



HAL
open science

Intrication des signalisations opine, quorum-sensing et GABA chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*: conséquences sur la colonisation de l'hôte et la dissémination des gènes plasmidiques

Julien Lang

► **To cite this version:**

Julien Lang. Intrication des signalisations opine, quorum-sensing et GABA chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*: conséquences sur la colonisation de l'hôte et la dissémination des gènes plasmidiques. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112300 . tel-00924939

HAL Id: tel-00924939

<https://theses.hal.science/tel-00924939>

Submitted on 7 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VEGETAL

THESE

Présentée par

Julien Lang

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Discipline : Biologie

**Intrication des signalisations opine, quorum-
sensing et GABA chez le phytopathogène
Agrobacterium tumefaciens : conséquences sur la
colonisation de l'hôte et la dissémination des
gènes plasmidiques**

Soutenance le 6 décembre 2013, devant le jury composé de :

MM. JACQUES Marie-Agnès, Directrice de recherche - INRA

M. OTTEN Léon, Professeur - Université Strasbourg

MM. SHYKOFF Jacqui, Directrice de recherche - CNRS

MM. HOMMAIS Florence, Maître de conférences - Université Lyon 1

M. NOEL Laurent, Chargé de recherche - CNRS

M. FAURE Denis, Directeur de recherche - CNRS

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Je remercie :

Denis Faure et Yves Dessaux pour m'avoir fait confiance, donné l'opportunité de réaliser le travail présenté ici, et épaulé durant tout son long.

Les membres passés (Nicolas, Najat, Amélie, Mélanie, Sara) et présents (Catherine, Samuel, Yannick, Jérémy, Anthony, Slimane) de l'équipe pour leurs conseils scientifiques et pour avoir rendu mon cadre de travail si agréable au cours de ces trois années.

Les stagiaires (Pauline et Stéphanie) qui m'ont aidé à la paillasse et m'ont appris à développer mes qualités pédagogiques.

Tous les membres de l'ISV qui, à un moment ou un autre, ont facilité mon travail, en particulier le service administratif (Christine, Arthur, Karine, François, Jocelyne et Olivier), les informaticiens (Philippe et Célestin), le pôle Imagerie (Marie-Noëlle, Spencer, Mick, et Jessica) et les serristes (Amandine, Véronique et Guillaume).

L'ensemble du groupe thématique « Plantes & Microbes » (vous vous reconnaitrez...) pour nos rendez-vous bimensuels qui ont toujours été très intéressants et pour vos remarques toujours pertinentes.

Les membres de mon jury de thèse pour le temps qu'ils auront consacré à la lecture de ce manuscrit et pour les discussions enrichissantes qui en résulteront.

Armelle et Léonine qui sans vraiment comprendre ce que je faisais m'ont toujours soutenu dans mon travail et ont évité que la rédaction de ce manuscrit ne se transforme en pensum. Je vous aime.

Liste des abréviations

ACP	Acyl Carrier Protein
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADN-T	ADN-Transfert
ARN	Acide Ribonucléique
At	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GABA	Gamma-Amino Butyric Acid
GBL	Gamma-Butyro Lactone
GHB	Gamma-Hydroxy Butyrate
Kd	Constante de dissociation (dissociation constant)
Mb	Megabase
OC6HSL	3-oxo-hexanoylhomoserine lactone
OC8HSL	3-oxo-octanoylhomoserine lactone
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBP	Periplasmic Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTI	PAMPs-Triggered Immunity
QS	Quorum-Sensing
RNA	Ribonucleic Acid
SAM	S-adenosylmethionine
SSA	Succinic SemiAldehyde
TCA	Tricarboxylic Acid
T-DNA	Transfer-DNA
Ti	Tumor inducing
UFC	Unité formant colonie

