. The monosaccharide composition of the polymer produced by the seven EPS⁺ strains was determined. The EPS produced by strains MLT3, SMQ-419, and SMQ-575 contained glucose, galactose, and rhamnose. The EPS fabricated by H414 contained only galactose. The EPS made by MLT2, SMQ-420, and SMQ-461 contained glucose and galactose. These findings indicate that the sugar composition of the EPS has no effect on phage sensitivity. The plasmid encoding the *eps* operon was cured from the two phage-sensitive strains. The cured derivatives were still phage sensitive, which indicates that EPS are not necessary for phage infection. Phage adsorption assays showed that the production of EPS does not confer a significant phage resistance phenotype.

4.4 Introduction

Lactococcus lactis is a Gram-positive lactic acid bacterium (LAB) used to acidify milk during the manufacture of fermented dairy products. Most *Lactococcus* strains contain numerous plasmids that encode key industrial phenotypes including the production of extracellular polysaccharides (EPS). When produced *in situ*, these loosely bound exopolysaccharides decrease the syneresis, increase the viscosity, and improve the texture of dairy products. From a microbiological standpoint, EPS may also protect the producing cells against detrimental environmental conditions. The lactococcal EPS are heteropolysaccharides composed of repeating units of sugars in which galactose, glucose, and rhamnose are the most common carbohydrates. Structure and composition of several lactococcal EPS as well as the sequence and organization of the *eps* genes have also been resolved during the last decade (10, 13, 24, 34, 35, 36).

Lytic phages are the most significant cause of fermentation failures in the dairy industry worldwide (21). Lactococcal phages are currently classified into 12 distinct species (16), although it was recently proposed to be reduced to 10 species (chapitre 2). However, only three species are predominant in most dairy plants: 936, c2, and P335 (3, 16, 17, 18, 22, 23). These three species are members of the *Siphoviridae* family and share some important features, including a double-stranded DNA genome and a long noncontractile tail (1, 16). The EPS-producing *Lactococcus* strains are increasingly used in the dairy industry and it is well documented that extensive use of a particular strain will lead to milk fermentation failures due to virulent bacteriophages. Yet, to our knowledge, there are only two studies in the literature that mention lactococcal phages infecting EPS-producing strains (28, 31). In fact, a total of only three phages were described in these two studies conducted in the 1970s. The first study described the isolation of phages sl60 and sl122, but unfortunately they were not characterized further (31). The second study described the isolation of phage KSY1, which belongs to the *Podoviridae* family, from the Finnish fermented milk viili (28). KSY1 is the reference phage of the lactococcal phage species that bears its name. This morphotype is very rare, as only two KSY1-like phages have been reported in lactococci (28, 29). These results suggested that the lactococcal phages infecting EPS-producing

strains may be different from those infecting non-EPS-producing strains which are traditionally used in the manufacture of most fermented dairy products.

In the mid-80s, Saxelin *et al.* (29) isolated and characterized, by electron microscopy and host range, 13 morphological types of phages from viili. However, it is not known whether these phages infected EPS-producing strains (29). Moineau *et al.* (22) showed that none of the 27 distinct lactococcal phages isolated from North American buttermilk factories could propagate on six EPS-producing strains. These results suggested that EPS production could protect cells against lytic phage infection (22). In fact, a number of authors have suggested that EPS may protect LAB against phages (7, 10, 12, 19, 22, 37). Looijesteijn *et al.* (19) demonstrated that cell-associated EPS granted lactococcal strains with a slight protection against phages. Forde and Fitzgerald (12) revealed that loosely bound EPS produced by some *Lactococcus* strains partially inhibited phage adsorption possibly by masking phage receptors. However, nowadays, some EPS-producing lactococcal strains appear to be infected by phages in commercial applications such as buttermilk. Thus, the involvement of EPS in the phage infection process of LAB is still unclear.

In Gram-negative bacteria, EPS and/or capsular polysaccharide may be directly involved in phage-host interactions. Specific phages infecting *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* strains that possess polysaccharide capsule have also been isolated (2, 8, 30). In *Rhizobium meliloti*, the EPS production has been shown to inhibit phage adsorption (9).

The aim of this study was to characterize bacteriophages specifically infecting EPS-producing *Lactococcus lactis* strains and to study the effect of EPS on phage-host interactions.

4.5 Materials and Methods

Bacterial strains and media

Lactococcus lactis strains used in this study are listed in Table 4.1 and were grown at 30°C in M17 broth (32) supplemented with 0.5% glucose (GM17) or lactose (LM17) (Quélab, Montréal, Québec, Canada). The species and subspecies of lactococcal strains were confirmed as outlined previously (3, 26) using the reference strains *L. lactis* subsp. *cremoris* SMQ-5, *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, and *Streptococcus thermophilus* SMQ-301. The seven EPS⁺ strains were genotypically identified as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Table 4.1: Bacterial strains and bacteriophages used in this study.

Strains or phages	Relevant characteristics ^a	Reference or source
<i>L. lactis</i>		
H414	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	13, 36
IL1403	Laboratory strain, plasmid free	4
MLT2	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	36
MLT3	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	36
SMQ-5	LM0230, plasmid free, Str ^r , Fus ^r , Lac ⁻ , Eps ⁻	20, this study
SMQ-419	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	This study
SMQ-420	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	This study
SMQ-461	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	This study
SMQ-575	Lac ⁺ , Eps ⁺ , industrial strain	This study
SMQ-737	SMQ-419 cured of EPS production, Lac ⁺ , Eps ⁻	This study
SMQ-738	SMQ-420 cured of EPS production, Lac ⁺ , Eps ⁻	This study
<i>S. thermophilus</i>		
SMQ-301	Industrial strain, Lac ⁺ , Eps ⁻ , host for phage DT1	33
Phages		
Q61	Small isometric head, 936 species, USA	This study
Q62	Small isometric head, 936 species, USA	This study
Q63	Small isometric head, 936 species, Canada	This study
Q64	Small isometric head, 936 species, USA	This study
Q65	Small isometric head, 936 species, USA	This study
Q66	Small isometric head, 936 species, USA	This study
Q67	Small isometric head, 936 species, USA - Canada	This study
Q68	Small isometric head, 936 species, USA	This study
P008	Small isometric head, 936 species, Germany	H-W Ackermann ^b
c2	Prolate head, c2 species, USA	20
P335	Small isometric head, P335 species, Germany	5

^aLac⁺, lactose-fermenting ability; Eps⁺, EPS-producing phenotype; Str^r, streptomycin resistance; Fus^r, fusidic acid resistance.

^bUniversité Laval.

Phage isolation and classification

Forty-seven phage-containing samples from thirteen North American buttermilk factories were provided by Quest International. The presence of phages in these samples was confirmed by spot test on seven EPS-producing *Lactococcus* strains as described elsewhere (22, 23). For each sample, five well-defined plaques were isolated and high phage titers were obtained by the method of Jarvis (15). This procedure was repeated twice. The newly isolated phages were designated with the prefix Q. All phages used in this study are listed in Table 1. These newly isolated lactococcal phages were classified within a phage species using the multiplex PCR method (17). Phage P008 was used as the reference for the 936 species, phage c2 for the c2 species, and phage P335 for the P335 species. Phage morphology was observed using a transmission electron microscope Phillips 420 at 80 kV as described previously (23). The host range of the isolated phages was determined on 19 industrial *L. lactis* strains, which included seven EPS-producing strains (EPS⁺) and twelve EPS-negative strains (EPS⁻), as described previously (23).

Phage DNA isolation

The Maxi Lambda DNA purification kit (Qiagen, Chatsworth, Calif.) was used for lactococcal phage DNA purification with the following modifications: L2 buffer was adjusted to provide a final concentration of 10% polyethylene glycol and 0.5 M sodium chloride. Proteinase K (100 μ l of 20 mg/mL solution) was added before the L4 buffer. The mixture was incubated 30 minutes at 55°C. DNA was resuspended in 100 μ L of 10 mM Tris-HCl pH 7.8 and stored at -20°C for later use.

DNA manipulations

Plasmid DNA was purified by the modified method of O'Sullivan and Klaenhammer (25). Total DNA of *L. lactis* strains was extracted by the method described by Hill *et al.* (14) with some modifications. The TE-saturated phenol was replaced by two steps with equal volume of phenol-chloroform. One-fifth volume of 7.5 M ammonium acetate was added

and the DNA was precipitated by the addition of two volumes of cold 95% ethanol. Restriction endonucleases (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) were used as recommended by the manufacturer. After restriction, phage DNA samples were heated 10 minutes at 70°C to avoid possible cohesive end ligation. DNA was electrophoresed on 0.8% agarose gels in 1X TAE buffer and visualized by UV photography after staining in ethidium bromide.

Analysis of EPS composition

For each strain, one liter of LM17 was inoculated with an overnight culture (1% v/v) and incubated at 25°C for 48 h. The EPS was extracted by the method of Cerning (6) and further purified on a Sephacryl S-400 HR column by eluting with 50 mM NH₄HCO₃. The polymer (1 mg) was hydrolyzed (2 M TFA, 1 h, 121°C) and analyzed by HPLC at 65°C on a 30-cm X 7.8-mm Aminex-87H column (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) eluted at 0.6 ml/min with 0.005 N sulphuric acid. The sugars were detected by refractive index monitoring at 35°C.

Plasmid curing and microbiological assays

The *L. lactis* EPS⁺ strains SMQ-419 and SMQ-420 were cured of the plasmid encoding the *eps* operon by five serial transfers in GM17 broth. After one week, the culture was streaked and isolated colonies were transferred in milk and incubated for 16 h at 25°C. Strains were regarded as ropy if strings of 5 mm or more were detected when the culture was touched with a sterile pipette. The plasmid and total DNA of non-mucoid isolates were extracted and the absence/presence of the *eps* gene cluster was verified by Southern. Efficiency of plating was performed on EPS⁻ and EPS⁺ isolates as described previously (27). Phage adsorption tests were carried out on the *L. lactis* strains SMQ-419, SMQ-420, SMQ-737, and SMQ-738, as described previously (11) but with these following modifications: GM17 broth was used and the incubation temperature was 30°C. Phage adsorption assays were also performed on bacterial cells washed twice with 0.1% peptone (9).

Detection of the *eps* gene cluster

Plasmid and chromosomal DNA were transferred onto positively charged nylon membranes by capillary blotting. Probes were constructed by labeling PCR fragments with the DIG High-Prime labeling kit (Roche). The probes were made of PCR products corresponding to *epsD* (priming glycosyltransferase) gene (primers 5'-TGATCCCCGTGTAACGAAGA-3' and 5'-AAGAGAGGCGCTCCCCATAT-3'). Prehybridization, hybridization, washes, and detection by chemiluminescence were performed as suggested by the manufacturer (Roche).

4.6 Results and Discussion

Phage isolation

The phage content of 47 buttermilk samples from 13 dairy manufacturing plants was examined by analyzing a total of 235 single plaques (5 plaques per sample) propagated on EPS-producing *L. lactis* strains. Based on DNA restriction profiles using *EcoRV* (Figure 4.1) and *EcoRI* (data not shown), only eight different phages were found among the 235 isolates. Furthermore, some of these phages were very similar. Only one phage was isolated from the samples provided by four factories. In the nine remaining factories, between two and four different lactococcal phages were found. A buttermilk manufacturing facility can therefore harbor many distinct phages. Phages with identical DNA restriction profiles were also detected in many factories. For example, phage Q67 was isolated in six factories and Q64 was found in eight out of 13 dairies indicating that a specific phage can be found in several geographic locations. Three phages (Q63, Q66, and Q68) were unique to one plant. The isolation of multiple lactococcal phages within one plant was not surprising, as a similar phenomenon was previously observed in cheese plants (3). Because these facilities used similar and application-oriented starter cultures and that the use of specific strains will partly dictate the presence of particular phages within a dairy plant, these eight phages appear fit to propagate in the buttermilk manufacturing conditions. These results also unequivocally showed that EPS-producing lactococcal strains can be infected by phages during buttermilk production.

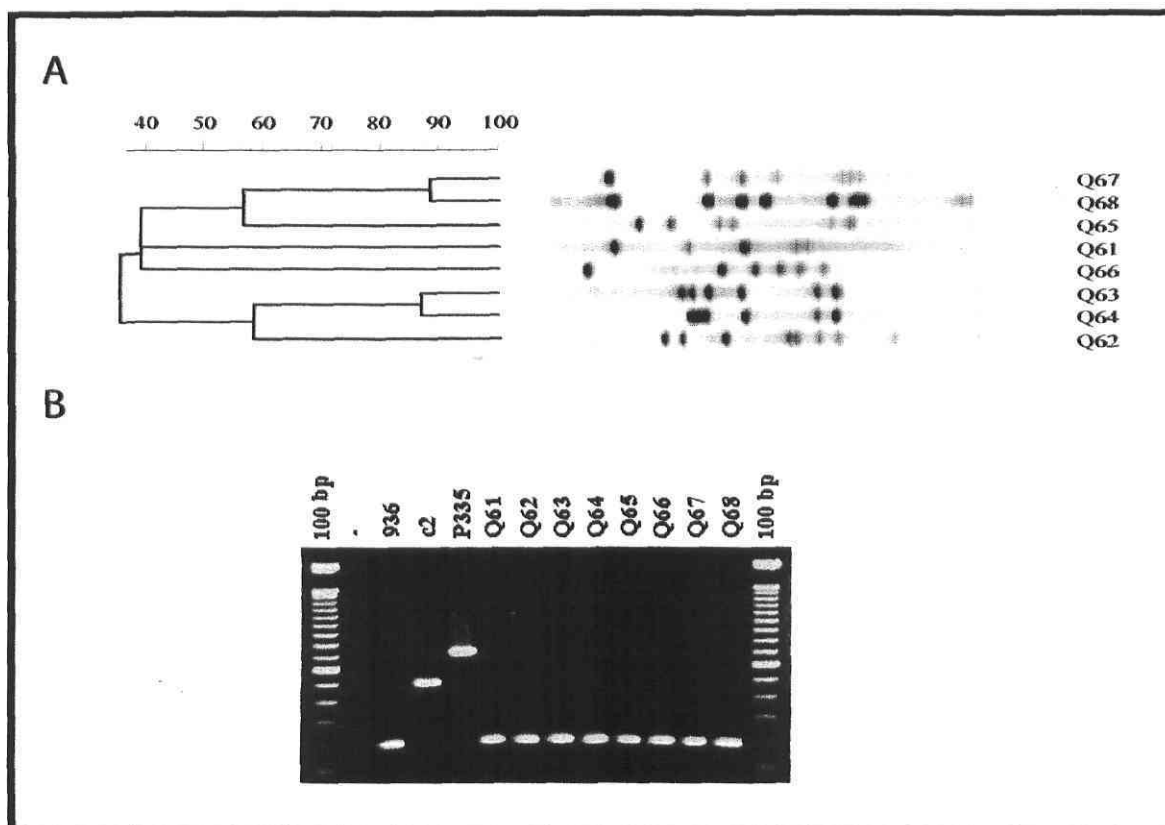


Figure 4.1: Characterization of lactococcal phages Q61 to Q68. A: Dendrogram of *EcoRV* restriction profiles of the 8 lactococcal phages; B: Classification of the eight phages by the multiplex PCR.

Phage classification

The multiplex PCR method was performed to catalogue the eight newly isolated phages within the three most common lactococcal phage species found in dairy plants, namely, 936, c2, and P335 (17, 21). The eight phages isolated in this study gave a PCR product slightly lower than 200 bp, indicating that they all belong to the 936 species (Fig. 4.1). The typical 936 morphology (isometric head and non-contractile tail) was confirmed by electron microscopy (data not shown). These results indicate that these phages are not fundamentally distinct from those infecting EPS⁻ *L. lactis* strains. It also suggests that the previous isolation of phages from the KSY1 species may indeed be a very rare event (28, 29).

Host range

The host range of the 8 phages was determined on 19 lactococcal strains, which included 7 EPS⁺ and 12 EPS⁻ strains. These 19 strains are currently used in various combinations within several commercial starter cultures (three strains per starter) for buttermilk production. All 12 EPS⁻ strains were insensitive to the eight phages. Only two of seven mucoid strains were sensitive to these phages (Table 4.2). *L. lactis* SMQ-419 was sensitive to phages Q62, Q63, and Q64, whereas *L. lactis* SMQ-420 was sensitive to phages Q61, Q65, Q66, Q67, and Q68 (Table 4.2). These results show that the eight phages are specific to two EPS⁺ *L. lactis* strains.

Table 4.2: Classification of EPS produced by seven strains and phage-sensitivity of these strains.

Group	Strains	Phages	Molar ratio of sugar ^a		
			Gal	Glc	Rha
I	MLT3	-	1	1.8	0.9
	SMQ-575	-	1	2.0	1.1
	SMQ-419	Q62 - Q63 - Q64	1	1.4	0.6
II	H414	-	1	0.1	0.0
III	MLT2	-	1	1.8	0.0
	SMQ-420	Q61 - Q65 - Q66 - Q67 - Q68	1	1.6	0.0
IV	SMQ-461	-	1	2.0	0.0

^aGal, galactose; Glc, glucose; Rha, Rhamnose.

Analysis of the EPS composition

The EPS produced by the 7 EPS-producing strains was purified, hydrolyzed, and analyzed by HPLC for their monosaccharide composition. The *L. lactis* EPS⁺ strains MLT3 (group I), H414 (group II), and MLT2 (group III) were used as reference strains in accordance with the classification of van Kranenburg *et al.* (36). The monosaccharide composition of the EPS produced by the three reference strains was in agreement with those reported in the literature (36). The EPS produced by strains MLT3, SMQ-419, and SMQ-575 (group I) contained glucose, galactose, and rhamnose (Table 4.2). The EPS fabricated by strain H414

(group II) contained only galactose (Table 4.2). The EPS made by strains MLT2 and SMQ-420 (group III) contained glucose and galactose (Table 4.2). The EPS assembled by strain SMQ-461 also contained only glucose and galactose, but preliminary NMR analysis showed that the structure of this EPS is different from the one produced by group III and it may belong to another group (data not shown). Given that phage-sensitive and phage-insensitive strains were found to produce EPS that belong to either group I (glucose, galactose, rhamnose) or group III (glucose, galactose), these results clearly indicate that the monosaccharide composition of the EPS has no influence on the phage sensitivity of a *L. lactis* strain.

Effect of EPS on phage sensitivity

The phage sensitive strains SMQ-419 and SMQ-420 were cured of the plasmid coding for the EPS production and the cured derivatives were named SMQ-737 and SMQ-738, respectively. The absence of these plasmids in the cured derivatives was verified by plasmid profile analysis and the absence of the *eps* operon was confirmed by Southern analysis in which an *epsD* (priming glycosyltransferase) probe failed to hybridize with total DNA (data not shown). Both cured-derivatives exhibited the same phage sensitivity as that of their parents indicating that the EPS is not necessary for phage infection. The efficiency of plating (EOP, phage titer on the EPS⁺ strain divided by the phage titer on the EPS⁻ strain) of these phages was also measured (Table 4.3). The EOPs of phages Q61, Q65, Q66, Q67, and Q68 were of 1.0 indicating the plasmid encoding the *eps* operon in *L. lactis* SMQ-420 does not confer a phage resistance phenotype. By association, these data also indicated that the EPS produced by SMQ-420 (containing glucose and galactose) does not prevent phage infection. The EOPs of phages Q62 and Q63 were slightly below 1.0 indicating that the plasmid encoding the *eps* operon in *L. lactis* SMQ-419 may arguably provide a weak resistance against these two phages. This limited antiviral phenotype is likely due to the production of the EPS (containing glucose, galactose, and rhamnose).

Table 4.3: Efficiency of plating of phages Q61 to Q68 on *L. lactis* SMQ-737 and SMQ-738.

Phages ^a	EOP SMQ-737	EOP SMQ-738
Q61	-	1.20 ± 0.09
Q62	0.71 ± 0.21	-
Q63	0.69 ± 0.06	-
Q64	0.96 ± 0.24	-
Q65	-	1.05 ± 0.15
Q66	-	1.03 ± 0.14
Q67	-	1.05 ± 0.25
Q68	-	1.10 ± 0.12

^aThe EOP of Q62, Q63, and Q64 is 1.0 on SMQ-419. The EOP of the phages Q61, Q65, Q66, Q67, and Q68 is 1.0 on *L. lactis* SMQ-420. n = 3.

Effect of EPS on phage adsorption

The percentage of phage adsorption on wild-type strains (EPS⁺) and cured derivatives (EPS⁻) was compared. No significant differences were observed between the phage adsorption on SMQ-420 (EPS⁺) and SMQ-738 (EPS⁻) (data not shown). The adsorption of phages Q62, Q63, and Q64 was somewhat better on SMQ-737 strain (EPS⁻) than on the parent EPS⁺ strain SMQ-419 (Table 4.4). The standard deviations were relatively high (13 to 15%) for the phage adsorption results with the EPS⁺ strain *L. lactis* SMQ-419 as compared to the similar data on the EPS⁻ strain SMQ-737 (0.6 to 4%). When the cells were washed to remove the loosely bound EPS, the percentage of phage adsorption was similar on both strains and the standard deviations were lower (between 3.6 to 5.0%) (Table 4.4). The variability in the phage adsorption assays may be explained by the fluctuating EPS production. These results indicate that the EPS is likely responsible for the difference between the adsorption on SMQ-419 and SMQ-737. Moreover, these data confirm that the weak resistance against phages Q62 and Q63 is conferred by the EPS. These results are in agreement with those of Looijesteijn *et al.* (19) which showed that the production of group-I EPS (such as those produced by SMQ-419) confer a marginal phage resistance phenotype (EOP above 0.5).