Table des matières

Avant-propos	1
Chapitre I. Introduction générale	5
1. L'espèce <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
1.1. Taxinomie	5
1.2. Génome	6
2. Les interactions entre <i>A. tumefaciens</i> et plantes hôtes	8
2.1. Mécanismes infectieux	8
2.2. Réponses de défense de la plante	10
2.3. Développement tumoral	12
2.4. Symptômes de la maladie et gamme d'hôtes d' <i>A. tumefaciens</i>	15
2.5. Rôle des opines dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	16
2.5.1. Les différentes opines et la classification des plasmides Ti	16
2.5.2. Le concept d'opine ou comment <i>A. tumefaciens</i> transforme la tumeur végétale en niche écologique	19
2.5.3. Le quorum-sensing (QS)	20
<u>Article 1 (Review)</u>: Common and uncommon characteristics of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> quorum-sensing (version provisoire)	21
3. Bibliographie	43
Chapitre II. Fonctions régulées par les agrocinopines chez <i>A. tumefaciens</i> C58	55
1. Contexte scientifique	55
2. Présentation des travaux	56

3. Contributions	56
<u>Article 2</u> : Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the <i>Agrobacterium tumefaciens</i>-induced plant tumor (version soumise pour publication)	59
Chapitre III. Caractérisation des protéines de liaison à la nopaline et à l'octopine chez les souches C58 et B6 d'<i>A. tumefaciens</i>	85
1. Contexte scientifique	85
2. Présentation des travaux	86
3. Contributions	87
<u>Article 3</u> : The structural basis of the nopaline sensor NocT which contributes to the selective advantage of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 in plant tumors (version provisoire)	89
<u>Addendum</u>: Les caractéristiques structurales et phylogéniques de la protéine de liaison à l'octopine OccJ contribuent à l'avantage sélectif d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i> B6 au sein des tumeurs végétales	113
Chapitre IV. Régulation du QS d'<i>A. tumefaciens</i> par le GABA et la lactonase AttM	125
1. Contexte scientifique	125
2. Présentation des travaux	125
3. Contributions	126
<u>Article 4</u> : Plant GABA contents and bacterial lactonase AttM contribute to quorum-quenching in populations of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> colonizing <i>Arabidopsis thaliana</i> tumors	127
Chapitre V. Discussion générale et futures recherches	149
1. Intrication des signalisations opine, QS et GABA dans les interactions <i>A. tumefaciens</i>-plantes hôtes	150
1.1. La signalisation opine dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	150
1.1.1. Création des niches d'opines au sein des tumeurs	150

1.1.2. Capacité d' <i>A. tumefaciens</i> à importer les opines	152
1.1.3. Fonctions des opines dans la cellule bactérienne	153
1.2. Les signalisations GABA et QS dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	154
1.2.1. Fonctions du QS	154
1.2.2. Régulation du QS par le GABA	155
1.3. Rôle des plasmides At et Ti dans l'adaptation d' <i>A. tumefaciens</i> à l'environnement tumoral	157
1.3.1. Fonctions encodées par les plasmides Ti et At	158
1.3.2. Différences dans la signalisation de conjugaison des plasmides Ti et At	159
1.3.3. Relation entre plasmide Ti, plasmide At, hôte bactérien et hôte végétal	160
2. Analyse de nouveaux aspects des interactions entre <i>A. tumefaciens</i> et plantes hôtes	164
2.1. Présentation de la démarche expérimentale	164
2.2. Les glucosinolates dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	168
2.3. Les défensines dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	170
2.4. Les homologues de nodulines dans les interactions <i>A. tumefaciens</i> -plantes hôtes	171
3. Bibliographie	174

Avant-propos

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, l'agent étiologique de la galle du collet (tumeur végétale) (Fig. 1), est bien connue pour sa capacité à transformer certaines cellules eucaryotes avec une partie de son ADN génomique, l'ADN-T. Cette découverte faite il y a environ 50 ans a été à l'origine d'une avancée biotechnologique sans précédent permettant pour la première fois l'obtention d'organismes végétaux génétiquement modifiés. Depuis lors les premières étapes de l'interaction entre la bactérie et sa plante hôte ont été l'objet de nombreuses études visant à identifier les acteurs principaux impliqués dans ce processus de transfert génétique interrègne.

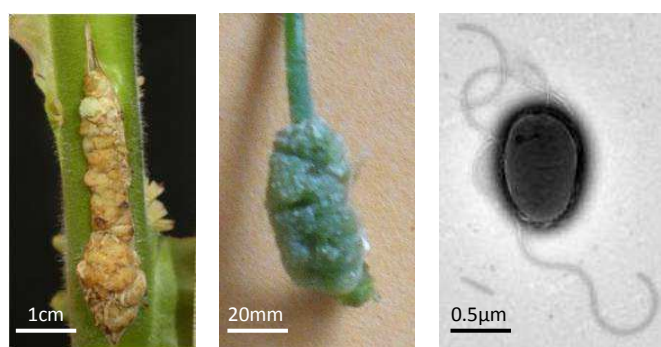


Figure 1: Tumeurs végétales et agent étiologique de la galle du collet. A-B Tumeurs végétales (3 semaines post-infection) induites sur une tige de tabac entre le premier et le deuxième nœud foliaire (A) et à la base d'une tige d'*Arabidopsis thaliana* (B). C Image d'une cellule d'*Agrobacterium tumefaciens* avec pili obtenue par microscopie électronique à transmission (J. Marion, Plate-forme Microscopie d'Imagif, Gif-sur-Yvette). Des barres d'échelle indicatives sont présentées.

D'autres caractéristiques originales de l'association entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes ont, elles aussi, été largement analysées. Il y a une trentaine d'années la mise en évidence chez la bactérie de gènes codant pour la synthèse et la dégradation de métabolites appelés opines conduisit à la formulation du concept d'opine stipulant que ces petites molécules, formées dans les cellules végétales transformées, sont des médiateurs clefs de l'interaction entre la bactérie et la plante hôte. Le concept d'opine postule notamment que les opines produites dans les tumeurs végétales confèrent un avantage sélectif aux populations colonisatrices d'*A. tumefaciens* capables de les assimiler. Complétant cette vue, il a été montré plus récemment que certaines opines, nommées opines conjugatives, jouaient un

rôle de signalisation important chez *A. tumefaciens* en initiant le processus de communication intercellulaire (quorum-sensing) qui contrôle la conjugaison ainsi que la réplication végétative du plasmide Ti.

En dépit (et peut-être en raison) de ces nombreux travaux et découvertes, *A. tumefaciens* continue d'être pour les scientifiques un organisme fascinant à étudier. Il est à noter qu'en 2012 dans le top 10 des bactéries phytopathogéniques les plus intéressantes publié par le journal « *Molecular Plant Pathology* », *A. tumefaciens* occupait la troisième position, non seulement parce qu'elle continuait d'être un outil puissant de transgénése végétale, mais également parce qu'elle représentait un excellent modèle pour déchiffrer les interactions entre bactéries et plantes.

Dans ce manuscrit de thèse, nous présenterons de nouveaux aspects des interactions entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes. Cinq grandes parties seront traitées.

La première sera une introduction générale sur *A. tumefaciens* et les interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte. Elle inclura une revue approfondie sur le quorum-sensing chez *A. tumefaciens*.

La deuxième partie sera constituée d'une analyse transcriptomique globale d'une lignée mutante d'*A. tumefaciens* qui mime les effets d'une exposition à une opine (les agrocinopines). Ce travail a notamment permis de démontrer la co-régulation des conjugaisons du plasmide Ti et du plasmide At d'*A. tumefaciens*.

La troisième partie analysera le rôle de deux senseurs d'opines (NocT : senseur de la nopaline et OccJ : senseur de l'octopine) dans la capacité de colonisation des tumeurs par *A. tumefaciens*. Nous avons ainsi pu expérimentalement démontrer que la capacité des bactéries à assimiler des opines leur conférait un avantage sélectif dans l'environnement tumoral. Ce travail a en outre bénéficié d'une collaboration avec une équipe de biologistes structuraux qui a obtenu les premières structures de senseurs d'opines en association avec leurs ligands.

La quatrième partie traitera de la régulation du quorum-sensing par le métabolite végétal GABA et la lactonase bactérienne AttM. Cette analyse s'appuiera sur des données transcriptomiques et métabolomiques ainsi que sur des expériences histologiques et des tests de conjugaison *in planta*.

Enfin dans la dernière partie, nous reprendrons et discuterons les principaux résultats de ma thèse. Nous les mettrons notamment en perspective avec des résultats récents de co-transcriptomes de tissus tumoraux et d'*A. tumefaciens*, en indiquant de quelle manière ces données neuves sont susceptibles d'élargir dans le futur notre compréhension des interactions entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes.