Table 4.4: Adsorption percentage of phages Q62, Q63, and Q64 on *L. lactis* SMQ-419 and SMQ-737 (n=3).

Phage	Unwashed cells		Washed cells	
	SMQ-419	SMQ-737	SMQ-419	SMQ-737
Q62	70.3 ± 14.7	89.5 ± 0.8	95.2 ± 3.6	95.0 ± 5.5
Q63	86.0 ± 13.2	95.5 ± 4.0	95.2 ± 3.9	97.7 ± 1.3
Q64	83.1 ± 15.2	95.3 ± 0.6	95.8 ± 5.0	96.6 ± 1.8

The production of EPS increases the viscosity of the medium, and perhaps, this molecular crowding slightly affects the spread of the phage infection. It is also possible that the EPS could protect the strain by coating the cell, but this protection would be limited because the lactococcal EPS is loosely bound. Nonetheless, it is clear from the above evidences that processors should not rely on the production of EPS to protect starter cultures against phages. It remains to be seen if the structure of some lactococcal EPS could be involved in phage sensitivity or insensitivity. It will be also interesting to determine if other phage resistance mechanisms are present in the phage-insensitive EPS⁺ strains. It is also possible that the phage insensitivity reported here may simply be related to the absence of specific phage receptors on the cell surface of these strains. Further research is under way to address these issues. To our knowledge, this is the first thorough analysis of phages infecting EPS-producing Gram-positive bacteria.

4.7 Acknowledgments

We are grateful to Quest International for providing buttermilk samples and to R. van Kranenburg for strains MLT2 and MLT3. We thank J. Bouchard, S. Labrie, D. Roy, and D. Tremblay for helpful discussions. We are also thankful to C.B. Do, C. Danis, and A. Bégin for their help during the EPS purification and for sugar analysis, as well as to D. Montpetit for the electron microscopy. The authors wish to thank the NSERC (Research Network on LAB), Agriculture and Agri-Food Canada, Novalait inc., Dairy Farmers of Canada, and Institut Rosell-Lallemand inc. for financial support. H.D. is a recipient of a Fonds FCAR graduate scholarship.

4.8 References

1. **Ackermann, H.-W., E. D. Cantor, A. W. Jarvis, J. Lembke, and J. A. Mayo.** 1984. New species definitions in phages of Gram-positive cocci. *Intervirology* **22**:181-190.
2. **Albert, M. J., N. A. Bhuiyan, A. Rahman, A. N. Ghosh, K. Hultenby, A. Weintraub, S. Nahar, A. K. Kibriya, M. Ansaruzzaman, and T. Shimada.** 1996. Phage specific for *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1842-1845.
3. **Bissonnette, F., S. Labrie, H. Deveau, M. Lamoureux, and S. Moineau.** 2000. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **83**:620-627.
4. **Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**:731-753.
5. **Braun, V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis, and M. Teuber.** 1989. Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2551-2560.
6. **Cerning, J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**:113-130.
7. **Cerning, J.** 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* **75**:463-472.
8. **Clarke, B. R., F. Esumeh, and I. S. Roberts.** 2000. Cloning, expression, and purification of the K5 capsular polysaccharide lyase (*KflA*) from coliphage K5A: evidence for two distinct K5 lyase enzymes. *J. Bacteriol.* **182**:3761-3766.
9. **Defives, C., M. Werquin, P. Mary, and J. P. Hormez.** 1996. Roles of exopolysaccharides and lipopolysaccharides in the adsorption of the *Siphovirus* phage NM8 to *Rhizobium meliloti* M11S cells. *Curr. Microbiol.* **33**:371-376.
10. **De Vuyst, L., and B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:153-177.
11. **Duplessis, M., and S. Moineau.** 2001. Identification of a genetic determinant responsible for the host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **41**:325-336.
12. **Forde, A., and G. F. Fitzgerald.** 1999. Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *Int. Dairy J.* **9**:465-472.
13. **Gruter, M., B. R. Leeftang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegenthart.** 1992. Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.* **231**:273-291.
14. **Hill, C., J. Massey, and T. R. Klaenhammer.** 1991. Rapid method to characterize lactococcal bacteriophage genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:283-288.
15. **Jarvis, A. W.** 1978. Serological studies of a host range mutant of a lactic streptococcal bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:785-789.
16. **Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, and M. Teuber.** 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* **32**:2-9.

17. **Labrie, S., and S. Moineau.** 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:987-994.
18. **Labrie, S., and S. Moineau.** 2002. Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* **296**:308-320.
19. **Looijesteijn, P. J., L. Trapet, E. de Vries, T. Abee, and J. Hugenholtz.** 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Sci.* **64**:71-80.
20. **McKay, L. L., K. A. Baldwin, and E. A. Zottola.** 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **23**:1090-1096.
21. **Moineau, S.** 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:377-382.
22. **Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu, and P. A. Vanderbergh.** 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* **79**:2104-2111.
23. **Moineau, S., J. Fortier, H.-W. Ackermann, and S. Pandian.** 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38**:875-882.
24. **Nakajima, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa, and S. Adachi.** 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy Sci.* **73**:1472-1477.
25. **O'Sullivan, D. J., and T. R. Klaenhammer.** 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2730-2733.
26. **Salama, M., W. Sandine, and S. Giovannoni.** 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1313-1318.
27. **Sanders, M. E., and T. R. Klaenhammer.** 1980. Restriction and modification in group N streptococci: effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:500-506.
28. **Saxelin, M.-L., E.-L. Nurmiäho, M. P. Korhola, and V. Sundman.** 1979. Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*. *Can. J. Microbiol.* **25**:1182-1187.
29. **Saxelin, M.-L., E.-L. Nurmiäho-Lassila, V. T. Meriläinen, and R. I. Forsén.** 1986. Ultrastructure and host specificity of bacteriophages of *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* and *Leuconostoc cremoris* from Finnish fermented milk "viili". *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:771-777.
30. **Scholl, D., S. Rogers, S. Adhya, and C. R. Merrill.** 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.* **75**:2509-2515.
31. **Sozzi, T., J. M. Poulin, R. Maret, and R. Pousaz.** 1978. Isolation and some characteristics of phages of ropy strains of *Streptococcus lactis*. *Milchwissenschaft* **33**:349-352.
32. **Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine.** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**:807-813.

33. **Tremblay, D. M., and S. Moineau.** 1999. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology* **255**:63-76.
34. **van Casteren, W. H. M., P. de Waard, C. Dijkema, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen.** 2000. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.* **327**:411-422.
35. **van Casteren, W. H. M., C. Dijkema, H. A. Schols, G. Beldman, and A. G. J. Voragen.** 2000. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39. *Carbohydr. Res.* **324**:170-181.
36. **van Kranenburg, R., H. R. Vos, I. I. van Swam, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.* **181**:6347-6353.
37. **Vedamuthu, E. R., and J. M. Neville.** 1986. Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:677-682.

Chapitre 5

Utilisation d'une méthode RFLP pour la caractérisation rapide de souches de *Lactococcus lactis* productrices d'exopolysaccharides

5.1 Résumé

Le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) est utilisé pour différencier les microorganismes par l'analyse du profil de restriction de leur ADN. Dans cette étude, une modification à la procédure de RFLP actuellement utilisée pour la caractérisation rapide des opérons *eps* de lactocoques est proposée. La disponibilité d'une telle méthode servira à identifier rapidement des souches qui produisent de nouveaux EPS.

5.2 Avant-propos

5.2.1 Contribution des auteurs

J'ai réalisé l'ensemble des manipulations et la rédaction de l'article. Dr Sylvain Moineau a supervisé le projet et participé activement à la rédaction de l'article.

5.2.2 Publication

Deveau, H., et S. Moineau. 2003. Use of RFLP to characterize *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* **86**:1472-1475.

5.3 Abstract

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) is used to differentiate microorganisms by analysis of their DNA restriction patterns. A modified RFLP procedure is proposed for the rapid characterization of *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharides (EPS). The availability of such an effective cataloging system is likely to benefit research aimed at identifying lactococcal strains that produce novel EPS.

5.4 Introduction, Methods, Results, and Discussion

Lactococcus lactis is a Gram-positive lactic acid bacterium used to acidify milk during the manufacture of several fermented milk products. Most *Lactococcus* strains contain plasmids that encode industrial phenotypes such as lactose utilization, proteinase activity, phage resistance and, in some cases, production of extracellular polysaccharides (EPS). The production of EPS by these cultures increases the viscosity, decreases the syneresis, and improves the texture of dairy products. Because these polysaccharide-producing strains impart desirable properties, they are increasingly used by the food industry (De Vuyst and Degeest, 1999).

Several lactococcal EPS have already been analyzed for their chemical composition as well as the location, sequence, and organization of the genes involved in their biosynthesis (De Vuyst and Degeest, 1999; Gruter *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1990; van Casteren *et al.*, 2000a and 2000b). For various purposes (i.e., novel food applications, enhanced EPS production, need of phage-unrelated EPS⁺ strains), there is an ongoing search for lactococcal strains producing novel EPS. However, given that the EPS must be extracted, purified, and chemically analyzed, the classical method for characterizing EPS is rather fastidious (Cerning 1995; Gruter *et al.*, 1992; van Kranenburg *et al.*, 1999). Moreover, *Lactococcus* strains produce a low quantity of EPS. Thus, the isolation of new wild-type *Lactococcus* strains producing unique EPS is a daunting task.

RFLP can be used to distinguish strains by the analysis of their DNA restriction patterns. Recently, van Kranenburg *et al.* (1999) proposed to differentiate lactococcal EPS⁺ strains

based on RFLP of the *eps* operon. The grouping was based on the size of two *Sst*I fragments that hybridized with an *epsB* (gene involved in chain length determination) and an *epsD* (priming glucosyltransferase gene) probes which correlated with the monosaccharide composition of the repetitive unit of the EPS. These analyses led to the grouping of most of the lactococcal strains into three major clusters (van Kranenburg *et al.*, 1999 and Table 5.1). The polymer produced by strains of group I is made of glucose, galactose, and rhamnose. The EPS synthesized by group II strains contains only galactose. Finally, strains of group III make exopolysaccharides composed of glucose and galactose (van Kranenburg *et al.*, 1999).

Table 5.1: Sugar composition of the EPS produced by seven *L. lactis* strains and hybridization patterns of digested total DNA.

Group	Strain	Molar ratio ^a			Fragment size (kb)			
		Gal	Glu	Rha	SstI ^b		AcyI	HindII
					Probe <i>epsB</i>	Probe <i>epsD</i>	Probe <i>epsD</i>	
I	SMQ-419	1	1,4	0,6	12	0,4	9,5	3,4
	SMQ-575	1	2,0	1,1	7,5	0,4	9,5	3,4
	MLT3	1	1,8	0,9	7,5	0,4	9,5	3,4
II	H414	1	0,1	0,0	7,5	15	3	2,7
III	SMQ-420	1	1,6	0,0	15	12	7	5
	MLT2	1	1,8	0,0	6,5	12	7	5
IV	SMQ-461	1	2,0	0,0	9	13	2	4,5

^aDeveau *et al.* (2002).

^bVan Kranenburg *et al.* (1999).

Recently, we analyzed the monosaccharide composition of the EPS produced by seven *L. lactis* strains, which included three reference strains from the study by van Kranenburg *et al.* (1999), namely MLT3 (group I), H414 (group II), and MLT2 (group III) as well as four strains from our laboratory (SMQ-419, SMQ-420, SMQ-461, SMQ-575). Based on the sugar composition, SMQ-420 and SMQ-575 were classified into group I, SMQ-419 into group III and SMQ-461 into a fourth and novel group (Deveau *et al.*, 2002). To confirm the

grouping of the four EPS⁺ strains from our collection, we used the above RFLP method. *Lactococcus lactis* strains were grown at 30°C in M17 broth supplemented with 0.5% lactose (LM17) (Quélab, Montréal, Québec, Canada). Total DNA of *L. lactis* strains was extracted as described previously (Deveau *et al.*, 2002). Restriction endonucleases (*AcyI*, *HindIII*, *SacI*) were used as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). After restriction, total DNA was electrophoresed on 0.8% agarose gels in 1X TAE buffer. Probes were constructed by labeling PCR fragments with the Dig High-Prime labeling kit. The probes were made of PCR products corresponding to the *epsB* gene (by using the primers 5'-CGTACGATTCGTACGACCAT-3' and 5'-TGACCAGTGACACTTGAAGC-3') and *epsD* (5'-TGATCCCCGTGTAACGAAGA-3' and 5'-AAGAGAGGCGCTCCCCATAT-3'). Prehybridization, hybridization, washes, and detection by chemiluminescence were performed as suggested by the manufacturer (Roche Diagnostics).

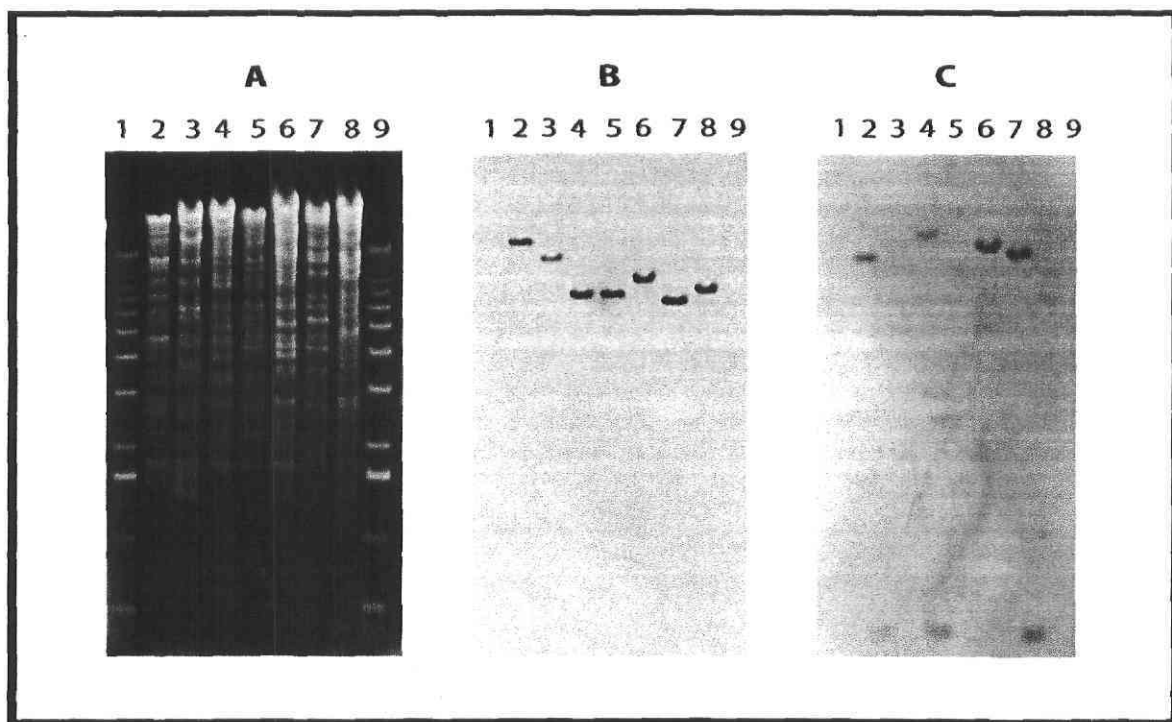


Figure 5.1: Differentiation of *Lactococcus lactis* *eps* gene clusters by the RFLP method of van Kranenburg *et al.* (1999). Lanes 1 and 9, 1-kb ladder (Invitrogen, Carlsbad, Calif.); lane 2, SMQ-420; lane 3, SMQ-419; lane 4, H414; lane 5, SMQ-575; lane 6, SMQ-461; lane 7, MLT2; lane 8, MLT3. Panel A: Total DNA digested *SacI*; Panel B: Hybridization with *epsB* probe; Panel C: with *epsD* probe.

Although the three reference strains (MLT3, H414, MLT2) showed the expected hybridization patterns (van Kranenburg *et al.*, 1999), three of the four lactococcal strains from our laboratory could not be classified by RFLP (Figure 5.1, Table 5.1). Two disadvantages were found with the proposed RFLP method. First, the *SacI* (isoschizomer of *SstI*) fragments that hybridized with the *epsB* and *epsD* probes were often too large (> 12 kb) for accurate size estimation in Southern analysis (Figure 5.1). But most importantly, a critical *SacI* site is located upstream (outside) the *eps* operon (the other *SacI* site is within the operon) indicating that the DNA sequence flanking the operon will dictate the size of the hybridizing fragment rather than the *eps* operon (Figure 5.2). Thus, the hybridization signals are reflecting the variability of the nucleotide sequence upstream of the operon rather than the variability of the operon itself. These findings led to the modification of the classification procedure.

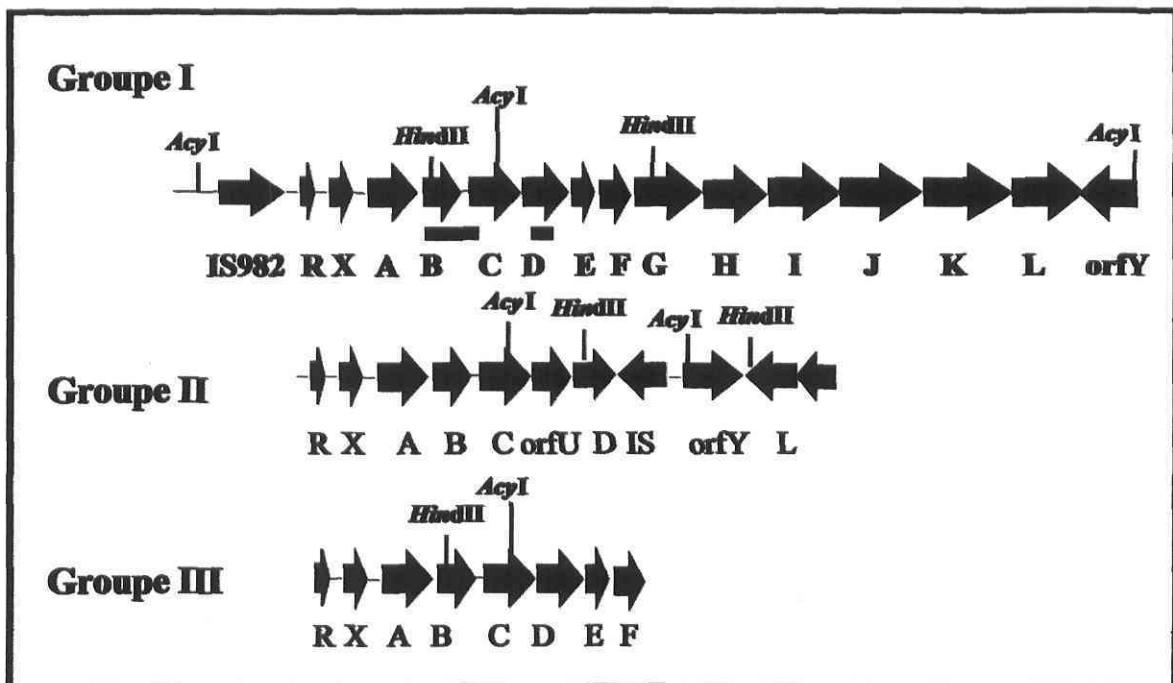


Figure 5.2: Localization of *SacI*, *AcyI*, and *HindII* restriction sites into the *eps* gene cluster (Accession number: group 1, U93364; group II, AF100297; group III, AF100298).

The total DNA of the seven strains was digested with *HindII* and *AcyI* endonucleases. These restriction enzymes were selected based on nucleotide sequences of lactococcal *eps* operon available in databases that indicated the presence of *HindII* and *AcyI* sites within the *eps* operon of the three groups (Figure 5.2). The restriction fragments were then separated

by electrophoresis and transferred onto a membrane. Only, the *epsD* probe was used for the hybridization because it is the most conserved gene within the *eps* operon of the three groups. The hybridization results are presented in Figure 2 and summarized in Table 1. The reference strain MLT3 (group I) had a 9.5-kb *AcyI* fragment as well as a 3.5-kb *HindII* fragment that hybridized with the *epsD* probe (Figure 5.3, panels A and B, lane 8). Identical results were obtained with the strains SMQ-419 and SMQ-575 (Figure 5.3, panels A and B, lanes 3 and 5, respectively). The strain H414 (group II) had unique hybridization patterns with a 3.0-kb *AcyI* and a 2.7-kb *HindII* fragments that hybridized with the *epsD* probe (Figure 5.3, panels A and B, lane 4). The reference strain MLT2 (group III) and SMQ-420 had identical hybridization signals with the *epsD* probe, which included a 7.0-kb *AcyI* fragment and a 5.0-kb *HindII* fragment (Figure 5.3, panels A and B, lanes 2 and 7, respectively). Finally, the strain SMQ-461 also had unique hybridization patterns with a 2.0-kb *AcyI* and a 4.7-kb *HindII* fragments that hybridized with the *epsD* probe (Figure 5.3, panels A and B, lane 6) confirming that it belongs to a fourth and novel group (Deveau *et al.*, 2002). The classification of the seven EPS⁺ *L. lactis* strains by this new RFLP procedure is in agreement with the previous analysis of the monosaccharide composition of the EPS (Deveau *et al.*, 2002). Moreover, the *eps* operon of SMQ-575 was recently sequenced and it is 100% identical at the nucleotide level to the *eps* operon of the strain NIZO B40 (GenBank accession number AF036485), which is also a member of group I, confirming the classification of SMQ-575 into this group (H. Deveau and S. Moineau, unpublished).