Chapitre I. Introduction générale

1. L'espèce *Agrobacterium tumefaciens*

1.1. Taxinomie

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont des alpha-Proteobactéries appartenant à la famille des Rhizobiacées. Trois classifications du genre ont été proposées. La première repose sur des tests de pathogénicité (Young, 2008). Le nom d'espèce *A. tumefaciens* a ainsi été attribué à toutes les bactéries pathogéniques induisant la galle du collet. Par-là *A. tumefaciens* se distingue d'*A. rubi* (induisant la galle du framboisier), d'*A. rhizogenes* (induisant un chevelu racinaire ou « hairy root »), d'*A. vitis* (induisant la galle de la vigne), d'*A. larrymoorei* (induisant la galle du figuier) et d'*A. radiobacter* (regroupant des souches

non-pathogéniques). Le genre *Agrobacterium* a aussi été divisé en quatre biovars, en fonction des propriétés biophysiques et physiologiques des différentes souches (Young, 2008). Cette classification ne recoupe pas nécessairement la classification en espèces. Le biovar 1 par exemple regroupe à la fois des souches d'*A.*

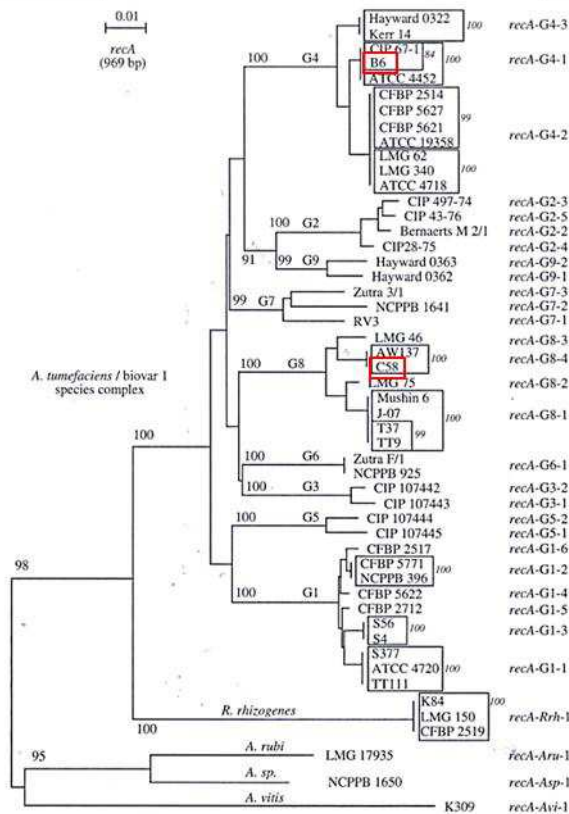


Figure 1: Répartition des souches d'*A. tumefaciens* en espèces génomiques. Arbre phylogénétique fondé sur les séquences du gène *recA*, mettant en évidence les 10 groupes génomiques distincts (tiré de Costechareyre *et al.*, 2010). Les souches typiques de laboratoire, C58 et B6, sont encadrées en rouge.

tumefaciens et d'*A. radiobacter*. Plus récemment, se basant sur des analyses de polymorphisme et de relations phylogénétiques, les souches d'*Agrobacterium* ont été redistribuées en différents groupes génomiques (Mougel et al., 2002, Costechareyre et al., 2010). Selon ce modèle *A. tumefaciens* constitue un complexe de dix espèces génomiques distinctes (G1 à G9, G13) et les souches typiques de laboratoire *A. tumefaciens* C58 et *A. tumefaciens* B6 appartiennent à deux espèces génomiques distinctes, G8 et G4 respectivement (Fig. 1). Des travaux ultérieurs ont abouti à l'identification de gènes spécifiques pour chacun des groupes génomiques définis et dans certains cas à la caractérisation de fonctions écologiques particulières. Pour ces raisons, il a été proposé que le groupe génomique G8 forme une espèce à part entière rebaptisée *Agrobacterium fabrum* (Lassalle et al., 2011).

1.2. Génome

Les génomes des différentes souches d'*A. tumefaciens* sont généralement composés de quatre réplicons : un chromosome circulaire d'environ 2.8 Mb, un chromosome linéaire d'environ 2 Mb et deux plasmides compatibles entre eux: le plasmide At d'environ 0.5 Mb et le plasmide Tumor-inducing (plasmide Ti) d'environ 0.2 Mb (Fig. 2). Aucun gène essentiel à la survie de la bactérie n'est présent sur aucun des deux plasmides. Plusieurs souches naturelles d'*A. tumefaciens*, dépourvues du plasmide At ou du plasmide Ti ou des deux réplicons, ont été isolées (Shams et al., 2012). Il existe également des protocoles de laboratoire pour débarrasser les souches d'*A. tumefaciens* de leurs plasmides (Uraji et al., 2001, Morton et al., 2013). Malgré son caractère accessoire pour la survie de la bactérie, le plasmide Ti est nécessaire au pouvoir pathogénique du micro-organisme. Le plasmide Ti contient notamment l'ADN-T qui est transféré dans la cellule végétale au cours de l'infection et les gènes *vir* codant pour la machinerie de transfert de l'ADN-T. Sont également présents sur le plasmide Ti, les opérons liés au catabolisme des opines ainsi que le régulon *tra*, contrôlé par les gènes *traI* et *traR* du quorum-sensing (QS), et qui permet la conjugaison du réplicon. Les différents plasmides Ti d'*A. tumefaciens* sont considérés comme des structures mosaïques incluant à la fois des régions homologues et des régions non-homologues (Otten et al., 1992). Par exemple les gènes *vir* et le système QS sont en général relativement bien