Thus, we propose a modified RFLP procedure using *HindII* and *AcyI* rather than *SacI* for rapid differentiation of EPS-producing lactococcal strains. It is worth mentioning that additional strains should be tested to further validate the method. Notwithstanding, this cataloging system should speed up the isolation of lactococcal strains that produce novel EPS as well as the isolation of phage-unrelated strains producing identical EPS. As novel lactococcal EPS are characterized, this RFLP method is also likely to be refined accordingly.

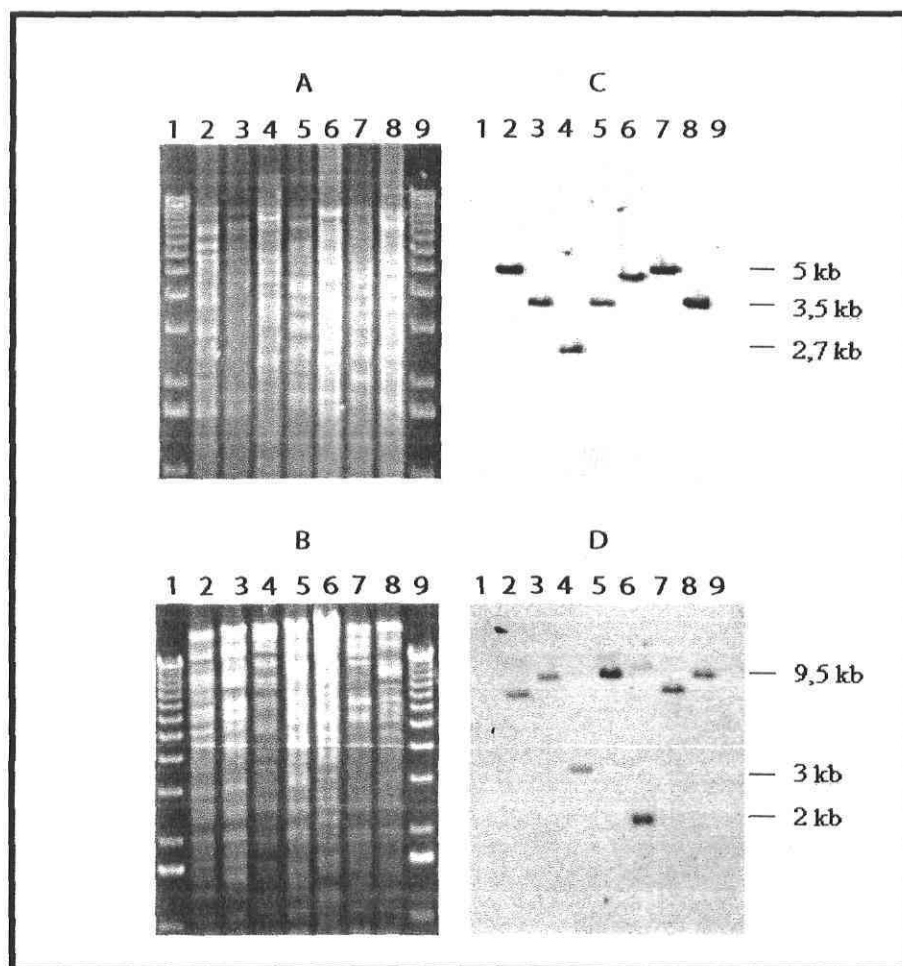


Figure 5.3: Differentiation of *Lactococcus lactis* *eps* gene clusters by the modified RFLP procedure. Lanes 1 and 9, 1-kb ladder (Invitrogen); lane 2, SMQ-420; lane 3, SMQ-419; lane 4, H414; lane 5, SMQ-575; lane 6, SMQ-461; lane 7, MLT2; lane 8, MLT3. Panel A: Total DNA digested *Hind*III; Panel B: Total DNA digested *Acl*I; Panels C and D: Hybridizations with *epsD* probe.

5.5 Acknowledgments

We are grateful to R. van Kranenburg for providing the strains MLT2 and MLT3. We thank D. Roy and M.-R. van Calsteren for their helpful discussions. The authors wish to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Research Partnerships Program -Research Network on Lactic Acid Bacteria), Agriculture and Agri-Food Canada, Novalait inc., Dairy Farmers of Canada, and Institut Rosell-Lallemand inc. for financial support. H. D. is a recipient of a FCAR graduate scholarship.

5.6 References

1. **Cerning, J.** 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* **75**:463-472.
2. **Deveau, H., M.-R. van Calsteren, and S. Moineau.** 2002. The effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4364-4369.
3. **De Vuyst, L., and B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:153-177.
4. **Gruter, M., B. R. Leeftang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegthart.** 1992. Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.* **231**:273-291.
5. **Nakajima, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa, and S. Adachi.** 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy. Sci.* **73**:1472-1477.
6. **van Casteren, W. H. M., P. de Waard, C. Dijkema, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen.** 2000a. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.* **327**:411-422.
7. **van Casteren, W. H. M., C. Dijkema, H. A. Schols, G. Beldman, and A. G. J. Voragen.** 2000b. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39. *Carbohydr. Res.* **324**:170-181.
8. **van Kranenburg, R., H. R. Vos, I. I. van Swam, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.* **181**:6347-6353.

Chapitre 6

Analyse comparative de cinq génomes de phages de l'espèce 936 infectant *Lactococcus lactis*

6.1 Résumé

La séquence nucléotidique du génome des phages 712, P008 et jj50 (espèce 936) a été déterminée, permettant une analyse génomique comparative. Cette analyse révèle une organisation génétique hautement conservée entre ces trois génomes et les deux autres génomes de cette espèce dont la séquence complète est disponible, soit ceux des phages bIL170 et sk1. Les divergences génétiques sont principalement observées dans la région du génome codant pour les gènes précoces. Cette région semble avoir subi un certain nombre d'évènements de délétions, d'insertions ou d'échanges génétiques. Ces analyses ainsi que la sensibilité de ces phages au mécanisme d'exclusion Sie₂₀₀₉ et aux systèmes d'avortement de l'infection AbiA, F, K, Q et T ont permis de créer des sous-groupes génotypiques et phénotypiques à l'intérieur de l'espèce 936 : le type sk1, le type bIL170 et, finalement, le type 712 qui présente un phénotype/génotype intermédiaire entre les deux autres groupes. Ces résultats montrent un modèle évolutif reflétant les variations dans la susceptibilité et/ou l'adaptation aux mécanismes de défense de l'hôte.

6.2 Avant-propos

6.2.1 Contribution des auteurs

Jennifer Mahony et ses collègues de l'Irlande (Stephen McGrath, Marco Ventura et Carlos Canchaya) ont déterminé la séquence des génomes des phages 712 et jj50 en plus de vérifier la sensibilité des cinq phages à l'étude contre les mécanismes Sie₂₀₀₉, AbiA et AbiF. J'ai établi la séquence du génome du phage P008 et vérifié la sensibilité des phages à l'étude contre les mécanismes AbiK, AbiQ et AbiT. J'ai également participé à la rédaction de l'article. L'analyse comparative des génomes des cinq phages a été faite en parallèle par Jennifer et moi. Nos résultats ont ensuite été comparés. Dr Gerald F. Fitzgerald a supervisé le projet. Finalement, les Dr Sylvain Moineau et Dr Douwe van Sinderen ont supervisé le projet et participé activement à la rédaction de l'article.

6.2.2 Publication

Une version abrégée de l'article présenté dans ce chapitre a été acceptée pour publication dans FEMS Microbiology Letters.

Mahony, J., H. Deveau, S. Mc Grath, M. Ventura, C. Canchaya, S. Moineau, G. F. Fitzgerald et D. van Sinderen. Sequence and comparative genomic analysis of lactococcal bacteriophages jj50, 712, and P008: evolutionary insights into the 936 phage species. *Sous presse*. FEMS Microbiol. Lett.

6.3 Abstract

The determination of the complete genome sequences of the 936-type lactococcal bacteriophages 712, jj50, and P008 allowed a comparative genomic analysis, which revealed a strict conservation of the overall genetic organisation between 712, jj50, P008, and two previously sequenced 936-like phages, sk1 and bIL170. Genetic divergence was mainly observed in the early expressed region of the phage genomes, where a number of deletions, exchanges and insertions appear to have occurred. Genotypic analysis and responses of these five phages to the superinfection exclusion system Sie₂₀₀₉, and the abortive infection systems AbiA, F, K, Q, and T, led to phenotype and genotype subgroupings: the sk1-type; the bIL170-type; and the intermediate 712-type phages. Altogether, these analyses support an evolutionary model for this lactococcal phage group reflecting variations in their susceptibility and/or adaptability to host-defense mechanisms.

6.4 Introduction

Bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* disrupt dairy fermentation processes, which may result in considerable economic losses. These bacteriophages are classified into several genetically-distinct groups, the three most prevalent of which are the c2, 936, and P335 species (Jarvis *et al.*, 1991). This practical relevance has resulted in these three species receiving more focused research attention, particularly at the levels of sequence and functional analyses. Now, these three species can be rapidly detected and distinguished from each other by multiplex PCR (Labrie and Moineau, 2000). More recent phage population studies have indicated that the 936-like phages account for most of the isolates obtained from industrial settings (Bissonnette *et al.*, 2000; Deveau *et al.*, 2002; Josephsen and Vogensen, 1994; Moineau *et al.*, 1996).

The ever increasing number of complete phage genome sequences has significantly advanced our understanding of the evolution and diversification of these genetically flexible viruses (Brondsted *et al.*, 2001; Chandry *et al.*, 1997; Crutz-Le Coq *et al.*, 2002; Dobbins *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003) (for a review, see: Hendrix *et al.*, 1999). As a result, revealing insights into the consequences of the evolutionary battle between hosts and their infecting phages have been achieved. Bacteriophages infecting lactic acid bacteria are ubiquitous in milk and are one of the most extensively studied phage groups with respect to genome sequences (Brussow and Hendrix, 2002; Desiere *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 2004). They also represent a model system to study phage evolution in a specific ecological niche as a constant supply of new hosts is provided during cheese manufacture. Among the 936-like phages, the complete genome sequences of sk1 and bIL170 have previously been determined (Chandry *et al.*, 1997; Crutz-Le Coq *et al.*, 2002). Additionally, further partial sequence information relating to the phages bIL41 (Parreira *et al.*, 1996), F4-1 (Chung *et al.*, 1991), and bIL66M1 (Domingues *et al.*, 2004a), have provided a useful basis for the comparison of different members of the 936 species. Finally, the knowledge on phages has been improved by functional analyses of proteins or genomic regions relating to receptor binding (Dupont *et al.*, 2005; Dupont *et al.*, 2004), the major capsid protein (De Haard *et al.*, 2005), an endonuclease homologous to

RuvC (Bidnenko *et al.*, 1998), a single-strand annealing protein (Bouchard and Moineau, 2004), and the DNA terminal regions (Parreira *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 1997). These studies have demonstrated that the high degree of genetic parity is juxtaposed with subtle variations, which may result in variable phenotypes.

Collectively, *Lactococcus* strains harbor an impressive number of diverse phage defense mechanisms (Coffey and Ross, 2002). The use of these so-called phage-resistant strains is providing a powerful selective pressure that limits the proliferation of many phages while favoring the amplification of specific phages. McGrath *et al.* (2002) demonstrated that the superinfection exclusion system Sie₂₀₀₉ confers a phage-resistant phenotype on the lactococcal host against some 936-type bacteriophages, but not against representative members of the c2 and P335 species. Several abortive infection (Abi) systems have also been characterized (Chopin *et al.*, 2005) preventing phage proliferation by inducing premature cell death upon phage infection. The plasmid-encoded abortive infection systems AbiA (Hill *et al.*, 1990; Coffey, 1991), AbiF (Garvey *et al.*, 1995), AbiK (Emond *et al.*, 1997), AbiQ (Emond *et al.*, 1998) and AbiT (Bouchard *et al.*, 2002) have been shown to be highly effective against members of the 936-type phages. Except for AbiA and AbiK that share a reverse transcriptase motif (Fortier *et al.* 2005), the other Abi systems do not share significant similarities at the protein level. It may well be that they act at different stages of the phage lytic cycle. By analysing the effect of Abi systems targeting different stages of the lytic cycle, it may therefore be possible to deduce subtle differences between members belonging to the same species as well as help to understand the molecular mechanisms of these Abi systems.

In order to advance our knowledge on the genetics and the evolution of the predominant lactococcal phages of the 936 species, sequencing of the genomes of phages 712, jj50 and P008 was undertaken. Comparative genomic analysis of these phage sequences as well as those of sk1 and bIL170 was performed to establish their overall relatedness and to examine the genomes for possible differences that may explain the varying phenotypes observed between the phages in response to various phage resistance mechanisms.

6.5 Results

Sequencing and annotation of the genomes of phages 712, jj50, and P008

The complete nucleotide sequences of the bacteriophages jj50, 712, and P008 were determined by a dual strategy of shotgun cloning and primer walking. As expected, the three phages possess a G+C content similar to that of the previously sequenced 936-type phages, sk1, and bIL170 (Table 6.1). ORF prediction, functional assignment using the TBLASTX programmes available on the National Centre for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and additional manual curation were used to analyse the sequence data (Tables 6.1-6.4). The genomes of phages 712, jj50, and P008 contain 55, 49, and 58 ORFs, respectively, with the same overall genetic organisation as previously determined for both sk1 and bIL170 (Chandry *et al.*, 1997; Crutz-Le Coq *et al.*, 2002).

Table 6.1: Characteristics of the 936-like phages and their efficiency of plaquing on strains harboring Sic₂₀₀₉ and abortive infection systems.

Phage	Host	Genome			EOP					
		Length	% G+C content	# ORFs	Sic ₂₀₀₉	AbiA	AbiF	AbiK	AbiQ	AbiT
sk1	NZ9000/LM0230	28,451	34.51	54	< 10 ⁻⁹	10 ⁻³	1	10 ⁻⁵	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁸
jj50	NZ9000/LM0230	27,453	34.94	49	< 10 ⁻⁹	10 ⁻²	1	10 ⁻⁵	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁸
712	NZ9000/LM0230	30,510	33.89	55	< 10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	0.26	10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁸
P008	IL1403/F7/2	28,538	34.68	58	1	1	1	10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁸
bIL170	IL1403/F7/2	31,754	34.35	64	1	1	1	10 ⁻⁵	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁸

Table 6.2: Coordinates of phage 712 ORFs and representative ORFs in other 936-type phages.

ORF	Start	Stop	% aa identity			Putative function	
			sk1 (or other homologue)	bIL170	P008		ji50
<u>Late Expressed Region</u>							
1	261	785	ORF 1, 97	L1, 98	ORF1, 98	ORF1, 98	Terminase small subunit
1A	782	931	ORF 26 TP901-1, 43	-	-	-	Unknown
2	943	2565	ORF 2, 97	L2, 97	ORF2, 98	ORF2, 98	Terminase large subunit
3	2555	2839	ORF 3, 100	L3, 96	ORF3, 98	ORF3, 100	HNH Endonuclease
4	2852	3988	ORF 4, 99	L4, 94	ORF 4, 96	ORF 4, 99	Portal protein
5	3969	4505	ORF 5, 97	L5, 96	ORF 5, 99	ORF 5, 97	Protease
6	4477	5679	ORF 6, 98	L6/7, 97	ORF 6, 99	ORF 6, 99	Structural protein
7	5700	5963	ORF 7, 98	L8, 98	ORF 8, 99	ORF 7, 97	Structural protein
8	5963	6277	ORF 8, 94	L9, 94	ORF 9, 96	ORF 8, 95	Structural protein
9	6267	6605	ORF 9, 96	L10, 96	ORF 10, 94	ORF 9, 99	Structural protein
10	6575	6961	ORF 10, 95	L11, 93	ORF 11, 97	ORF 10, 96	Structural protein
11	6974	7879	ORF 11, 87	L13, 88	ORF 13, 87	ORF 11, 88	Major structural protein
12	7881	8492	-	L12, 66	ORF 12, 41	-	Putative collar structure
13	8516	8791	ORF 12, 99	L14, 100	ORF 14, 100	ORF 12, 100	Structural protein
14	8811	9323	ORF 13, 98	L15, 95	ORF 15, 97	ORF 13, 96	Structural protein
15	9323	12322	ORF 14, 79	L16, 67	ORF 16, 78	ORF 14, 78	Tail tape measure
16	12322	13737	ORF 15, 86	L17, 89	ORF 17, 88	ORF 15, 88	
17	13737	14864	ORF 16, 99	L18, 94	ORF 18, 95	ORF 16, 99	
18	14839	15147	ORF 17, 100	L19, 97	ORF 19, 98	ORF 17, 95	
19	15137	15895	ORF 18, 63	L20, 58	ORF 20, 60	ORF 18, 61	Receptor binding protein
20	15917	16270	ORF 19, 99	L21, 93	ORF 21, 96	ORF 19, 97	Holin
21	16267	17043	ORF 20, 82	L22, 74	ORF 22, 70	ORF 20, 85	Lysin
<u>Early Expressed Region</u>							
22	17588	17169	-	E37, 39	-	-	HNH endonuclease
23	18235	17663	sk1 p21, 83	E36, 66	ORF 23, 74	-	Bidirectional terminator
24	18566	18297	ORF 21, 86	E33, 88	ORF 25, 90	ORF 21, 87	
25	18713	18567	-	-	-	-	
26	19234	18887	ORF 23, 77	E31, 83	ORF 26, 82	ORF 22, 77	
27	19470	19234	ORF 24, 100	E30, 27	ORF 27, 41	ORF 23, 100	
28	19660	19421	ORF 25, 84	E28, 77	ORF 29, 73	ORF 24, 86	
29	19978	19736	ORF 30, 86	E21, 90	-	ORF 29, 83	
30	20089	19979	sk1 p32, 81	E19, 77	-	-	
31	20848	20423	-	E20, 66	ORF 36, 50	-	HNH endonuclease
32	21440	20931	ORF 32, 92	E15, 90	ORF 37, 94	ORF 31, 94	
33	21652	21437	ORF 33, 92	E14, 92	ORF 38, 93	ORF 32, 93	
34	22024	21665	ORF 34, 94	E13, 94	ORF 39, 94	ORF 33, 93	
35	22581	22027	ORF 35, 53	E12, 49	ORF 40, 88	ORF 34, 58	sak
36	22907	22578	ORF 36, 59	-	-	-	
37	23195	22965	ORF 37, 100	-	-	ORF 36, 100	
38	23599	23192	ORF 38, 90	E10, 81	ORF 42, 81	ORF 37, 85	
39	24075	23698	ORF 40, 49	E8, 61	ORF 44, 72	ORF 39, 56	
40	24389	24132	ORF 41, 89	E7, 91	ORF 45, 87	ORF 40, 90	
41	24573	24361	ORF 42, 38	E6, 45	ORF 46, 44	-	
42	25462	24566	ORF 43, 42	E5, 41	ORF 42, 45	ORF 47, 96	DNA polymerase subunit
43	25727	25455	ORF 45, 92	-	-	-	
44	26297	25788	*E5 bIL66M1 (N-term), 67	-	-	-	
45	26466	26308	*E5 bIL66M1, 75	-	ORF 48, 77	-	
46	27165	27046	-	E2, 97	ORF 50, 98	-	
47	27746	27567	ORF 48, 100	-	-	ORF 44, 93	
48	27885	27751	ORF 49, 100	-	-	-	
49	28085	27885	ORF 50, 93	E1, 85	ORF 52, 88	ORF 45, 86	
50	28203	28066	-	-	-	-	
<u>Middle Expressed Region</u>							
51	28336	28464	ORF 51, 93	M1, 95	ORF 53, 93	ORF 46, 93	
52	28469	28600	ORF 52, 95	M2, 967	ORF 54, 100	ORF 47, 95	
53	28597	29082	ORF 53, 94	M3, 95	ORF 55, 97	ORF 48, 92	Holliday junction
54	29079	29246	ORF 54, 93	M4, 90	ORF 56, 91	ORF 49, 93	

Table 6.3: Coordinates of phage jj50 ORFs and representative ORFs in other 936-type phages.

ORF	Start	Stop	%aa identity				Putative function
			sk1	bIL170	P008	712	
<u>Early Expressed Region</u>							
1	262	786	ORF 1, 99	L1, 97	ORF 1, 97	ORF 1, 98	Terminase small subunit
2	787	2409	ORF 2, 99	L2, 96	ORF 2, 99	ORF 2, 98	Terminase large subunit
3	2399	2683	ORF 3, 100	L3, 96	ORF 3, 98	ORF 3, 100	HNH Endonuclease
4	2696	3832	ORF 4, 99	L4, 94	ORF 4, 96	ORF 4, 99	Portal protein
5	3813	4349	ORF 5, 99	L5, 96	ORF 5, 98	ORF 5, 97	Protease
6	4321	5523	ORF 6, 99	L6/L7, 97	ORF 6, 99	ORF 6, 99	Structural protein
7	5544	5807	ORF 7, 97	L8, 97	ORF 8, 98	ORF 7, 97	Structural protein
8	5807	6121	ORF 8, 95	L9, 93	ORF 9, 97	ORF 8, 95	Structural protein
9	6245	6448	ORF 9, 100	L10, 100	ORF 10, 99	ORF 9, 99	Structural protein
10	6418	6804	ORF 10, 96	L11, 95	ORF 11, 97	ORF 10, 96	Structural protein
11	6817	7722	ORF 11, 94	L13, 93	ORF 13, 94	ORF 11, 88	Major tail structural protein
12	7761	8036	ORF 12, 99	L14, 100	ORF 14, 100	ORF 13, 100	
13	8056	8568	ORF 13, 96	L15, 99	ORF 15, 99	ORF 14, 96	
14	8568	11567	ORF 14, 99	L16, 81	ORF 16, 80	ORF 15, 78	Tail tape measure
15	11567	12463	ORF 15, 95	L17, 97	ORF 17, 95	ORF 16, 88	
16	12463	13590	ORF 16, 99	L18, 94	ORF 18, 95	ORF 17, 99	
17	13580	13873	ORF 17, 95	L19, 94	ORF 19, 94	ORF 18, 95	
18	13863	14657	ORF 18, 92	L20, 80	ORF 20, 56	ORF 19, 61	Receptor binding protein
19	14679	15032	ORF 19, 98	L21, 93	ORF 21, 95	ORF 20, 97	Holin
20	15029	15790	ORF 20, 97	L22, 77	ORF 22, 70	ORF 21, 85	Lysin
<u>Early Expressed Region</u>							
21	16443	16177	ORF 21, 100	E33, 96	ORF 25, 94	ORF 24, 87	
22	16963	16616	ORF 23, 98	E31, 66	ORF 26, 67	ORF 26, 77	
23	17199	16963	ORF 24, 100	E30, 27	ORF 27, 41	ORF 27, 100	
24	17407	17150	ORF 25, 96	E28, 74	ORF 29, 74	ORF 28, 86	
25	17857	17471	ORF 26, 97	E27, 82	ORF 33, 84	-	
26	17982	17857	ORF 27, 100	E23, 82	ORF 34, 60	-	
27	18275	17973	ORF 28, 98	-	-	-	
28	18525	18169	ORF 29, 99	E22, 94	-	-	
29	18793	18548	ORF 30, 88	E21, 85	-	ORF 29, 83	
30	19148	18831	ORF 31, 93	E17, 85	ORF 35, 78	-	
31	19740	19231	ORF 32, 98	E15, 94	ORF 37, 92	ORF 32, 94	
32	19952	19737	ORF 33, 97	E14, 97	ORF 38, 97	ORF 33, 93	
33	20363	19968	ORF 34, 99	E13, 92	ORF 39, 94	ORF 34, 93	
34	20975	20406	ORF 35, 93	E12, 96	ORF 40, 59	ORF 35, 58	<i>sak</i>
35	21247	20951	ORF 36, 75	-	ORF 41, 55	-	
36	21535	21305	ORF 37, 100	-	-	ORF 37, 100	
37	21933	21532	ORF 38, 91	E10, 88	ORF 42, 82	ORF 38, 85	
38	22036	21749	ORF 39, 100	E9, 97	ORF 43, 94	-	
39	22419	22033	ORF 40, 100	E8, 50	ORF 44, 59	ORF 39, 56	
40	22742	22476	ORF 41, 100	E7, 89	ORF 45, 87	ORF 40, 90	
41	22884	22705	ORF 42, 98	-	-	-	
42	23831	22881	ORF 43/44, 99	E5, 95	ORF 47, 44	ORF 42, 45	DNA polymerase subunit
43	24530	23850	ORF 47, 93	E3, 87	-	-	
44	25147	24968	ORF 48, 93	-	-	ORF 47, 93	
45	25336	25148	ORF 50, 92	E1, 87	ORF 52, 84	ORF 49, 86	
<u>Middle Expressed Region</u>							
46	25466	25594	ORF 51, 100	M1, 98	ORF 53, 98	ORF 51, 93	
47	25599	25730	ORF 52, 100	M2, 93	ORF 54, 95	ORF 52, 95	
48	25727	26209	ORF 53, 99	M3, 91	ORF 55, 94	ORF 53, 92	Holliday junction endonuclease
49	26206	26373	ORF 54, 100	M4, 95	ORF 56, 98	ORF 54, 93	

Table 6.4: Coordinates of phage P008 ORFs and representative ORFs in other 936-type phages.

ORF	Start	Stop	%aa identity				Putative function
			sk1	bIL170	712	JJ50	
Late Expressed Region							
1	254	778	ORF 1, 96	L1, 98	ORF 1, 98	ORF 1, 97	Terminase small subunit
2	779	2401	ORF 2, 98	L2, 96	ORF 2, 98	ORF 2, 99	Terminase large subunit
3	2391	2675	ORF 3, 97	L3, 97	ORF 3, 98	ORF 3, 98	HNH Endonuclease
4	2688	3824	ORF 4, 95	L4, 97	ORF 4, 96	ORF 4, 96	Portal protein
5	3805	4341	ORF 5, 98	L5, 96	ORF 5, 99	ORF 5, 98	Protease
6	4334	5515	ORF 6, 99	L6, 97	ORF 6, 99	ORF 6, 99	Structural protein
7	4559	5515	Non-annotated, 99	L7, 98	-	-	Structural protein
8	5536	5799	ORF 7, 100	L8, 100	ORF 7, 99	ORF 7, 98	Structural protein
9	5799	6113	ORF 8, 94	L9, 94	ORF 8, 96	ORF 8, 97	Structural protein
10	6110	6451	ORF 9, 96	L10, 98	ORF 9, 94	ORF 9, 99	Structural protein
11	6442	6807	ORF 10, 97	L11, 96	ORF 10, 97	ORF 10, 97	Major tail structural
12	6836	7273	-	L12, 80	ORF 12, 40	-	Putative collar structure
13	7297	8202	ORF 11, 97	L13, 97	ORF 11, 87	ORF 11, 94	
14	8257	8532	ORF 12, 98	L14, 100	ORF 13, 100	ORF 12, 100	
15	8552	9064	ORF 13, 97	L15, 98	ORF 14, 97	ORF 13, 99	
16	9064	11814	ORF 14, 71	L16, 94	ORF 15, 78	ORF 14, 80	Tail tape measure
17	11814	12710	ORF 15, 91	L17, 97	ORF 16, 88	ORF 15, 95	
18	12710	13837	ORF 16, 94	L18, 98	ORF 17, 95	ORF 16, 95	
19	13827	14120	ORF 17, 97	L19, 100	ORF 18, 98	ORF 17, 94	
20	14110	14913	ORF 18, 72	L20, 95	ORF 19, 60	ORF 18, 56	Receptor binding protein
21	14935	15288	ORF 19, 96	L21, 94	ORF 20, 96	ORF 19, 95	Holin
22	15285	15986	ORF 20, 77	L22, 97	ORF 21, 70	ORF 20, 70	Lysin
Early Expressed Region							
23	16630	16094	Non-annotated, 93	E36, 91	ORF 23, 74	-	
24	16977	16720	-	E35, 99	-	-	
25	17267	16998	ORF 21, 93	E33, 96	ORF 24, 90	ORF 21, 94	
26	17787	17440	ORF 23, 67	E31, 98	ORF 26, 82	ORF 22, 67	
27	17954	17787	ORF 24, 40	E30, 96	ORF 27, 41	ORF 23, 41	
28	18142	17954	-	E29, 95	-	-	
29	18389	18135	ORF 25, 75	E28, 98	ORF 28, 73	ORF 24, 74	
30	18656	18453	ORF 26, 55	E27, 96	-	ORF 25, 56	
31	18860	18717	-	E25, 95	-	-	
32	19297	18857	-	-	-	-	
33	19604	19299	ORF 26, 85	E24, 83	-	ORF 25	
34	19732	19604	ORF 27, 56	E23, 59	-	ORF 26, 60	
35	20106	19792	ORF 31, 80	E17, 86	-	ORF 30, 78	
36	20597	20172	-	E20, 73	ORF 31, 50	-	HNH endonuclease
37	21185	20676	ORF 32, 91	E15, 92	ORF 32, 94	ORF 31, 92	
38	21397	21182	ORF 33, 97	E14, 97	ORF 33, 93	ORF 32, 97	
39	21769	21410	ORF 34, 94	E13, 92	ORF 34, 94	ORF 33, 94	
40	22348	21773	ORF 35, 54	E12, 50	ORF 35, 88	ORF 34, 59	<i>sak</i>
41	22650	22324	ORF 36, 63	-	-	ORF 35, 55	
42	23044	22637	ORF 38, 80	E10, 88	ORF 38, 81	ORF 37, 82	DNA polymerase
43	23147	22857	ORF 39, 97	E9, 94	-	ORF 38, 94	
44	23524	23144	ORF 40, 52	E8, 83	ORF 39, 72	ORF 39, 59	
45	23840	23577	ORF 41, 89	E7, 94	ORF 40, 87	ORF 40, 87	
46	24021	23812	-	E6, 100	ORF 41, 44	-	
47	24910	24014	ORF 43, 41	E5, 40	ORF 42, 96	ORF 42, 44	
48	25115	24954	*E4 bIL66M1, 95	-	ORF 45, 77	-	
49	25386	25162	-	-	-	-	
50	26031	25912	-	E2, 100	ORF 46, 98	-	
51	26169	26315	-	ORF 0, 89	-	-	
52	26610	26443	ORF 50, 87	E1, 83	ORF 47, 88	ORF 45, 84	
Middle Expressed Region							
53	26761	26889	ORF 51, 97	M1, 97	ORF 51, 93	ORF 46, 98	
54	26894	27025	ORF 52, 95	M2, 97	ORF 52, 100	ORF 47, 95	
55	27022	27504	ORF 53, 95	M3, 96	ORF 53, 97	ORF 48, 94	Holliday junction
56	27501	27668	ORF 54, 98	M4, 96	ORF 54, 91	ORF 49, 98	
57	27882	28004	-	-	-	-	
58	28298	28426	-	-	-	-	

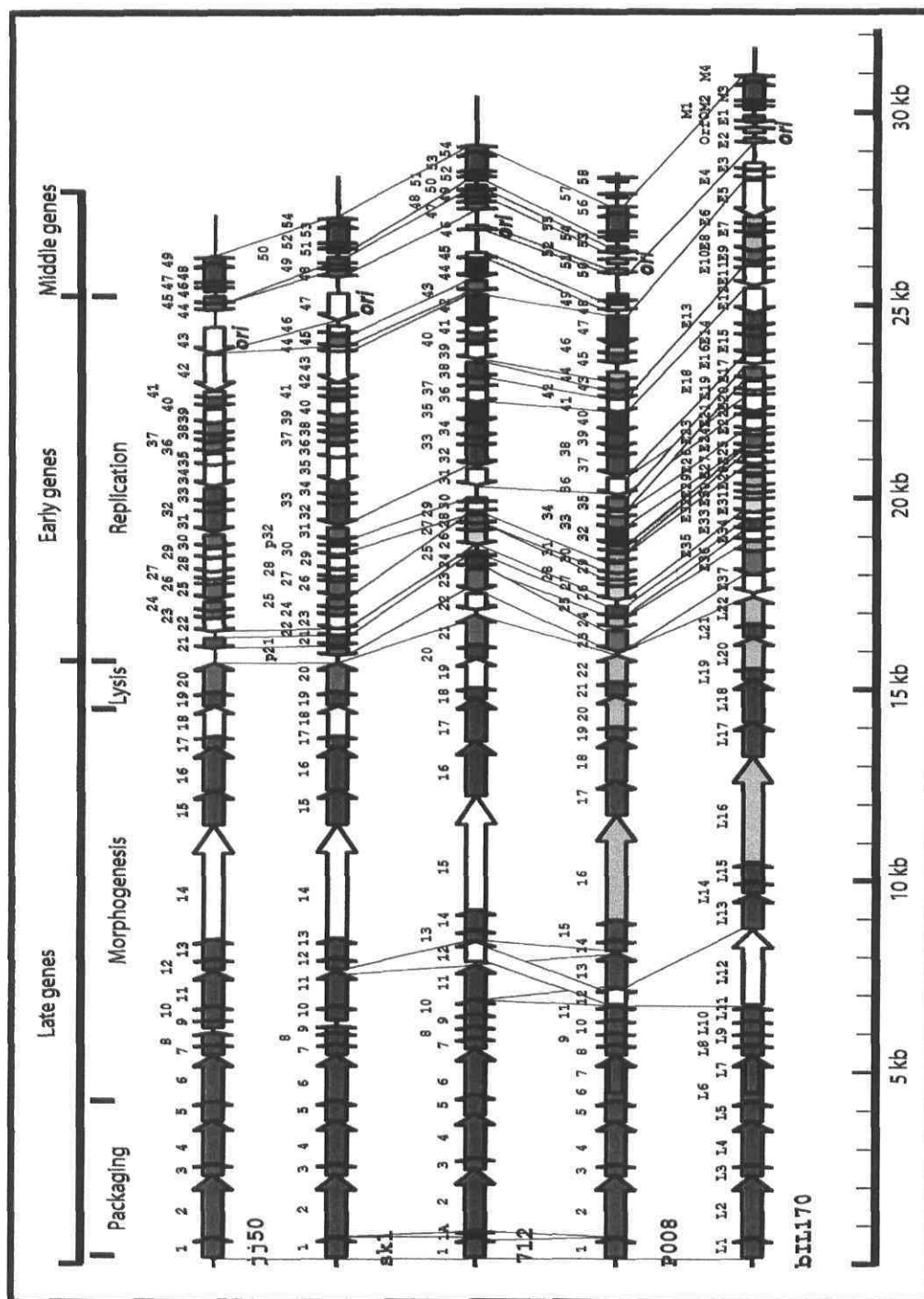


Figure 6.1: Schematic representation of the genomic organisation of the 936-type phages jj50, sk1 (Chandry *et al.*, 1997), 712, P008, and bIL170 (Crutz-le Coq *et al.*, 2002). Genomic regions of the phages connected by a grey block are indicative of those possessing over 60% identity at the amino acid level; genomic regions of the same color share 80% of identity. The putative origins of replication (ori) of the phages are indicated below the relevant region of the individual phages. ORFs of the same colour represent those conserved between the phages.

Here, the three newly sequenced phage genomes were assigned ORF numbers in a fashion similar to that of sk1. The ORFs of phage sk1 were previously designated ORFs 1 to 54 with the late expressed region assigned ORFs 1-20, the early expressed region, ORFs 21-50 and the middle expressed region, ORFs 51-54 (Chandry *et al.*, 1997). Transcriptional analysis of sk1 had shown that the early and late expressed gene modules are organised as divergently oriented transcriptional units, while the middle expressed region exhibits a back-to-back assemblage with the early expressed region at the distal region of the phage genomes (Beresford *et al.*, 1993). Based on the conservation of the overall genetic structures of the five sequenced phages, it is assumed for comparative purposes that the transcriptional units are also conserved. Each of the assumed temporally-transcribed regions will be considered in more detail below as will areas of particular interest.

Late expressed regions

(1) Packaging. ORFs 1_{sk1} to 5_{sk1} and their counterparts in each of the other phages maintain synteny and identity above 90% (Fig. 6.1). An open reading frame (orf1a) located between the genes coding for the two terminase subunits (orf1₇₁₂ and orf2₇₁₂) is observed in the genome of 712 that has 43% identity to ORF26 (unknown function) of the temperate lactococcal phage TP901-1 of the P335 species (Table 6.2).

(2) Capsid and tail morphogenesis. All the structural genes of sk1 have homologues in the genomes of 712, jj50, and P008. ORF L12_{bIL170}, with a predicted function as a collar structure was previously shown to be absent in sk1 (Crutz-Le Coq *et al.*, 2002). It has previously been confirmed that bIL170 possesses a collar structure that is not observed in sk1 (Dupont *et al.*, 2004). Phage jj50 also lacks a homologue of this gene. Interestingly, an ORF with 67% identity to the carboxy-terminus of L12_{bIL170} (ORF12₇₁₂) was identified in 712. Phage P008 has a similarly truncated version of this protein with 80% identity to the carboxy-terminus of L12_{bIL170} (ORF12_{P008}). Electron micrographs showed no collar structure in any of the three phages analyzed in this study. The presence of L12 and the collar structure in phage bIL170 is the most significant difference in the region expressing the structural proteins between the five 936-like phages. Interestingly, in phages exhibiting truncated versions of this protein (712 and P008), no discernable collar structure is

observed. The presence/absence of homologues of this gene could be used to propose a phylogenetic subgrouping of these phages (Fig. 6.1, Table 6.5).

Table 6.5: Subgroupings of the 936-like sequenced phages.

Phage	Host	Characteristics used for subgroupings:						
		Replication origin	<i>cos</i> terminal region	Receptor binding protein	Collar protein (LI2 _{bIL170})	Lysin	<i>sak</i> gene	DNA polymerase
sk1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	sk1-type	sk1-type	sk1-type	Absent	sk1-type	sk1-type	sk1-type
jj50	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	sk1-type	sk1-type	sk1-type	Absent	sk1-type	sk1-type	sk1-type
712	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	bIL170-type	sk1-type	712-type	Truncated	712-type	712-type	712-type
P008	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	bIL170-type	bIL170-type	bIL170-type	Truncated	bIL170-type	712-type	712-type
bIL170	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	bIL170-type	bIL170-type	bIL170-type	Full	bIL170-type	sk1-type	sk1-type

The lowest level of identity was observed with the 712 homologue of 14_{sk1}. There are major structural proteins (Chandry *et al.*, 1997) that presumably function as the tail tape measure protein (Crutz-Le Coq *et al.*, 2002). The tail tape measure protein of phage jj50 (ORF14) has significantly higher homology to its sk1 counterpart while the bIL170 equivalent was closer to the homologue of P008. Interestingly, phage 712 appears to encode a tape measure protein that has a reduced level of homology, suggesting an intermediate genotype for this protein. Phage observation with an electron microscope also revealed that phages sk1 and jj50 appear to have the longest tails with average lengths of 223 nm and 219 nm, respectively. The tails of phages 712 and P008 are approximately 205 nm and 211 nm in length. Phage bIL170 has the shortest tail length among these five 936-type phages, displaying an overall length of on average 182 nm. All phages have an isometric capsid of approximately 55 nm in diameter (data not shown).

The protein encoded by ORF 18_{sk1} and its homologues in a number of other lactococcal phages, have been experimentally proven to act as the receptor binding protein (De Haard *et al.*, 2005; Dupont *et al.*, 2004). The amino-terminus of this protein is highly conserved among the 936-type phages while variability is observed at the carboxy-terminus of the protein. A subgrouping of the 936 phage species was previously proposed based on the variations in the sequence of the receptor-binding protein (RBP) (Dupont *et al.*, 2005). On

this basis, the five 936-like phages analyzed in this study may be divided in three subgroups, namely ORF18_{sk1/jj50}, ORF20₇₁₂, and L20_{bIL170/P008}.

(3) Lysis. The bacteriophage lysis cassette, which comprises a holin and an endolysin gene, was analyzed in these 936-like phages. As observed previously with phages sk1 and bIL170 (Labrie *et al.*, 2004), the holins of phages P008, jj50, and 712 contained a putative dual-start motif and three transmembrane domains (class I). Similarly, an amidase motif was observed in the endolysins of the five 936-like phages. Analysis of the deduced endolysins also allows to divide them into the three subgroups described above. The endolysin of jj50 (ORF20) has greater identity to that of sk1 while the endolysin of bIL170 is closer to P008. Comparatively, the endolysin of 712 (ORF21) has a lower level of identity to any other endolysins analysed in this study, which may signify the divergent ancestry of 712 as compared to the other sequenced 936-like phages.

Early expressed region

The greatest level of divergence between the phages compared in this study was apparent in the early expressed region. Crutz-Le Coq *et al.* (2002) observed a similar finding when comparative genome analysis of sk1 and bIL170 were made. Phages sk1 and jj50 share the greatest homology with the majority of the deduced proteins possessing over 90% identity (Table 6.3). However, while they are highly homologous, indels are observed when jj50, sk1 are compared. Notably, ORFs 22, 45, 46, and 49_{sk1} have no homologous equivalents in jj50. Many of the early expressed ORFs that have bIL170 homologues have a lower level of similarity as compared to their sk1 counterparts (Table 6.3). Phages sk1 and jj50 have a similar host range, and for that reason would be expected to be homologous at the genetic level.

The early expressed region of phage 712 diverges from both sk1 and bIL170 with many more indels than was observed in jj50. The ORFs with bIL170 and sk1 homologues are generally similar but at lower levels than the corresponding ORFs in jj50. Modular exchange of phage genetic material is well documented from a bioinformatic standpoint and may consist of single genes or portions of genes encoding a specific protein domain (Desiere *et al.*, 1998) and the diversification of the early expressed genes of the phages

compared in this paper are in support to this theory. This may signify that at some point these phages may have infected the same host strain, thus providing the opportunity for recombination to occur. Of the early expressed genes, 17 ORFs from bIL170 and 9 ORFs from sk1 are absent in the genome of 712 (See Table 6.2).

Phages P008 and 712 bear many similarities in the early expressed region. The absence of clusters of equivalent genes in this region as compared to sk1 is noteworthy (ie. orfs 28-30_{sk1} and 44-47_{sk1}). This, together with the fact that the majority of P008 genes in this region possess greater homology to their bIL170 counterparts points to the more prominent relatedness between them than to any of the other phages, notwithstanding the obvious intermediate links between P008 and 712 particularly with respect to the replication origin (see below) and indels described above in the early expressed region.