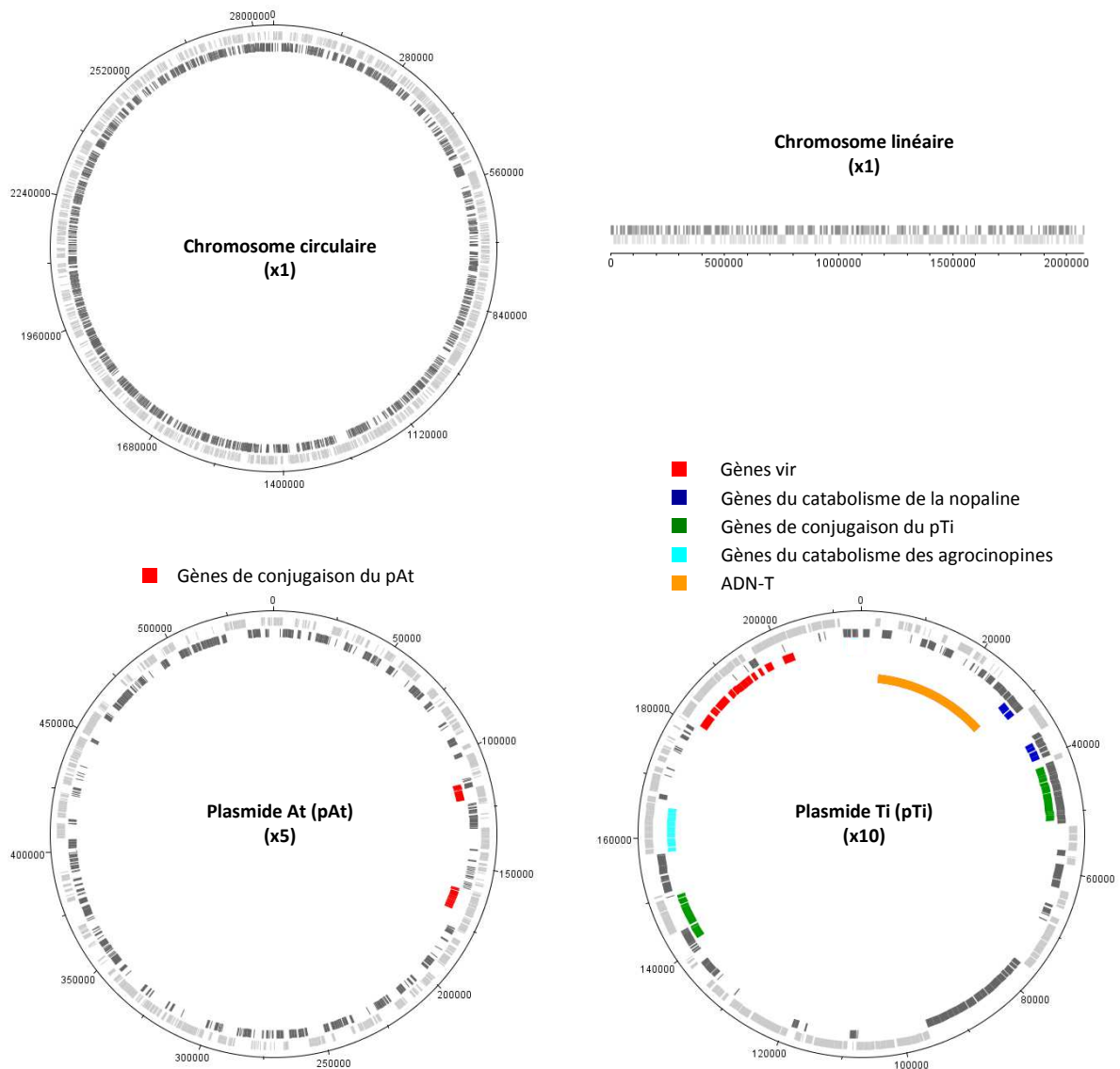


Figure 2: Génome d'*A. tumefaciens* C58. Représentation des 4 réplicons d'*A. tumefaciens* C58 réalisée avec le logiciel DNA plotter (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/circular/>). Les gènes en orientation *forward* sont représentés en gris clair tandis que ceux en orientation *reverse* sont en gris foncé. Les localisations de certains gènes et de l'ADN-T sont précisées en couleur. Entre parenthèses sont indiquées les échelles de représentation.

conservés entre différents plasmides Ti alors que les séquences de l'ADN-T et des opérons liés au catabolisme des opines peuvent, elles, présenter d'importantes divergences. Comparativement au plasmide Ti, peu de choses est connu sur le plasmide At. Plusieurs études tendent à soutenir l'hypothèse que le plasmide At a un impact positif sur la virulence mise en œuvre par le plasmide Ti, mais le sujet reste controversé (Nair et al., 2003, Matthyse et al., 2008). L'annotation du génome complet d'*A. tumefaciens* C58 (Goodner et

al., 2001, Wood et al., 2001) révèle que le plasmide At code pour de nombreux systèmes de transport et qu'il est enrichi en éléments transposables. Le plasmide At de C58 contient aussi des gènes conférant la capacité d'utiliser certaines molécules comme sources nutritives spécifiques, ce qui suggère que le réplicon est important pour l'adaptation de la bactérie à certaines niches écologiques, et notamment les tumeurs végétales. Enfin il a été montré que le plasmide At de C58 recelait tous les gènes nécessaires à sa propre conjugaison (Chen et al., 2002).