Crutz-Le Coq and colleagues (2002) highlighted the presence of three HNH endonucleases in the early expressed region of bIL170 (E11, E20 and E37) that purportedly are involved in the DNA maturation process of the phage. The genomes of sk1 and jj50 do not display any orthologues of these HNH endonucleases. Phage 712 possesses homologues of E20 and E37, while P008 possesses a homologue of just one of these open reading frames, namely E20. If these proteins are involved in the maturation of the phage DNA, and since 712 and P008 do not possess the full complement of these proteins, it is possible that the latter phages have acquired other genes encoding a similar function. The presence of one and two ORFs in the early expressed region of the genomes of 712 and P008, respectively, which have no homologues in the database, implies that there may be other related phages with distinct regions of non-homology and common ancestry with the previously sequenced 936 phages. This also highlights the promiscuity of these genetic entities and may reflect the extensive evolutionary routes that they pursued. This finding of regions of homology interspersed with regions of non-identity has been described for other lactococcal phages (Brondsted *et al.*, 2001; Labrie and Moineau, 2002).

Phage genes involved in the sensitivity to AbiK have been identified and classified into four homologous groups, named sak, sak2, sak3, and sak4 (Bouchard and Moineau, 2004). The ORFs involved in this process for sk1 and bIL170 have been identified as ORF35_{sk1} and E12_{bIL170}, respectively, and belong to the sak3 group. This study reveals the presence

of an ORF highly homologous to these in jj50 (ORF34_{jj50}). There are also representatives of these ORFs in 712 and P008, however, at a significantly lower level of homology (ORF35₇₁₂ and ORF40_{P008}, respectively) (Tables 6.2 & 6.4). These ORFs in P008 and 712 are highly homologous to each other, suggesting the presence of two subgroups of SAK3 proteins (Table 6.5). The SAK3 of phages 712 and P008 lack an amino-terminal and central portion of the protein as compared to their sk1, jj50, and bIL170 counterparts. These proteins are believed to be single-strand DNA binding proteins, which may be involved in DNA repair, circularisation and/or replication (Bouchard and Moineau, 2004).

Replication origin

Previously, the origin of replication of phage sk1 was experimentally determined to be within orf47 (Chandry *et al.*, 1997). Phage bIL170 does not possess a homologue of this gene, however, an additional orf (orf0) was found at a corresponding position with a high A+T content (71 %) and a short conserved region maintained in both phages (Crutz-Le Coq *et al.*, 2002). Consequently, Crutz-Le Coq *et al.* (2002) assigned orf0_{bIL170} as the putative replication origin. Sequence analysis revealed that jj50 carries an ORF with 93% homology to ORF47_{sk1} and it is, therefore, assumed that this phage has the same replication origin (Fig. 6.1). The genome of 712 does not possess a homologue of either orf47_{sk1} or orf0_{bIL170}. However, phage 712 has a homologue of e2_{bIL170}, which is absent in sk1 and jj50. This gene is located just downstream of orf0 and has an A+T composition similar to that of orf0 (71.4%). This orf of phage 712, and possibly the A+T-rich flanking regions, could be part of the replication origin. A portion (E1-E14) of the early expressed region of the lactococcal 936-like phage bIL66M1 reveals similarity to phage 712 (Domingues *et al.*, 2004a). For example, phage bIL66M1 carries a homologue of e2_{bIL170}. These complementary findings in both 712 and bIL66M1 may indicate that e2 is also part of the replication origin for bIL170. Phage P008 displays similarity to bIL170 in this respect. The former phage carries homologues of both orf0 and e2_{bIL170}, and does not have an equivalent of orf47_{sk1}, suggesting that this phage utilizes the same replication system as bIL170, 712, and bIL66M1.


```

*          *
          20
SK1_cos   : GCAGTACTATCCCTA-TGCGCTATGATATACATTC : 37
jj50_cos_ : GCAGTACTATCCCTA-TGCGCTATGATATACATTC : 37
712_cos   : GCAGTACTATCCCTA-TGCGCTATGATATACATTC : 37
P008_cos_ : CCAGTGTTCGATTCGTGGCTATGGCTATGGCTTGC : 38
bIL170cos_ : CCAGTGTTCGATTCGTGGCTATGGCTATGGCTTGC : 38
          CAGT T t T TgTG CTAT TAT C T C

          40          60          *
SK1_cos   : AA AAGCAAAAGCAATAA AATA-AAATAAATAAAG : 74
jj50_cos_ : AA AAGCAAAAGCAATAA AATA-AAATAAATAAAG : 74
712_cos   : AA AAGCAAAAGCAATAA AATA-AAATAAATAAAG : 74
P008_cos_ : TATTAAGTATAAAGCTAGATAAATAAATAAATAAAG : 76
bIL170cos_ : TATTAAGTATAA-GCTAAGCAATA--A--AGTGATY : 70
          A a G A A a TAA AATA aaRLaAgTahag

          80          *          100          *
SK1_cos   : AGATAAAGATAATTCCTTCAGAGAAAAATAAATAA : 112
jj50_cos_ : AGATAAAGATAATTCCTTCAGAGAAAAATAAATAA : 112
712_cos   : AGATAAAGATAATTCCTTCAGAGAAAAATAAATAA : 112
P008_cos_ : ATATAAGGTA-TACCTTCAGAGAGCAATAAATAA : 112
bIL170cos_ : GTGAAAGA-----AAATAAATAAATAA-- : 94
          a atAAAGata t ctttcagAg aAAATAAATAA

          120          *          140          *
SK1_cos   : AATAATTTTTATATATACCCCCCATTAATCGCTA : 150
jj50_cos_ : AATAATTTTTATATATACCCCCCATTAATCGCTA : 150
712_cos   : AATAATTTTTATATATATACCCCC-ATAATCGCTA : 149
P008_cos_ : -----TTTTCCATAGGTACCCGCCCAT-ATCGCTA : 144
bIL170cos_ : -----TTTTCCATAGGTACCCGCCCATTAATCGCTA : 126
          tTTTT ATA TAgCC CCCaTtAATCGCTA

          160          IR          *          GOS          00          *
SK1_cos   : TGTTAAGG AATTTTCAG CAGAAAGCA CCTCTY : 188
jj50_cos_ : TGTTAAGG AATTTTCAG CAGAAAGCA CCTCTY : 188
712_cos   : TGTTAAGG G AATTTTCAG CAGAAAGCA CCTCTY A : 187
P008_cos_ : TGTTAAG G AATTTTCAG CAGAAAGCA CCTCTY A : 182
bIL170cos_ : TGTTAAGT AATTTTCAG CAGAAAGCA CCTCTY : 164
          TGTTaAgGaaATTTTCAGCAGAAAGCACTCCG T

          IR          200          R3          220
SK1_cos   : CAA AATCAAAAAGAAAGCA TAGCTG : 226
jj50_cos_ : C AATC CCAA AATCAAAAAGAAAGCA TAGCTG : 226
712_cos   : C AATC CCAA AATCAAAAAGAAAGCA TAGCTG : 225
P008_cos_ : C AATC CCAA AATCAAAAAGAAAGCA TAGCTG : 220
bIL170cos_ : CG AATC CCAA AATCAAAAAGAAAGCA TAGCTG : 202
          C AATC CccAAAAATCAAAAAGAAAGTTTTAGCTG

          *          240          *          260
SK1_cos   : ATTT AATTT AATTT AATTT AGTAA : 264
jj50_cos_ : ATTT AATTT AATTT AATTT AGTAA : 264
712_cos   : GTTC GATTT AATTT AGTAA : 263
P008_cos_ : GTTT AATTT AATTT AGCATG : 258
bIL170cos_ : GTTC GATTT AATTT AGTAC : 240
          TT AATCT A TTAATCAATTTAATCTAGCA aATC

          *          280          R2          300
SK1_cos   : TGGCTA TAAT AATCAAAAAGAAAGCA : 302
jj50_cos_ : TGGCTA TAAT AATCAAAAAGAAAGCA : 302
712_cos   : TGGCTG TAAT AATCAAAAAGAAAGCA : 300
P008_cos_ : TGGCTA TAA -----A-TCA : 276
bIL170cos_ : TGGCTA TAA -----A-TCA : 258
          TGGCTaAATCTTAA A T A

          *          320          *          340
SK1_cos   : TGGCTATATGCTCATATTTGGCTCGATGAGCGTG : 340
jj50_cos_ : TGGCTATATGCTCATATTTGGCTCGATGAGCGTG : 340
712_cos   : TGGCTATATGCTCATATTTGGCTCGATGAGCGTG : 338
P008_cos_ : TAGGGCTATATGCTCATATTTGGCTCGATGAGCGTG : 314
bIL170cos_ : TAGGGCTATATGCTCATATTTGGCTCGATGAGCGTG : 296
          TA GGCTATATGCTCATATTTGGCTCGAtGAGCGtg

          *          360          *          380
SK1_cos   : TTTATATCATTACGATATAATCAAGCTAATTAACTY : 378
jj50_cos_ : TTTATATCATTACGATATAATCAAGCTAATTAACTY : 378
712_cos   : GTTACCTAAGTG-GGTAACTTATAAGCAAAGTTATT : 375
P008_cos_ : TTTATATCATTGCGATATAATCAAGCTAATTAACTY : 352
bIL170cos_ : TTTATATCATTGCGATATAATCAAGCTAATTAACTY : 334
          TTTATATCACT cGatTAAATcAgTcTAAatascTT

          *          400          *          4
SK1_cos   : AACGCTCAGGAACGAAAATATAGGCTTTAAACGATA : 416
jj50_cos_ : AACGCTCAGGAACGAAAATATAGGCTTTAAACGATA : 416
712_cos   : GCTGTCTTGAAGCACTAGAAATATAGGCTTTAAACGATA : 413
P008_cos_ : AACGCTCAGGAACGAAAATATAGGCTTTAAACGATA : 390
bIL170cos_ : AACGCTCAGGAACGAAAATATAGGCTTTAAACGATA : 372
          aacGCTcCAGGAACgAaAATATAGGCTTTAAACGATA

          20          R1          440
SK1_cos   : TAACC AATTTAAAGAAAGCAATA : 443
jj50_cos_ : TAACC AATTTAAAGAAAGCAATA : 443
712_cos   : TAACC AATTTAAAGAAAGCAATA : 440
P008_cos_ : TAACC AATTTAAAGAAAGCAATA : 417
bIL170cos_ : TAACC AATTTAAAGAAAGCAATA : 399
          TAACCACATTTAAAGAAAGCA AATA

```

Figure 6.2: Comparison of the *cos* terminal regions of the 936-type phages. Shaded are the inverted repeats (IR) and the putative terminase binding sites (R1-4)

Middle expressed region

The middle expressed genes of all five phages are well conserved and overall, there is little divergence in this region (Fig. 6.1). Following the phage region patterns described above, the sk1 and jj50 corresponding proteins are most related while there is more similarity between bIL170, 712 and P008. An interesting feature, however, is the presence of two

additional ORFs at the distal portion of the middle expressed region of P008 that have no counterparts in any of the other sequenced 936-like phages. With respect to the terminal genomic regions, Parreira *et al.* (1996) observed a conservation of the *cos* site, two of the four putative terminase binding sites (R1 and R3) and five AATCT sequences postulated to be involved in DNA bending and the 10 bp inverted repeats positioned on either side of the *cos* site between bIL66, P008, sk1, and bIL41. Identical genetic structures were observed for jj50, 712, and sk1, while the absence of R2 in P008 and bIL66 is shared with bIL170, thereby compounding the relatedness of these phages (Fig. 6.2).

Activity spectra of Sie2009, AbiA, F, K, Q, and T.

In order to ascertain whether the genome relatedness may be coupled to phenotypic traits, the effect of a variety of abortive infection systems and a superinfection exclusion system were assayed. McGrath *et al.* (2002) previously established that expression of Sie2009 confers a phage-resistant phenotype on the lactococcal host against sk1, jj50, and 712, while no such effect was observed against P008. Here, we showed that Sie2009 has no effect on phage bIL170 (Table 6.1).

The abortive infection systems AbiQ and AbiT, were shown to be effective against all five 936-like phages analyzed in this study (Table 6.1). The EOP values were assayed on *L. lactis* subsp. *cremoris* LM0231 or *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 in the presence or absence of pSRQ928 (abiQ⁺) or pED209 (abiT⁺). These results show highly effective resistance mechanisms against all five phages irrespective of their host range specificities. This effectiveness may be assumed to be due to the similar replication pathways of these phages. AbiK was also effective against the five phages but to various level (Table 6.1).

In contrast, AbiF appears to be effective only against 712, resulting in a one-log reduction in the EOP and a significant plaque size reduction (from 3 mm to pinpoint plaques), while little or no plaque size reduction is observed against sk1 and jj50. AbiA showed an activity pattern similar to that of Sie2009, albeit to various extents, against sk1, jj50, and 712, but exerted no effect on P008 or bIL170.

6.6 Discussion

Lactococcal phages are currently classified in several species mainly based on morphology and DNA-DNA hybridizations (Jarvis *et al.*, 1991). This classification system has been instrumental for the comparison of lactococcal phages isolated throughout the world. Using this cataloguing scheme, it became rapidly obvious that a majority of isolated lactococcal phages belong to the 936-like phages. Because the 936-like species (or group) designation has been effectively used and entrenched in lactic acid bacteriophage research for years, it is doubtful that taxonomical changes will occur soon. However, the wealth of nucleotide sequence information that has been generated may lead to taxonomical adjustments. One taxonomical proposal was based on sorting phages into groups that share common sets of “modi,” reflecting the exchange of genetic modules among bacteriophage genomes (Lawrence *et al.*, 2002). An extension of the “modus” proposal could be to use phage genotypes and phenotypes to subgroup phages that belong to a homogenous group of phages. Here, we have used this strategy, not to modify the current classification of lactococcal phages, but to perhaps determine subgroups within the 936 species, and more specifically within the five phages for which the complete genome is now available.

The genetic organisation of the lactococcal bacteriophages sk1 and bIL170 (Chandry *et al.*, 1997; Crutz-Le Coq *et al.*, 2002) is maintained in the related phages 712, jj50, and P008, whose complete genomic sequences are reported in this study. Due to their similarities at both the genotypic and phenotypic levels, phages bIL170, 712, and P008 appear to have evolved from the same ancestral core as sk1 and jj50 but with greater divergence occurring throughout their evolution. It could be hypothesised that the virulent phages analysed here (or other related members) were, at some point, capable of infecting the same host strain. This would have provided the opportunity for genetic recombination to occur resulting in diversification of this phage species.

According to Dupont *et al.* (2004), phages sk1, jj50, and 712 specifically infect *L. lactis* subsp. *cremoris* strains while bIL170 and P008 infect *L. lactis* subsp. *lactis* strains, which is due, in part at least, to the receptor-binding proteins (RBP). It is generally acknowledged that the conserved N-terminal region of the RBP binds to the phage structure while the

variable C-terminal region would be responsible for host recognition and is likely to be interchangeable through domain swapping (Duplessis and Moineau, 2001; Dupont *et al.*, 2004). This study also concludes that it may be possible to sub-group the 936 phage species based on other genotypes and phenotypes. This subgrouping involves a general division between those phages capable of infecting *L. lactis* subsp. *cremoris* (sk1, jj50, 712) and those capable infecting *L. lactis* subsp. *lactis* (bIL170, P008). This bipartite classification, which concurs with the Dupont *et al.* (2004) subgroupings based on the receptor binding protein, provides an insight into the evolution of these phages.

At the genetic level, it would seem that there may be a further overlap between these five phages. The most noteworthy are the proposed origins of replication, the *cos* terminal regions and the presence/absence of a homologue of the putative collar protein of bIL170 (L12). Phages 712 and P008 appear to have similar replication origins and both carry a truncated version of L12_{bIL170}. Yet, 712 has a similar host range to sk1 and is also more homologous to sk1 than bIL170 in its *cos* terminal region. This intermediate genotype may provide for the possibility of a tripartite subclassification of the 936 phage species: (1) The sk1-type (sk1 and jj50); (2) the bIL170-type (bIL170 and P008) and (3) the intermediate 712-type (712 and bIL66M1).

The analysis of an ever increasing number of lactococcal phage genomes and their sensitivity to Abi mechanisms will likely provide insights into the mode of action of these phage resistance mechanisms as well as assigning new functions to phage proteins. For example, it has recently been shown that the acquisition of E6_{bIL170} by phage bIL66M1, during a co-infection of the lactococcal host strain, conferred resistance to the AbiP abortive infection system (Domingues *et al.*, 2004b). Orthologues of the E6 protein may not confer this phenotype and its presence is not essential (Domingues *et al.*, 2004b), but such analyses may reveal functional roles of genes in this largely uncharacterised region of 936 phages. In this study it has been shown that AbiQ and AbiT are effective against all five phages. These two abortive infection systems are believed to affect phage packaging or morphogenesis (Bouchard *et al.*, 2002; Emond *et al.*, 1998). Since there is no discernible difference in the Abi phenotype for these five phages, they may possess similar

morphogenetic pathways and slight variations in the packaging genes and the *cos* terminal regions are not sufficient to confer resistance to either AbiQ or AbiT.

AbiF, which affects the early stages of phage development, was found to be active against 712 alone. This phage was also highly sensitive to AbiA (E.O.P.<10⁻⁹) while phages sk1 and jj50 were slightly sensitive (E.O.P. values of 10⁻³ and 10⁻², respectively). However, AbiA was unable to prevent proliferation of bIL170 and P008. This activity is similar to findings observed for Sie₂₀₀₉, which prevents phage DNA injection. Since the mode of action of AbiA is unknown, it is risky to draw further comparison with Sie₂₀₀₉. Nonetheless, in silico analysis of the AbiA protein using the TMHMM transmembrane prediction server (Sonnhammer *et al.*, 1998) suggests that it is an exported protein with a hydrophobic N-terminus. On the other hand, a reverse transcriptase motif was also found in AbiA (Fortier *et al.*, 2005), a motif usually found in intracellular proteins.

Similar to AbiA and AbiF, AbiK is known to affect the early stages of phage development. However, AbiK is active, at various levels, against all five 936-like phages tested here. This variability may be due to the differences observed in the *sak* genes of the five phages. P008 and 712 exhibited significantly reduced levels of homology in their *sak* genes compared to sk1, jj50, and bIL170. Although their respective *sak* genes appeared similar, the effect of the AbiK against the two phages was markedly different which may be due to point mutations in the *sak* genes as previously described (Bouchard and Moineau, 2004). *Sak* genes have been implied as being involved in DNA repair processes, phage circularisation and possibly replication. Bearing this in mind, it seems all the more likely that the *sak* neighbouring genes may also be involved in these phage replication processes.

Finally, the web-like phylogeny of the lactococcal phages presented here underlines the promiscuity of these organisms in order to adapt to their native environment. This report represents the first broad-ranging study at the genomic level of this close-knit phage group, thus providing an insight into the genetic variations and mosaicism that may explain their phenotypic variations.

6.7 Materials and Methods

Phages and bacterial strains. The lactococcal strains, plasmids, and 936-type phages used in this study are listed in Table 6.6. Lactococcal host strains were grown at 30°C in M17 broth supplemented with 0.5% glucose. Chloramphenicol (Cm) was added at a final concentration of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ where appropriate.

Table 6.6: Lactococcal strains, plasmids, and bacteriophages used in this study.

	Revelant features	Source or reference
<i>Lactococcus lactis</i> strains		
NZ9000	Host to sk1, jj50 & 712	Kuipers, 1998
LM0230	Host to sk1, jj50 & 712	McKay, 1972
IL1403	Host to P008, bIL170	Chopin <i>et al.</i> , 1984
Plasmid		
pNZ44 _{Sie2009}	Sie ₂₀₀₉ ⁺ , Cm ^r	McGrath, Fitzgerald, and van Sinderen, 2002
AC002	AbiA	Coffey, 1991
pPG23	AbiF ⁺ derivative of pAM401	Garvey, Fitzgerald, and Hill, 1995
pSRQ818	AbiK ⁺ , Cm ^r	Emond <i>et al.</i> , 1997
pSRQ928	AbiQ ⁺ , Cm ^r	Emond <i>et al.</i> , 1998
pED209	AbiT ⁺ , Cm ^r	Bouchard <i>et al.</i> , 2002
Phage		
sk1	Propagated on NZ9000	Chandry <i>et al.</i> , 1997
jj50	Propagated on NZ9000	Josephsen, 1989
712	Propagated on NZ9000	Rince, Tangney, and Fitzgerald, 2000
P008	Propagated on IL1403	Loof, 1983
bIL170	Propagated on IL1403	Crutz-Le Coq <i>et al.</i> , 2002

Sie2009 and Abi activity spectra determination. Plaque assays were performed using the protocol described by Lillehaug *et al.* (1997). The efficiency of plaquing of sk1, P008, 712, jj50, and bIL170 on lactococcal host strains harbouring AbiK, AbiQ, and AbiT was assayed as previously described by Emond *et al.* (1998). The effectiveness of AbiA and AbiF was examined as previously described by Coffey *et al.* (1991) and Garvey *et al.* (1995), respectively, while Sie2009 was assayed against lactococcal phages as previously described by McGrath *et al.* (2002).

DNA sequencing and sequence analysis. DNAs of phages 712 and jj50 was isolated as described by Moineau *et al.* (1994). The DNA was mechanically sheared and the resultant fragments were shotgun-cloned in pGem-Teasy to generate a plasmid library in *E. coli*. The cloned fragments were subsequently sequenced providing a five-fold sequence coverage

(MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany), representing approximately 60% of the phage genomes. Sequence assembly was performed using the Seqman programme of the DNASTar software package. Alignment to the publicly available sequences of bIL170 and sk1 permitted size estimation of the remaining gaps, which in the case of small gaps, were closed by primer walking directly on phage DNA. Larger gaps were PCR-amplified and sequenced by primer walking. PCRs in the *cos* region of the phages required that the phage DNA used as a template be ligated prior to the amplification reaction. DNA of phage P008 was isolated with the Maxi Lambda DNA purification kit (Qiagen) according to the modifications described previously by Deveau *et al.* (2002). This DNA was sequenced on both strands by primer walking using an ABI Prism 3700 apparatus from the genomic platform at the research center of the Centre Hospitalier de l'Université Laval.

Assignment of open reading frames (ORF) was subject to the following criteria: (1) ORFs were at least 30 amino acids in length, (2) with a start codon (ATG, TTG or GTG) preceded by a potential ribosomal binding site or translationally coupled to a preceding ORF. Automatic ORF prediction was carried out using Artemis software or Orffinder available on the NCBI web site followed by a manual check of identified ORFs. Computer-assisted DNA analyses were performed using a Genetics Computer Group sequence analysis software package, version 10.3, including GenBank release 146.0, GenPept release 146.0, UniProt release 4.3, Swiss-Prot release 46.3, TrEMBL release 29.3, NREF release 1.64, PROSITE release 18.45, Pfam release 14.0, REBASE release 503 and ClustalW web site (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). PSI-BLAST and Advanced Blast Search 2.1 were also used for sequence comparisons with databases (Altschul *et al.*, 1997).

Electron microscopy. Prior to electron microscopy, 1.5 ml of phage lysate was centrifuged at 24,000 x g for one hour at 4°C. The supernatant (\pm 1.4 ml) was subsequently removed and the remaining lysate (\pm 0.1 ml) was diluted twice by the addition of 1 ml of 0.1 M ammonium acetate (pH 7.5) and centrifuged as before. The mixture was placed on a nickel Formvar/carbon-coated grid. For coloration of the samples, either 2 % uranyl acetate or 2 % phosphotungstic acid, was added to the grid for one minute, then dried with blotting paper. Phage morphology was observed using a Philips EM300 transmission electron microscope at 60 kV.

Nucleotide sequence accession numbers. The complete genomic sequences of lactococcal phages analysed in this study are available under the following GenBank accession numbers: phage bIL170 (NC001909), sk1 (NC001835), 712 (DQ227763), jj50 (DQ227764), and P008 (DQ054536).

6.8 Acknowledgments

The authors wish to thank J. Josephsen (The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark) for kindly providing phage jj50. J. Mahony is in receipt of research funding by the Irish Research Council for Science Engineering and Technology under the Embark Initiative. D. van Sinderen is a recipient of a Science Foundation of Ireland Investigatorship award (01/IN1/B198). H. Deveau is a recipient of a graduate student scholarship from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). This study was funded, in part, by a strategic grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to S. Moineau.

6.9 References

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-402.
2. Beresford, T. P. J., Ward, L. J. H., and Jarvis, A. W., 1993. Temporally regulated transcriptional expression of the genomes of lactococcal bacteriophages c2 and sk1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11), 3708-12.
3. Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. C., 1998. *Lactococcus lactis* phage operon coding for an endonuclease homologous to RuvC. *Mol. Microbiol.* 28(4), 823-34.
4. Bissonnette, F., Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, M., and Moineau, S., 2000. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 83(4), 620-7.
5. Bouchard, J. D., Dion, E., Bissonnette, F., and Moineau, S., 2002. Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism AbiT from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 184(22), 6325-32.
6. Bouchard, J. D., and Moineau, S., 2004. Lactococcal phage genes involved in sensitivity to AbiK and their relation to single-strand annealing proteins. *J. Bacteriol.* 186(11), 3649-52.
7. Boucher, I., Emond, E., Dion, E., Montpetit, D., and Moineau, S., 2000. Microbiological and molecular impacts of AbiK on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages of the 936 and P335 species. *Microbiology* 146(2), 445-53.
8. Brøndsted, L., Ostergaard, S., Pedersen, M., Hammer, K., and Vogensen, F. K., 2001. Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* 283(1), 93-109.
9. Brüßow, H., and Hendrix, R. W., 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108(1), 13-6.
10. Chandry, P. S., Moore, S. C., Boyce, J. D., Davidson, B. E., and Hillier, A. J., 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* 26(1), 49-64.
11. Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Batt, A., and Langella, P., 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11(3), 260-3.
12. Chopin, M. C., Chopin, A., and Bidnenko, E., 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(4):473-9.
13. Chung, D. K., Kim, J. H., and Batt, C. A., 1991. Cloning and nucleotide sequence of the major capsid protein from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bacteriophage F4-1. *Gene* 101(1), 121-5.
14. Coffey, A., and Ross, R. P., 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82(1-4), 303-21.

15. Coffey, A. G., Fitzgerald, G. F., and Daly, C., 1991. Cloning and characterization of the determinant for abortive infection of bacteriophage from lactococcal plasmid pCI829. *J. Gen. Microbiol.* 137(6), 1355-62.
16. Crutz-Le Coq, A. M., Cesselin, B., Commissaire, J., and Anba, J., 2002. Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. *Microbiology* 148(4), 985-1001.
17. De Haard, H. J., Bezemer, S., Ledebouer, A. M., Muller, W. H., Boender, P. J., Moineau, S., Coppelmans, M. C., Verkleij, A. J., Frenken, L. G., and Verrips, C. T., 2005. Llama antibodies against a lactococcal protein located at the tip of the phage tail prevent phage infection. *J. Bacteriol.* 187(13), 4531-41.
18. Desiere, F., Lucchini, S., and Brüssow, H., 1998. Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *Virology* 241(2), 345-56.
19. Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., and Brüssow, H., 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82(1-4), 73-91.
20. Deveau, H., van Calsteren, M. R., and Moineau, S., 2002. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9), 4364-9.
21. Dobbins, A. T., George, M., Jr., Basham, D. A., Ford, M. E., Houtz, J. M., Pedulla, M. L., Lawrence, J. G., Hatfull, G. F., and Hendrix, R. W., 2004. Complete genomic sequence of the virulent *Salmonella* bacteriophage SP6. *J. Bacteriol.* 186(7), 1933-44.
22. Domingues, S., Chopin, A., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. C., 2004a. A phage protein confers resistance to the lactococcal abortive infection mechanism AbiP. *J. Bacteriol.* 186(10), 3278-81.
23. Domingues, S., Chopin, A., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. C., 2004b. The lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phage DNA replication and temporal transcription switch. *J. Bacteriol.* 186(3), 713-21.
24. Duplessis, M., and Moineau, S., 2001. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 41(2), 325-36.
25. Dupont, K., Vogensen, F. K., and Josephsen, J., 2005. Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey by magnetic capture hybridization PCR targeting a variable region of receptor-binding protein genes. *J. Appl. Microbiol.* 98(4), 1001-9.
26. Dupont, K., Vogensen, F. K., Neve, H., Bresciani, J., and Josephsen, J., 2004. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10), 5818-24.
27. Emond, E., Dion, E., Walker, S. A., Vedamuthu, E. R., Kondo, J. K., and Moineau, S., 1998. AbiQ, an abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12), 4748-56.
28. Emond, E., Holler, B. J., Boucher, I., Vandenberg, P. A., Vedamuthu, E. R., Kondo, J. K., and Moineau, S., 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism AbiK from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4), 1274-83.

29. Fortier L.-C., Bouchard, J. D., and Moineau, S., 2005. Expression and site-directed mutagenesis of the lactococcal abortive phage infection protein *AbiK*. *J. Bacteriol.* 187(11), 3721-30.
30. Garvey, P., Fitzgerald, G. F., and Hill, C., 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12), 4321-8.
31. Hendrix, R. W., Smith, M. C., Burns, R. N., Ford, M. E., and Hatfull, G. F., 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(5), 2192-7.
32. Hill, C., Miller, L. A., and Klaenhammer, T. R., 1990. Nucleotide sequence and distribution of the pTR2030 resistance determinant (*hsp*) which aborts bacteriophage infection in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7), 2255-8.
33. Jarvis, A. W., Fitzgerald, G. F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I. B., Ronda, C., Saxelin, M., and Teuber, M., 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* 32(1), 2-9.
34. Josephsen, J., and Vogensen, F.K., 1989. Identification of three different plasmid-encoded restriction/modification systems in *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *FEMS Microbiol. Lett.* 59(1-2), 161-66.
35. Josephsen, J., Andersen, N., Behrndt, H., Brandsborg, E., Christiansen, G., Hansen, S., and Nielsen, E. W., 1994. An ecological study of lytic bacteriophages in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated in a cheese plant over a five year period. *Int. Dairy J.* 4(2), 123-40.
36. Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M., 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64(1), 15-21.
37. Labrie, S., and Moineau, S., 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3), 987-94.
38. Labrie, S., and Moineau, S., 2002. Complete genomic sequence of bacteriophage *ul36*: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* 296(2), 308-20.
39. Labrie, S., Vukov, N., Loessner, M. J., and Moineau, S., 2004. Distribution and composition of the lysis cassette of *Lactococcus lactis* phages and functional analysis of bacteriophage *ul36* holin. *FEMS Microbiol. Lett.* 233(1), 37-43.
40. Lawrence, J. G., Hatfull, G. F., and Hendrix, R. W., 2002. Imbroglions of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* 184(17), 4891-4905.
41. Lévesque, C., Duplessis, M., Labonté, J., Labrie, S., Fremaux, C., Tremblay, D., and Moineau, S., 2005. Genomic organization and molecular analysis of the virulent bacteriophage 2972 infecting an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7), 4057-68.
42. Loof, M., Lembke, J., and Teuber, M., 1983. Characterisation of the genome of the *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* bacteriophages P008 wide-spread in German cheese factories. *Syst. and Appl. Microbiol.* 4, 413-423.
43. Lu, Z., Alterman, E., Breidt, F., Predki, P., Fleming, H. P., and Klaenhammer, T. R., 2005. Sequence analysis of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage JL-1. *Gene* 348, 45-54.

44. Mann, N. H., Clokie, M. R., Millard, A., Cook, A., Wilson, W. H., Wheatley, P. J., Letarov, A., and Krisch, H. M., 2005. The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type bacteriophage that infects marine *Synechococcus* strains. *J. Bacteriol.* 187(9), 3188-200.
45. McGrath, S., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D., 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 43(2), 509-20.
46. McGrath, S., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D., 2004. The impact of bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(2), 94-9.
47. Miller, E. S., Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Durkin, A. S., Ciecko, A., Feldblyum, T. V., White, O., Paulsen, I. T., Nierman, W. C., Lee, J., Szczypinski, B., and Fraser, C. M., 2003. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *J. Bacteriol.* 185(17), 5220-33.
48. Moineau, S., Borkaev, M., Holler, B. J., Walker, S. A., Kondo, J. K., Vedamuthu, E.R., and Vandenberg, P.A., 1996. Isolation and characterization of lactococcal phages from U.S. buttermilk plants. *J. Dairy Sci.* 79(12), 2104-2111.
49. Parreira, R., Valyasevi, R., Lerayer, A. L. S., Ehrlich, S. D. and Chopin, M-C., 1996. Gene organization and transcription of a late-expressed region of a *Lactococcus lactis* phage. *J. Bacteriol.* 178(21), 6158-65.
50. Perrin, R., Billard, P., and Branlant, C., 1997. Comparative genomics of the lactococcal bacteriophages from species c2. *Res. Microbiol.* 148(7), 573-83.
51. Proux, C., van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G. F., Desiere, F., and Brüssow, H., 2002. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 184(21), 6026-36.
52. Rince, A., Tangney, M., and Fitzgerald, G. F., 2000. Identification of a DNA region from lactococcal phage sk1 protecting phage 712 from the abortive infection mechanism AbiF. *FEMS Microbiol. Lett.* 182(1), 185-91.
53. Rohwer, F., and Edwards, R., 2002. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* 184(16), 4529-35.
54. Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6,175-82.

Chapitre 7

Discussion et perspectives

L'objectif principal du projet était d'améliorer les connaissances générales sur les phages infectant *L. lactis*. Les objectifs visés lors de ces travaux ont été atteints. D'abord, une nouvelle classification des phages infectant *L. lactis* a été proposée (chapitre 2). Ensuite, les phages infectant des souches acidifiantes et des souches productrices d'EPS ont été isolés et analysés (chapitre 3 et 4). Le rôle des EPS dans l'infection par les phages ou dans un possible mécanisme de résistance a été étudié (chapitre 4). De plus, des améliorations ont été proposées pour deux différentes méthodes : la caractérisation de souches productrices d'EPS par RFLP (chapitre 5) et la classification des phages par multiplex PCR (chapitre 2). Pour terminer, la diversité génétique et phénotypique de cinq phages de l'espèce la plus fréquemment rencontrée (l'espèce 936) a été analysée (chapitre 6).

7.1 La biodiversité des phages infectant *L. lactis*

Lors de mes travaux, dix différentes espèces de phages de *L. lactis* ont été décrites. De ces dix espèces, huit proviennent de l'ancienne classification puisque l'espèce P107 a disparu et l'espèce P335 englobe maintenant les espèces BK5-T, 1483 et T187 (chapitre 2). La disparition de représentants de l'espèce P107 est une perte inestimable au point de vue de l'étude de l'évolution et de la biodiversité des phages de lactocoques. Cependant, ce n'est pas la première fois qu'une espèce est perdue. Alors que des phages de la famille des *Myoviridae* avaient été observés dans les années 60, 70 et 80, aucun myovirus infectant *L. lactis* n'a été isolé depuis. Pourquoi n'isolons-nous plus de ces phages ? Les myovirus précédemment isolés possédaient-ils vraiment une queue contractile ou une queue élargie comme l'espèce P087 ? Est-ce que l'espèce de l'hôte bactérien a été clairement identifiée à ce moment ? Toutefois, ces questions demeureront sans réponse en raison de la perte de ces échantillons. Le dépôt d'un représentant pour chaque groupe de phages dans différentes

collections de microorganismes est donc essentiel si l'on veut garantir l'accès à ces modèles et la conservation de ces espèces.

La découverte de deux nouvelles espèces génétiquement (Q54 et 1706) distinctes en 15 ans démontrent que de nouvelles espèces de phages de *L. lactis* continuent d'émerger et que d'autres seront peut-être observées dans l'avenir. Malgré la grande biodiversité rencontrée chez les phages infectant *L. lactis*, seulement trois espèces sont retrouvées fréquemment dans l'industrie laitière (chapitre 3). Certaines espèces de phages n'ont été retrouvées que dans le lait cru. La biodiversité des phages est, à mon avis, largement sous-estimée. Les études se limitent souvent aux phages ayant un impact économique. En effet, il y a très peu d'études sur les phages présents dans le lait cru et dans les autres environnements colonisés par *Lactococcus lactis*. De plus, le nombre de souches différentes de *L. lactis* utilisées par l'industrie est limité comparativement à ce qui peut être retrouvé dans la nature. Finalement, les techniques de détection, d'isolement et de propagation des phages actuellement utilisées ne sont pas nécessairement efficaces avec toutes les espèces de phages de *L. lactis*.

7.1.1 L'espèce P335

En plus du nombre important d'espèces chez les phages de lactocoques, la diversité génétique des phages d'une même espèce peut être considérable comme le démontre l'exemple de l'espèce P335. En utilisant les critères définis par l'ICTV, cette espèce pourrait être divisée en plusieurs groupes. En effet, cette espèce contient à la fois des phages virulents ou tempérés qui utilisent des mécanismes d'encapsidation de l'ADN de type *pac* ou *cos*. Cependant, ces critères ne correspondent qu'à une petite partie du génome et les utiliser revient à ne pas tenir compte de l'évolution modulaire. Les résultats obtenus au chapitre 2 en plus des résultats de mes collègues sur l'émergence de phages mutants recombinants de cette espèce (Bouchard et Moineau, 2000; Labrie, communication personnelle) démontrent que, même si les phages de l'espèce P335 sont hétérogènes au niveau de leur séquence d'ADN, ils devraient être regroupés dans la même espèce car ces phages peuvent aisément s'échanger des modules, des gènes ou même des portions de gènes et générer un nouveau phage fonctionnel. Les génomes des phages de l'espèce P335 sont

l'exemple parfait d'une espèce polythétique, c'est-à-dire que cette espèce est composée d'isolats qui partagent certaines propriétés ou modules mais qu'aucun de ces modules n'est commun à tous. En utilisant comme critère la détection d'homologie ADN-ADN par des hybridations de type Southern, la nouvelle classification fait ressortir les possibilités d'échange génétique par recombinaison homologue.

Bien que l'espèce P335 corresponde à la définition d'une espèce polythétique, il serait cependant possible de faire des sous-groupes. Cependant, la composition de ces sous-groupes variera grandement selon le gène ou le groupe de gènes étudié. Par exemple, Brondsted et Hammer (2005) ont analysé onze protéines de phages de l'espèce P335 et de deux à cinq sous-groupes sont obtenus selon la protéine analysée. Mais aucun des sous-groupes décrits pour une protéine ne correspond à un autre sous-groupe obtenu lors de l'analyse d'une autre protéine. Cette classification en sous-groupe selon les modules revient à appliquer le concept de classification par modules proposé par Lawrence *et al.* (2004). Lorsque appliquée à l'intérieur d'une même espèce polythétique, la toile phylogénique qui apparaît nous donne de l'information précieuse sur les échanges génétiques qui régissent l'évolution d'une espèce sans devenir d'une complexité alarmante.

7.1.2 Réflexions sur la classification

Avec le nombre croissant de séquences génomiques disponibles, la classification actuelle des phages acceptée par l'ICTV montre de plus en plus de lacunes. Par exemple, le phage P22 de *Salmonella* (*Podoviridae*) est génétiquement très proche du coliphage HK97 (*Siphoviridae*), partageant même jusqu'à 20 % de ses gènes (Fauquet *et al.*, 2005). Pour ce qui est des genres, les règles impliquées dans leur attribution n'ont jamais été claires. L'utilisation fréquente de critères qui ne correspondent qu'à une très petite partie du génome (mécanisme d'encapsulation du génome, forme de la capsid, etc.) entre en contradiction avec la théorie modulaire d'évolution des phages. De plus, selon l'espèce bactérienne infectée, on ne s'entend pas sur les critères à utiliser rendant les comparaisons entre les genres très difficiles, voir impossible (Nelson, 2004). Il semble nécessaire de revoir en profondeur les critères pour définir ce taxon. Ces lacunes ont mené à trois

propositions différentes de classification basées sur la génomique des phages. Deux de ces propositions sont cependant incompatibles avec les résultats observés chez les lactocoques.

L'équipe de recherche du Dr Brüssow propose la création de nouveaux genres englobant des phages infectant des bactéries lactiques. Cette proposition sépare les phages en cinq groupes fondés sur l'organisation des gènes de la morphogénèse: les groupes c2, sk1, Sfi11, r1t et Sfi21 (Proux *et al.*, 2002). Cependant, cette classification divise les phages de l'espèce P335 de *L. lactis* entre trois genres distincts (Sfi11, Sfi21 et r1t). L'analyse du module des gènes de morphogénèse comme seul point de comparaison, bien que cela respecte l'idée d'une classification selon la morphologie proposée par l'ICTV, peut mener à une classification erronée si un phage échange ce module avec un autre phage ou un prophage sans qu'aucun autre gène ne soit échangé.

Une autre proposition de classification résulte en un arbre phylogénétique basé sur le protéome des phages (Figure 7.1). Bien que cette approche soit utile pour les phages qu'on ne peut pas propager ou pour les prophages défectifs, la morphologie des virions n'est pas considérée. Par exemple, les espèces 936 et c2 se retrouvent dans le même groupe alors qu'ils ont une capsid de forme différente. Quoique bien réussi chez les phages lambdoïdes, encore une fois, les membres de l'espèce P335 sont séparés en deux groupes distincts (Sfi21-like et TP901-like). Un arbre phylogénétique implique une provenance clonale de l'organisme étudié. Cependant, l'échange génétique par transfert horizontal est très fréquent chez les phages et, donc, incompatible avec une telle classification.

Comme le démontre ces deux exemples, la comparaison de génomes ne devrait pas constituer le seul critère lors de la taxonomie d'un bactériophage. L'utilisation d'une « toile » phylogénétique reflétant mieux la théorie d'évolution modulaire des phages semble plus appropriée (Lawrence *et al.*, 2004) mais le résultat donnerait une classification trop lourde pour être utile. De plus, les nouvelles propositions de classification n'illustrent pas clairement la biodiversité des phages infectant *Lactococcus lactis* car plusieurs des espèces actuellement décrites sont exclues en raison de l'absence de séquences nucléotidiques pour ces espèces.

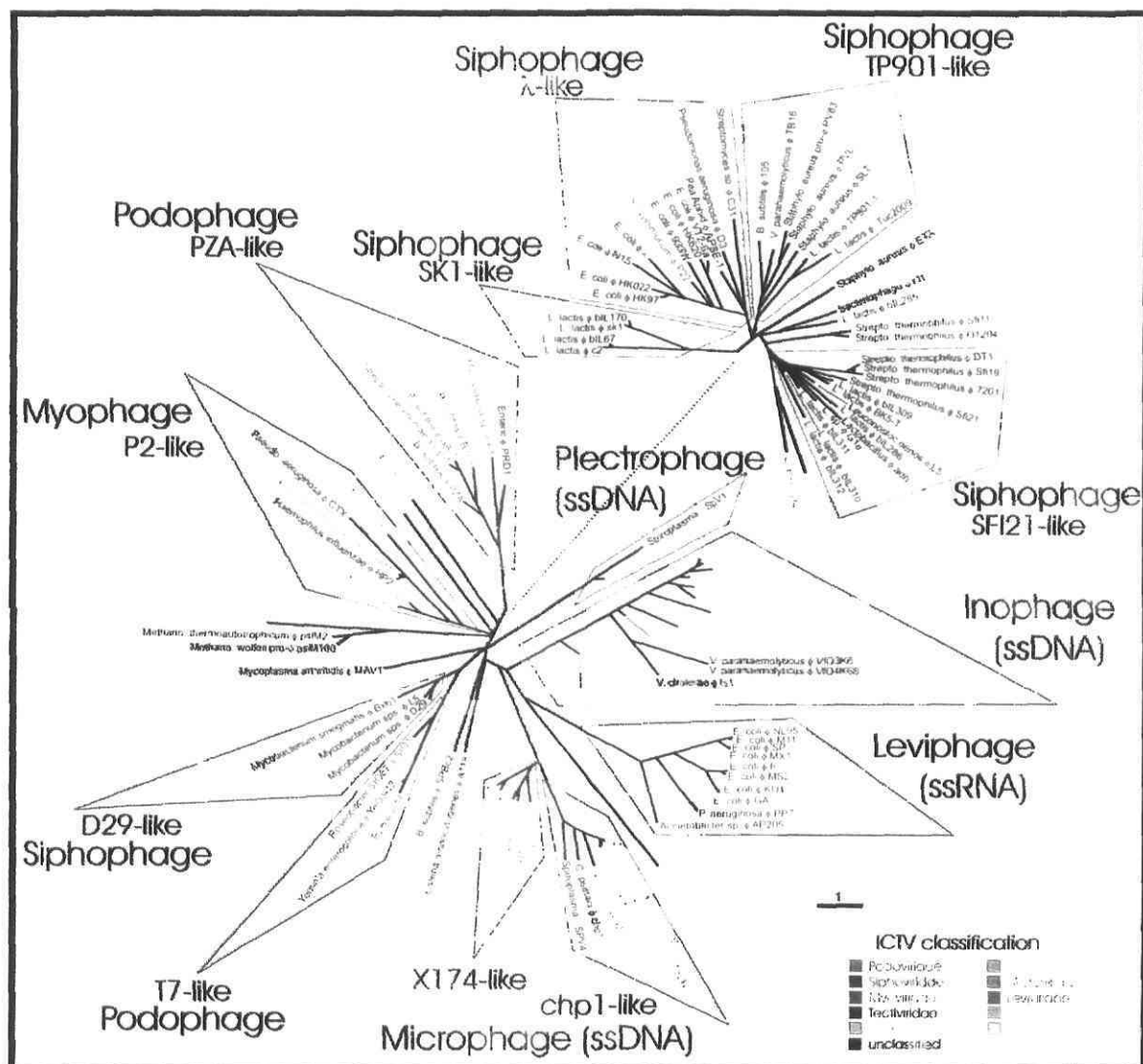


Figure 7.1: Arbre phylogénétique basé sur le protéome de 105 phages dont le génome est entièrement séquencés (Tirée intégralement de Rohwer *et al.*, 2002).

Les nouvelles propositions de genre devraient chercher à englober un plus grand nombre d'espèces plutôt que de les séparer en un plus grand nombre de groupes. Tout d'abord, le genre bactérien infecté ainsi que la niche écologique de cet hôte doivent être inclus afin de considérer les possibilités d'échange génétique lorsque deux phages partagent le même environnement. Les genres acceptés par l'ICTV regroupent déjà des phages infectant des genres bactériens apparentés. Comme la possibilité d'échange génétique entre deux phages infectant deux espèces apparentées qui partagent le même environnement est plus élevée, ce critère n'est pas contradictoire avec la théorie de l'évolution modulaire. Finalement, bien qu'il soit important de conserver un critère comme la morphologie ne serait-ce que pour

pouvoir établir des comparaisons avec la classification actuelle de l'ICTV, il serait tout de même important d'accorder une plus grande importance à la génomique de ces phages.

7.1.3 Le PCR multiplex

Lors de l'apparition de nouveaux phages dans une usine, il est important de les détecter rapidement afin d'ajuster la stratégie de rotation des ferments. Le PCR multiplex permet de classer rapidement un phage dans l'une des trois espèces prédominantes et est déjà adopté par plusieurs équipes de recherche. On peut maintenant classer un phage en 6 heures au lieu des 24 heures nécessaires à l'hybridation ADN-ADN de type Southern utilisée auparavant. Cependant, mes travaux ont démontré que cette méthode ne détectait pas tous les phages de l'espèce P335. Des amorces spécifiques au gène de la dUTPase ont été suggérées par le passé pour remplacer la cible actuelle. Néanmoins, le bactériophage 4268 de l'espèce P335 ne possède pas de gène codant pour une dUTPase. Ainsi, la diversité des membres de cette espèce est telle que deux cibles (ou plus) devront être utilisées afin d'identifier convenablement les phages P335 par PCR. Selon l'intérêt que l'on porte à un gène en particulier, il serait intéressant d'utiliser différents groupes d'amorces spécifiques à chacun des sous-groupes retrouvés pour ce gène. Par exemple, un laboratoire travaillant sur la morphogénèse d'un phage pourrait sélectionner les gènes codant pour la capsidie ou la queue alors qu'un autre laboratoire travaillant sur la lysogénie pourrait avoir avantage à sélectionner le gène codant pour l'intégrase.

Bien que parfois des phages des espèces prédominantes ne soient pas détectés, le PCR multiplex demeure une méthode qui permet de rapidement classer la vaste majorité des phages isolés en usine. Il est cependant important de conserver les méthodes classiques d'isolement d'ADN et d'analyse par Southern afin d'éviter la duplication des espèces comme ce fut le cas par le passé (par exemple, les espèces T187, 1483, BK5-T et P335) et de mieux comprendre l'évolution des phages infectant les lactocoques. La disponibilité de phages de référence pour chaque espèce lors d'hybridation ADN-ADN permettra d'identifier les espèces rares mais également d'observer, s'il y a lieu, des échanges inter-espèces (chapitre 2).

7.2 Les exopolysaccharides

7.2.1 Les EPS dans l'infection par les phages

Le rôle des polysaccharides dans l'infection par les phages chez les lactocoques demeure un grand paradoxe. Il semble que les EPS peuvent être efficace contre certains phages (Forde, 1999a ; 1999b ; 2003). Avant cette thèse, le seul phage caractérisé infectant ce type de souche (le phage KSY1) avait une morphologie unique. Cette morphologie unique laissait croire que les phages infectant ces souches appartenaient à une espèce particulière. Cependant, il a été démontré au chapitre 4 que les souches de lactocoques productrices d'EPS pouvaient être infectées par des phages lytiques de l'espèce la plus courante, soit l'espèce 936. Il serait intéressant de séquencer leur génome et de faire des analyses comparatives avec les génomes des autres phages de l'espèce 936 (chapitre 6) infectant des souches non-productrices d'EPS afin de vérifier s'il existe des différences fondamentales malgré leur appartenance à une même espèce. Par exemple, les protéines de liaison au récepteur de ces phages sont peut-être complètement différentes de celles observées chez les autres phages de cette espèce. De plus, le gène codant pour une polysaccharide dépolymérase pourrait être présent dans le génome sans que le phénotype ne soit observable sur Pétri.

7.2.2 La classification des opérons *eps*

Suite à la publication récente de la séquence nucléotidique de deux nouveaux opérons *eps*, les analyses génomiques comparatives ont été refaites afin de vérifier si les modifications proposées au chapitre 5 étaient toujours valides. Tous les fragments de restriction *Acyl* hybridant avec la sonde correspondant au gène *epsD* semblent jusqu'à présent ne correspondre qu'à l'opéron donc représentatif de la variabilité génétique à l'intérieur même de ces opérons. Cependant, on peut remarquer qu'un des sites de restriction entourant le fragment reconnu par la sonde sur le génome de SMQ-461 est situé dans un gène codant pour une transposase putative ne faisant pas partie intégrante de l'opéron *eps* (Figure 7.2). La méthode demeure toujours applicable car les fragments diffèrent tous d'un opéron à

l'autre et l'utilisation de plus d'une enzyme permet de contourner le problème rencontré avec *L. lactis* SMQ-461.

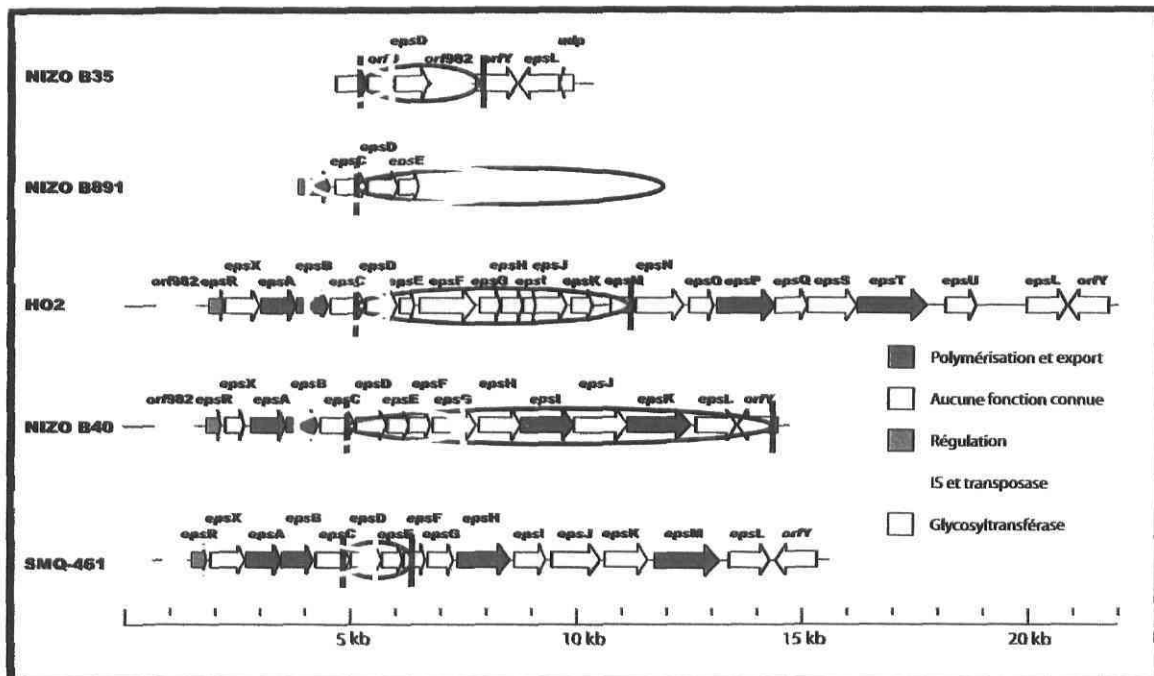


Figure 7.2: Représentation schématique des résultats obtenus avec le RFLP en comparaison avec les sites de restriction déterminés par analyse des séquences des nouveaux opérons *eps*. Les sites *AcylI* sont en bleu et les sites *HindIII* en jaune.

7.3 Espèce 936 : génomes et mécanismes de résistance

Bien que l'espèce 936 soit la plus fréquente à l'usine, seulement deux génomes complets étaient disponibles pour cette espèce. L'attrait pour les génomes de l'espèce P335, qui est beaucoup plus rare, s'explique par la diversité des génomes des phages de cette espèce. Les différences entre les phages de l'espèce P335 sont telles qu'il est pratiquement assuré de découvrir de nouveaux gènes ou modules. Les génomes des phages bil170 et sk1 (espèce 936) sont à 85% identique au niveau de leur séquence nucléotidique. Cette homogénéité génétique explique pourquoi cette espèce fut délaissée car leur analyse génétique apporte moins de nouveautés que l'analyse des séquences génomiques des phages de l'espèce P335, particulièrement hétérogène.

L'analyse des séquences du génome de trois autres phages de l'espèce 936 ainsi que l'étude de leur sensibilité à des mécanismes de résistance aux phages ont été effectuées en

collaboration avec une équipe irlandaise (Chapitre 6). Les phages analysés lors de cette partie du projet sont tous des phages utilisés lors de travaux ultérieurs sur les mécanismes de résistance. Les gènes médians et tardifs sont particulièrement conservés autant dans leur organisation que pour leur séquence nucléotidique. On remarque toutefois certaines différences. Notamment, le gène codant pour l'anti-récepteur diffère entre les phages ce qui peut facilement s'expliquer par le fait que ces cinq phages infectent deux souches distinctes. La région des gènes précoces montre une plus grande divergence. On remarque que l'organisation des gènes a été modifiée par des insertions, délétions et inversions de certaines régions. Cette variabilité pour les gènes précoces avait toutefois déjà été observée avec les phages sk1 et bIL170.

Malgré une grande similarité entre les phages de cette espèce, l'analyse d'un plus grand nombre de génomes permettra sans doute de mieux faire ressortir les différences génotypiques et phénotypiques entre chaque phage. Cependant, les cinq génomes disponibles attaquent uniquement deux souches de *L. lactis*. De plus grandes divergences seront probablement observées lorsque l'analyse génomique portera sur des phages attaquant des souches variées.

7.4 Conclusion et perspectives

Tout d'abord, la nouvelle classification des phages de lactocoques a permis la découverte d'une nouvelle espèce, l'espèce Q54, dont la séquence nucléotidique sera disponible sous peu. Des travaux sont également en cours pour obtenir la séquence nucléotidique complète du phage KSY1. Les génomes des phages de référence pour les quatre autres espèces (P087, 1706, 949 et 1358) seront bientôt séquencés afin d'apporter un éclairage nouveau sur la taxinomie. L'analyse des espèces non-prédominantes et des nouvelles espèces émergentes permettra peut-être de mieux comprendre l'origine et l'évolution des phages de *L. lactis*.

Ensuite, l'isolement et l'analyse des phages lors de ce projet ont permis l'élaboration de nouveaux ferments et de nouvelles stratégies de rotation. En effet, une meilleure connaissance des phages présents dans une usine permet d'éliminer l'utilisation successive

de deux souches sensibles aux mêmes phages ce qui évite d'atteindre un seuil critique dans le bassin de fermentation. De plus, la découverte de phages de l'espèce 936 infectant des souches de *L. lactis* productrices d'EPS démontre que les EPS ne représentent pas une barrière infranchissable pour les phages de cette espèce. La méthode de RFLP a permis de mettre en évidence un tout nouvel opéron qui fut par la suite analysé par une autre équipe de recherche (Dabour et LaPointe, 2005).

Bien que les espèces c2 et 936 semblent très homogènes sur le plan génétique, la comparaison de leur séquence nucléotidique aide à la compréhension de leur évolution et des mécanismes de résistance que possèdent les bactéries. En effet, en comparant la sensibilité aux mécanismes de résistance de différents phages de la même espèce, on remarque une certaine variabilité dans leur réponse à l'agent anti-viral. Comme les génomes à l'intérieur de ces espèces sont très peu diversifiés, il est plus facile d'identifier un gène divergent. Dans l'avenir, l'analyse d'un plus grand nombre de phages de la même espèce (séquence génomique et sensibilité aux différents mécanismes de résistance) aidera sûrement à la compréhension du mode d'action de certains mécanismes de résistance.

L'entrée continuelle de virions via le lait cru et l'absence de méthodes d'inactivation complète des phages à l'usine empêche leur élimination. L'objectif ultime pour l'industrie laitière est donc le contrôle des bactériophages et non leur éradication. Pour l'instant, la stratégie de rotation des ferments demeure la meilleure façon de gérer la menace des bactériophages. La connaissance de la biodiversité des phages, des récepteurs et des anti-récepteurs impliqués dans les interactions phage-hôte, du mode d'action des mécanismes de résistance et de l'évolution des phages permettra sans doute une gestion plus intelligente des stratégies anti-phages actuellement disponibles. Une meilleure utilisation de ces stratégies permettra peut-être un jour de diminuer le nombre de nouveaux phages émergents dans les usines. Plusieurs travaux seront encore nécessaires afin d'en arriver à un contrôle efficace et durable des phages de l'industrie.

Bibliographie

1. **Ackermann, H.-W.** 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol.* **146**:843-857.
2. **Ackermann, H.-W.** 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* **154**:245-251.
3. **Ackermann, H.-W.** 2005. Bacteriophage classification, p.67-89. *Dans* E. Kutter et A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl.
4. **Ackermann, H.-W., E. D. Cantor, A. W. Jarvis, J. Lembke et J. A. Mayo.** 1984. New species definitions in phages of gram-positive cocci. *Intervirology* **22**:181-190.
5. **Ackermann, H.-W., M. S. Dubow, A. W. Jarvis, L. A. Jones, V. N. Krylov, J. Maniloff, J. Rocourt, R. S. Safferman, J. Schneider, L. Seldin, T. Sozzi, P. R. Stewart, M. Werquin et L. Wünsche.** 1992. The species concept and its application to tailed phages. *Arch. Virol.* **124**:69-82.
6. **Akcelik, M., et N. Tunail.** 1992. A 30 kb cell wall protein produced by plasmid DNA which encodes inhibition of phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P25. *Milchwissenschaft* **47**:215-217.
7. **Anba, J., E. Bidnenko, A. Hillier, D. Ehrlich et M. C. Chopin.** 1995. Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. *J. Bacteriol.* **177**:3818-3823.
8. **Atanasiu, C., T. J. Su, S. S. Sturrock et D. T. Dryden.** 2002. Interaction of the *ocr* gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with *EcoKI* restriction/modification enzyme. *Nucleic Acids Res.* **30**:3936-3944.
9. **Attridge, S. R., A. Fazeli, P. A. Manning et U. H. Strocher.** 2001. Isolation and characterization of bacteriophage-resistant mutants of *Vibrio cholerae* O139. *Microb. Pathog.* **30**:237-246.
10. **Barakat, R. K., M. W. Griffiths et L. J. Harris.** 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* **62**:83-94.
11. **Bernheimer, H. P., et J. G. Tiraby.** 1976. Inhibition of phage infection by pneumococcus capsule. *Virology* **73**:308-309.
12. **Bidnenko, E., M.-C. Chopin, S. D. Ehrlich et J. Anba.** 2002. *Lactococcus lactis* *AbiD1* abortive infection efficiency is drastically increased by a phage protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**:283-287.
13. **Bissonnette, F., S. Labrie, H. Deveau, M. Lamoureux et S. Moineau.** 2000. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *J. Dairy. Sci.* **83**:620-627.
14. **Black, L. W.** 1989. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**:267-292.

15. **Blatny, J. M., L. Godager, M. Lunde et I. F. Nes.** 2004. Complete genome sequence of the *Lactococcus lactis* temperate phage phiLC3: comparative analysis of phiLC3 and its relatives in lactococci and streptococci. *Virology* **318**:231-244.
16. **Bouchard, J. D., E. Dion, F. Bissonnette et S. Moineau.** 2002. Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism AbiT from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **184**:6325-6332.
17. **Bouchard, J. D., et S. Moineau.** 2000. Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology* **270**:65-75.
18. **Boyce, J. D., B. E. Davidson et A. J. Hillier.** 1995. Sequence analysis of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T and demonstration that the phage DNA has cohesive ends. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4089-4098.
19. **Braun, V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis et M. Teuber.** 1989. Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2551-2560.
20. **Broadbent, J. R., D. J. McMahon, D. L. Welker, C. J. Oberg et S. Moineau.** 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Dairy Sci.* **86**:407-423.
21. **Brøndsted, L., et K. Hammer.** 2005. Phages of *Lactococcus lactis*, p.570-590. *Dans R. L. Calendar (ed.), The Bacteriophages*, second edition. Oxford University Press. Oxford.
22. **Brøndsted, L., S. Østergaard, M. Pedersen, K. Hammer et F. K. Vogensen.** 2001. Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology* **283**:93-109.
23. **Brüssow, H.** 2001. Phages of dairy bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:283-303.
24. **Canchaya, C, G. Fournous et H. Brüssow.** 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* **53**:9-18.
25. **Casjens, S. R.** 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.* **49**:277-300.
26. **Casjens, S. R.** 2005. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:451-458.
27. **Cerning, J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**:113-130.
28. **Cerning, J.** 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* **75**:463-472.
29. **Champagne, C. P.** 1998. Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Edisem, Saint-Hyacinthe, Québec.
30. **Chandry, P. S., B. E. Davidson et A. J. Hillier.** 1994a. Temporal transcription map of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Microbiology* **140**:2251-2261.
31. **Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson et A. J. Hillier.** 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* **26**:49-64.
32. **Chandry, P. S., S. C. Moore, B. E. Davidson et A. J. Hillier.** 1994b. Analysis of the *cos* region of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Gene* **138**:123-126.

33. **Chopin, A., A. Bolotin, A. Sorokin, S. D. Ehrlich et M. Chopin.** 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.* **29**:644-651.
34. **Chopin, M.-C., A. Chopin et E. Bidnenko.** 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:473-479.
35. **Clarke, B. R., F. Esumeh, et I. S. Roberts.** 2000. Cloning, expression, and purification of the K5 capsular polysaccharide lyase (*KflA*) from coliphage K5A: evidence for two distinct K5 lyase enzymes. *J. Bacteriol.* **182**:3761-3766.
36. **Cluzel, P. J., A. Chopin, S. D. Ehrlich et M. C. Chopin.** 1991. Phage abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, expression of which is mediated by an Iso-ISS1 element. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3547-3551.
37. **Coffey, A., et R. P. Ross.** 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:303-321.
38. **Coffey, A., D. Stokes, G. F. Fitzgerald et R. P. Ross.** 2001. Traditional and molecular approaches to improving bacteriophage resistance of Cheddar and Mozzarella cheese starters. *Irish J. Agr. Food Res.* **40**:239-270.
39. **Coffey, A. G., G. F. Fitzgerald et C. Daly.** 1991. Cloning and characterization of the determinant for abortive infection of bacteriophage from lactococcal plasmid pCI829. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1355-1362.
40. **Crutz-Le-Coq, A. M., B. Cesselin, J. Commissaire et J. Anba.** 2002. Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. *Microbiology* **148**:985-1001.
41. **Dabour, N., et G. LaPointe.** 2005. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7414-7425.
42. **Dai, G., P. Su, G. E. Allison, B. L. Geller, P. Zhu, W. S. Kim et N. W. Dunn.** 2001. Molecular characterization of a new abortive infection system (AbiU) from *Lactococcus lactis* LL51-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5225-5232.
43. **Deng, Y. M., M. L. Harvey, C. Q. Liu et N. W. Dunn.** 1997. A novel plasmid-encoded phage abortive infection system from *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:149-154.
44. **Deng, Y. M., C. Q. Liu et N. W. Dunn.** 1999. Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive infection system, AbiL, from *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* **67**:135-149.
45. **De Vos, W. M., H. M. Underwood et F. L. Davies.** 1984. Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:175-178.
46. **De Vuyst, L., et B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:153-177.
47. **Defives, C., M. Werquin, P. Mary et J. P. Hornez.** 1996. Roles of exopolysaccharides and lipopolysaccharides in the adsorption of the *Siphovirus* phage NM8 to *Rhizobium meliloti* M11S cells. *Curr. Microbiol.* **33**:371-376.
48. **Desiere, F., S. Lucchini, C. Canchaya, M. Ventura et H. Brüssow.** 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:73-91.

49. **Djordjevic, G. M., et T. R. Klaenhammer.** 1997. Bacteriophage-triggered defence systems: phage adaptation and design improvements. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4370-4376.
50. **Djordjevic, G. M., D. J. O'Sullivan, S. A. Walker, M. A. Conkling et T. R. Klaenhammer.** 1997. A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* **179**:6741-6748.
53. **Domingues, S., A. Chopin, S. D. Ehrlich et M.-C. Chopin.** 2004a. A phage protein confers resistance to the lactococcal abortive infection mechanism AbiP. *J. Bacteriol.* **186**:3278-3281.
54. **Domingues, S., A. Chopin, S. D. Ehrlich et M.-C. Chopin.** 2004b. The lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phage DNA replication and temporal transcription switch. *J. Bacteriol.* **186**:713-721.
55. **Duplessis, M., et S. Moineau.** 2001. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **41**:325-336.
56. **Dupont, K., T. Janzen, F. K. Vogensen, J. Josephsen et B. Stuer-Lauridsen.** 2004b. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5825-5832.
57. **Dupont, K., F. K. Vogensen, H. Neve, J. Bresciani et J. Josephsen.** 2004a. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5818-5824.
58. **Durmaz, E., D. L. Higgins et T. R. Klaenhammer.** 1992. Molecular characterization of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ME2. *J. Bacteriol.* **174**:7463-7469.
59. **Durmaz, E., et T. R. Klaenhammer.** 2000. Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:895-903.
60. **Elliott, J. A., M. D. Collins, N. E. Pigott et R. R. Facklam.** 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2731-2734.
61. **Elliott J. A. et R. R. Facklam.** 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1296-1298.
62. **Emond, E., E. Dion, S. A. Walker, E.R. Vedamuthu, J.K. Kondo et S. Moineau.** 1998. AbiQ, an abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4748-4756.
63. **Emond, E., B. J. Holler, I. Boucher, P. A. Vandenberg, E. R. Vedamuthu, J. K. Kondo et S. Moineau.** 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism AbiK from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1274-1283.
64. **Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger et L. A. Ball.** 2005. Virus taxonomy: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. 1259 pages. Elsevier Academic Press, San Diego, États-Unis.
65. **Fefer, J. J., K. R. Ratzan, S. E. Sharp et E. Saiz.** 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**:127-130.

66. **Forde, A., et G. F. Fitzgerald.** 1999a. Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *Int. Dairy J.* **9**:465-472.
67. **Forde, A., et G. F. Fitzgerald.** 1999b. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:89-113.
68. **Forde, A., et G. F. Fitzgerald.** 2003. Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid* **49**:130-142.
69. **Fortier, L.-C., J. D. Bouchard et S. Moineau.** 2005. Expression and site-directed mutagenesis of the lactococcal abortive phage infection protein AbiK. *J. Bacteriol.* **187**:3721-3730.
70. **Garvey, P., G.F. Fitzgerald et C. Hill.** 1995. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. *Appl Environ Microbiol.* **61**:4321-4328.
71. **Garvey, P., C. Hill et G. F. Fitzgerald.** 1996. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:676-679.
72. **Gaussier, H., Q. Yang et C. E. Catalano.** 2006. Building a virus from scratch: assembly of an infectious virus using purified components in a rigorously defined biochemical assay system. *J. Mol. Biol.* **357**:1154-1166.
73. **Geller, B. L., R. G. Ivey, J. E. Trempey et B. Hettinger-Smith.** 1993. Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* **175**:5510-5519.
74. **Geller, B. L., H. T. Ngo, D. T. Mooney, P. Su et N. Dunn.** 2005. Lactococcal 936-species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* **88**:900-907.
75. **Gopal, P. K., et V. L. Crow.** 1993. Characterization of loosely associated material from the cell surface of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8 and its phage-resistant variant strain 398. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3177-3182.
76. **Gruter, M., B. R. Leeflang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, et J. F. G. Vliegenthart.** 1992. Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carb. Res.* **231**:273-291.
77. **Guttman, B., R. Raya et E. Kutter.** 2005. Basic phage biology, p.29-66. *Dans E. Kutter et A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: biology and applications.* CRC Press, Boca Raton, Fl.
78. **Hanfling, P., S. A. Shashkov, B. Jann et K. Jann.** 1996. Analysis of the enzymatic cleavage (beta elimination) of the capsular K5 polysaccharide of *Escherichia coli* by the K5-specific coliphage: reexamination. *J. Bacteriol.* **178**:4747-4750.
79. **Häring, M., X. Peng, K. Brugger, R. Rachel, K. O. Stetter, R. A. Garrett et D. Prangishvili.** 2004. Morphology and genome organization of the virus PSV of the hyperthermophilic archaeal genera *Pyrobaculum* and *Thermoproteus*: a novel virus family, the *Globuloviridae*. *Virology* **323**:233-242.
80. **Häring, M., R. Rachel, X. Peng, R. A. Garrett et D. Prangishvili.** 2005. Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, *Acidianus* bottle-shaped virus, from a new family, the *Ampullaviridae*. *J. Virol.* **79**:9904-9911.

81. **Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford et G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**:2192-2197.
82. **Hill, C., L. A. Miller et T. R. Klaenhammer.** 1990. Cloning, expression, and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **172**:6419-6426.
83. **Hill, C., L. A. Miller et T. R. Klaenhammer.** 1991. *In vivo* genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *J. Bacteriol.* **173**:4363-4370.
84. **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9^{ème} édition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, États-Unis.
85. **Hughes, K. A., I. W. Sutherland et M. V. Jones.** 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* **144**:3039-3047.
86. **Jarvis, A. W.** 1984. Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:343-349.
87. **Jarvis, A. W.** 1994. Relationships by DNA-DNA homology between lactococcal phages 7-9, P335 and New Zealand lactococcal phages. *Int. Dairy Journal.* **5**:355-366.
88. **Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin et M. Teuber.** 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* **32**:2-9.
89. **Johansen, A. H., L. Brondsted et K. Hammer.** 2003 Identification of operator sites of the CI repressor of phage TP901-1: evolutionary link to other phages. *Virology* **311**:144-156.
90. **Josephsen, J., et H. Neve.** 2004. Bacteriophage et antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. p.295-350. *Dans* S. Salminen, A. Von Wright et A. Ouwehand (éd.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Third edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc., New York, États-Unis.
91. **Katsura, I.** 1990. Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails. *Adv. Biophys.* **26**:1-18.
92. **Kleerebezem, M., R. van Kranenburg, R. Tuinier, I. C. Boels, P. Zoon, E. Looijesteijn, J. Hugenholtz et W. M. de Vos.** 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:357-365.
93. **Kotsonis, S. E.** 1999. Detection and characterization of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis*. Thèse. University of Melbourne, Australia.
94. **Kutter, E., R. Raya et K. Carlson.** 2005. Molecular mechanisms of phage infection, p.165-222. *Dans* E. Kutter et A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl.
95. **Labrie, S.** 2004. Études des bacteriophages de *Lactococcus lactis*: isolement, détection et génomique. Thèse. Université Laval, Québec, Canada.
96. **Labrie, S., et S. Moineau.** 2002. Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. *Virology* **296**:308-320.

97. **Labrie, S., N. Vukov, M. J. Loessner et S. Moineau.** 2004. Distribution and composition of the lysis cassette of *Lactococcus lactis* phages and functional analysis of bacteriophage ul36 holin. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**:37-43.
98. **Lawrence, J. G., G. F. Hatfull et R. W. Hendrix.** 2002. Imbroglions of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* **184**:4891-4905.
99. **Ledeboer, A. M., S. Bezemer, J. J. de Haard, I. M. Schaffers, C. T. Verrips, C. van Vliet, E. M. Dusterhoft, P. Zoon, S. Moineau et L. G. Frenken.** 2002. Preventing phage lysis of *Lactococcus lactis* in cheese production using a neutralizing heavy-chain antibody fragment from llama. *J. Dairy Sci.* **85**:1376-1382.
100. **Loessner, M. J.** 2005. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:480-487.
101. **Looijesteijn, P. J., L. Trapet, E. de Vries, T. Abee et J. Hugenholtz.** 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Sci.* **64**:71-80.
102. **Lubbers, M. W., L. J. Ward, T. P. Beresford, B. D. Jarvis et A. W. Jarvis.** 1994. Sequencing and analysis of the *cos* region of the lactococcal bacteriophage c2. *Mol. Gen. Genet.* **245**:160-166.
103. **Lucey, M., C. Daly et G. F. Fitzgerald.** 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2137-2143.
104. **Maniloff, J., et H.-W. Ackermann.** 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order *Caudovirales*. *Arch. Virol.* **143**:2051-2063.
105. **McGovern, P. E., J. Zhang, J. Tang, Z. Zhang, G. R. Hall, R. A. Moreau, A. Nunez, E. D. Butrym, M. P. Richards, C. S. Wang, G. Cheng, Z. Zhao et C. Wang.** 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**: 17593-19598.
106. **McGrath, S., G. F. Fitzgerald et D. van Sinderen.** 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **43**:509-520.
107. **McGrath, S., J. F. Seegers, G. F. Fitzgerald et D. van Sinderen.** 1999. Molecular characterization of a phage-encoded resistance system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1891-1899.
108. **McLandsborough, L. A., K. M. Kolaetis, T. Requena et L. L. McKay.** 1995. Cloning and characterization of the abortive infection genetic determinant *abiD* isolated from pBF61 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR5. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2023-2026.
109. **Moineau, S.** 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:377-382.
110. **Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu et P. A. Vanderbergh.** 1996. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *J. Dairy Sci.* **79**:2104-2111.
111. **Moineau, S., et C. Lévesque.** 2005. Control of bacteriophages in industrial fermentation, p. 286-296. *Dans* E. Kutter et A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl.

112. **Moineau, S., J. Fortier, H.-W. Ackermann et S. Pandian.** 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* **38**:875-882.
113. **Moineau, S., S. Pandian et T. R. Klaenhammer.** 1993. Restriction/Modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:197-202.
114. **Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu et P. A. Vandenberg.** 1995. Cloning and sequencing of *LlaDCHI* restriction/modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae DpnII* system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2193-202.
115. **Molineux, I. J.** 2006. Fifty-three years since Hershey and Chase; much ado about pressure but which pressure is it? *Virology* **344**:221-229.
116. **Monteville, M. R., B. Ardestani et B. L. Geller.** 1994. Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3204-3211.
117. **Nakajima, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa et S. Adachi.** 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy Sci.* **73**:1472-1477.
118. **Nelson, D.** 2004. Phage taxonomy: we agree to disagree. *J. Bacteriol.* **186**:7029-7031.
119. **O'Connor, L., A. Coffey, C. Daly et G. F. Fitzgerald.** 1996. AbiG, a genotypically novel abortive infection mechanism encoded by plasmid pCI750 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3075-3082.
120. **O'Driscoll, J., F. Glynn, O. Cahalane, M. O'Connell-Motherway, G. F. Fitzgerald et D. van Sinderen.** 2004. Lactococcal plasmid pNP40 encodes a novel, temperature-sensitive restriction-modification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5546-5556.
121. **O'Sullivan, D. J., C. Hill et T. R. Klaenhammer.** 1993. Effect of increasing the copy number of bacteriophage origins of replication in *trans* on incoming phage proliferation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2449-2456.
122. **Parreira, R., S. D. Ehrlich et M.-C. Chopin.** 1996a. Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. *Mol. Microbiol.* **19**:221-230.
123. **Parreira, R., R. Valyasevi, A. L. Lerayer, S. D. Ehrlich et M. C. Chopin.** 1996b. Gene organization and transcription of a late-expressed region of a *Lactococcus lactis* phage. *J. Bacteriol.* **178**:6158-6165.
124. **Pedersen, M., S. Østergaard, J. Bresciani et F. K. Vogensen.** 2000. Mutational analysis of two structural genes of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 involved in tail length determination and baseplate assembly. *Virology* **276**:315-328.
125. **Perrin, R., P. Billard et C. Branlant.** 1997. Comparative analysis of the genomic DNA terminal regions of the lactococcal bacteriophages from species c2. *Res. Microbiol.* **148**:573-583.

126. **Prevots, F., M. Daloyau, O. Bonin, X. Dumont et S. Tolou.** 1996. Cloning and sequencing of the novel abortive infection gene *abiH* of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S94. FEMS Microbiol. Lett. **142**:295-299.
127. **Prevots, F. et P. Ritzenthaler.** 1998. Complete sequence of the new lactococcal abortive phage resistance gene *abiO*. J. Dairy Sci. **81**:1483-1485.
128. **Prevots, F., S. Tolou, B. Delpech, M. Kaghad et M. Daloyau.** 1998. Nucleotide sequence and analysis of the new chromosomal abortive infection gene *abiN* of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* S114. FEMS Microbiol Lett. **159**:331-336.
129. **Proux, C., D. van Sinderen, J. Suarez, P. Garcia, V. Ladero, G. F. Fitzgerald, F. Desiere et H. Brüssow.** 2002. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. J. Bacteriol. **184**:6026-6036.
130. **Pu, Z. Y., M. Dobos, G. K. Y. Limsowtin et I. B. Powell.** 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. J. Appl. Microbiol. **93**:353-361.
131. **Rachel, R., M. Bettstetter, B. P. Hedlund, M. Haring, A. Kessler, K. O. Stetter et D. Prangishvili.** 2002. Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. Arch. Virol. **147**:2419-2429.
132. **Rakonjac, J., P. W. O'Toole et M. Lubbers.** 2005. Isolation of lactococcal prolate phage-phage recombinants by an enrichment strategy reveals two novel host range determinants. J. Bacteriol. **187**:3110-3121.
133. **Rince, A., M. Tangney et G. F. Fitzgerald.** 2000. Identification of a DNA region from lactococcal phage *sk1* protecting phage 712 from the abortive infection mechanism *AbiF*. FEMS Microbiol Lett. **182**:185-191.
134. **Rohwer, F., et R. Edwards.** 2002. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. J. Bacteriol. **184**:4529-4235.
135. **Sakala, R. M., H. Hayashidani, Y. Kato, T. Hirata, Y. Makino, A. Fukushima, T. Yamada, C. Kaneuchi et M. Ogawa.** 2002. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. Int. J. Food Microbiol. **74**:87-99.
136. **Sakala, R. M., H. Hayashidani, Y. Kato, C. Kaneuchi et M. Ogawa.** 2002. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. J. Appl. Microbiol. **92**:173-179.
137. **Salama, M, W. Sandine et S. Giovannoni.** 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:1313-1318.
138. **Sao-Jose, C., C. Baptista et M. A. Santos.** 2004. *Bacillus subtilis* operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1. J. Bacteriol. **186**:8337-8346.
139. **Sao-Jose, C., S. Lhuillier, R. Lurz, R. Melki, J. Lepault, M. A. Santos et P. Tavares.** 2006. The ectodomain of the viral receptor YueB forms a fiber that triggers ejection of bacteriophage SPP1 DNA. J. Biol. Chem. **281**:11464-11470.
140. **Saxelin, M.-L., E.-L. Nurmiäho, M. P. Korhola et V. Sundman.** 1979. Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*. Can. J. Microbiol. **25**:1182-1187.

141. Schäfer, A., A. Geis, H. Neve et M. Teuber. 1991. Bacteriophage receptors of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1. FEMS Microbiol. Lett. **78**:69-74.
142. Schleifer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Balz, M. D. Collins et W. Fischer. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci into the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. **6**:183-195.
143. Scholl, D., S. Rogers, S. Adhya et C. R. Merrill. 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. J. Virol. **75**:2509-25015.
144. Schouler, C., S. D. Ehrlich et M.-C. Chopin. 1994. Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome. Microbiology **140**:3061-3069.
145. Seegers, J. F., S. McGrath, M. O'Connell-Motherway, E. K. Arendt, M. van de Guchte, M. Creaven, G. F. Fitzgerald et D. van Sinderen. 2004. Molecular and transcriptional analysis of the temperate lactococcal bacteriophage Tuc2009. Virology **329**:40-52.
146. Sharpe, E. 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. J. Soc. Dairy Technol. **32**:9-18.
147. Sijtsma, L., J. T. Wouters et K. J. Hellingwerf. 1990. Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110. J. Bacteriol. **172**:7126-7130.
148. Sozzi, T., J. M. Poulin, R. Maret et R. Pousaz. 1978. Isolation and some characteristics of phages of ropy strains of *Streptococcus lactis*. Milchwissenschaft **33**:349-352.
149. Stuer-Lauridsen, B., T. Janzen, J. Schnabl et E. Johansen. 2003. Identification of the host determinant of two prolate-headed phages infecting *Lactococcus lactis*. Virology **309**:10-17.
150. Sturino, J. M. et T. R. Klaenhammer. 2004. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. Adv. Appl. Microbiol. **56**:331-378.
151. Su, P., M. Harvey, H. J. Im et N. W. Dunn. 1997. Isolation, cloning and characterisation of the *abil* gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M138 encoding abortive phage infection. J. Biotechnol. **54**:95-104.
152. Summers, W.C. 2005. Bacteriophage research: early history, p.5-27. Dans E. Kutter et A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, Fl.
153. Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol. **39**:243-270.
154. Svenningsen, S. L., N. Costantino, D. L. Court et S. Adhya. 2005. On the role of Cro in lambda prophage induction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **102**:4465-4469.
155. Tock, M. R., et D. T. F. Dryden. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. Curr. Opin. Microbiol. **8**:466-472.
156. Twomey, D. P., P. J. De Urraza, L. L. McKay et D. J. O'Sullivan. 2000. Characterization of *AbiR*, a novel multicomponent abortive infection mechanism encoded by plasmid pKR223 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2647-51.

157. **Valyasevi, R., W. E. Sandine et B. L. Geller.** 1990. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1882-1889.
158. **Valyasevi, R., W. E. Sandine et B. L. Geller.** 1991. A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* **173**:6095-6100.
159. **Valyasevi, R., W. E. Sandine et B. L. Geller.** 1994. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J. Dairy Sci.* **77**:1-6.
160. **Van Casteren, W. H. M., C. Dijkema, H. A. Schols, G. Beldman et A. G. J. Voragen.** 2000a. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39. *Carb. Res.* **324**:170-181.
161. **Van Casteren, W. H. M., P. de Waard, C. Dijkema, H. A. Schols et A. G. J. Voragen.** 2000b. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carb. Res.* **327**:411-422.
162. **Van Kranenburg, R., H. R. Vos, I. I. van Swam, M. Kleerebezem et W. M. de Vos.** 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.* **181**:6347-6353.
163. **Van Kranenburg, R., J. D. Marugg, I. I. van Swam, N. J. Willem et W. M. de Vos.** 1997. Molecular characterization of plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **24**:387-397.
164. **Van Regenmortel, M. H. V., et B. W. Mahy.** 2004. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:8-13.
165. **Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle et R. B. Wickner.** 2000. Virus taxonomy: The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. 1024 pages. Academic Press, San Diego, États-Unis.
166. **van Sinderen, D., H. Karsens, J. Kok, P. Terpstra, M. H. Ruiters, G. Venema et A. Nauta.** 1996. Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* **19**:1343-1355.
167. **Vedamuthu, E.R., et J.M. Neville.** 1986. Involvement of plasmid in production of ropiness (mucoïdness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:677-682.
168. **Vegge, C. S., L. Brondsted, H. Neve, S. Mc Grath, D. van Sinderen et F. K. Vogensen.** 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol.* **187**:4187-4197.
169. **Weinbauer, M. G.** 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:127-181.
170. **Williams, A. M., J. L. Fryer et M. D. Collins.** 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**:109-113.
171. **Woese, C. R., et G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**:5088-5090.

172. **Yang, J. M., P. J. Deurraza, N. Matvienko et D. J. O'Sullivan.** 2006. Involvement of the LlaKR2I methylase in expression of the AbiR bacteriophage defense system in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* KR2. *J. Bacteriol.* **188**:1920-1928.