2. Les interactions entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes

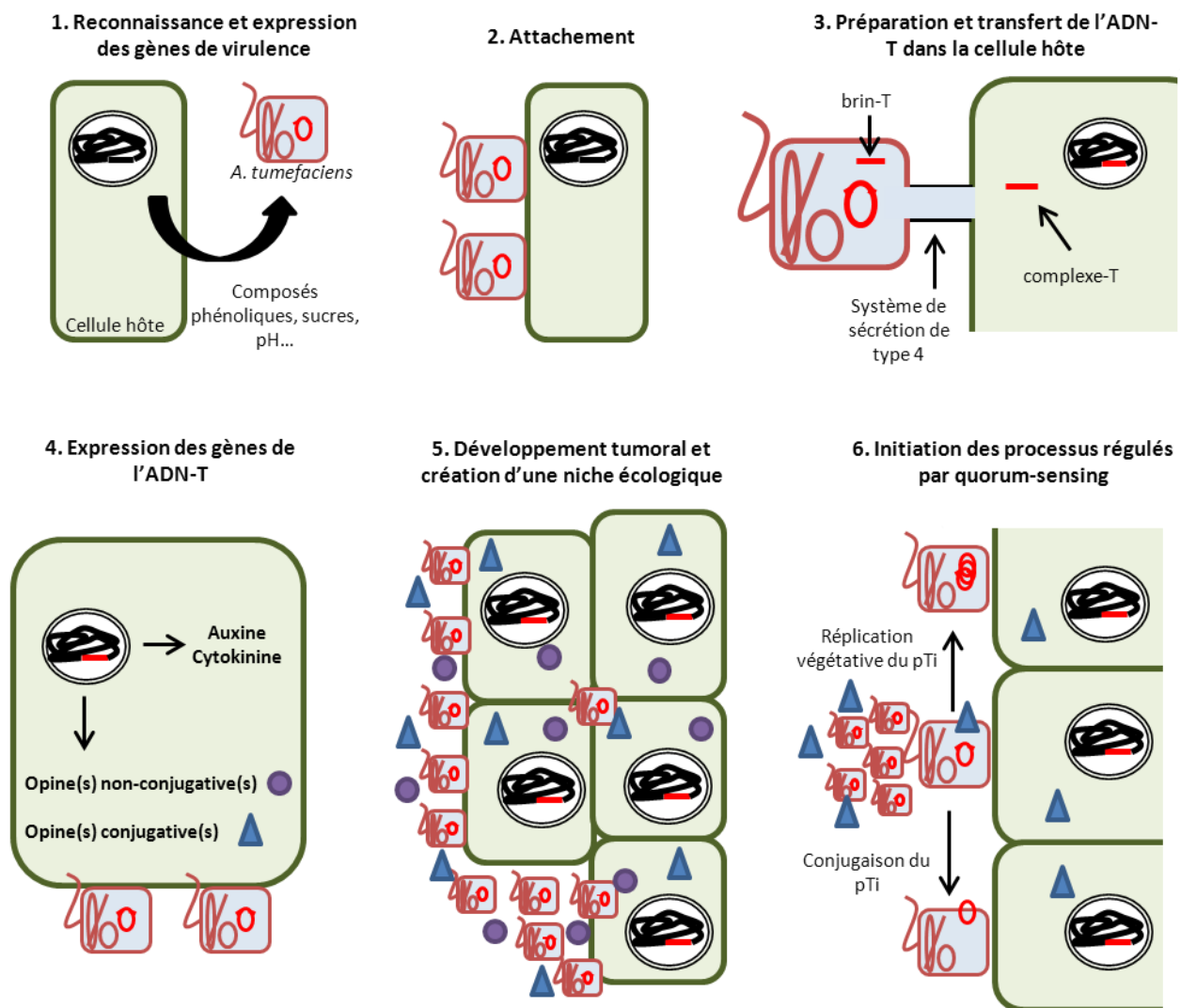
Sont présentées dans la figure 3 les différentes étapes importantes des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte. Chacune de ces étapes sera précisée dans la suite du texte.

2.1. Mécanismes infectieux

Le processus d'infection par *A. tumefaciens* comporte plusieurs stades : reconnaissance et expression des gènes *vir*, attachement à la cellule hôte, préparation et transfert de l'ADN-T, enfin intégration de l'ADN-T dans le génome hôte. Nous présenterons ici quelques aspects de chacun de ces mécanismes. Pour plus de précisions nous renvoyons le lecteur à deux revues récentes (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012).

Les gènes *virA* et *virG* codent pour un système de signalisation à deux composants qui peut être activé par différents composés phénoliques, certains sucres, un pH acide ou une faible concentration en phosphate. Les blessures des végétaux rassemblent certaines de ces conditions et constituent par conséquent des sites d'infection privilégiés. Une fois activé le système VirA/VirG induit l'expression des gènes *vir* qui sont généralement constitués de 5 opérons distincts : *virB*, *virC*, *virD*, *virE* et *virF* (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012).

L'attachement des cellules d'*A. tumefaciens* aux cellules de la plante hôte requiert différentes molécules. Chez la bactérie trois gènes chromosomiques ont été identifiés comme importants pour ce processus. Il s'agit de *chvA*, *chvB* et *pscA* qui sont impliqués dans la synthèse et/ou la localisation de beta-1,2 glucanes (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin,



Figures 3: Les différentes étapes des interactions entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes. Pour plus de détail se reporter au texte principal. pTi: plasmide Ti.

2012). Du côté des végétaux, plusieurs mutants résistants à l'infection d'*A. tumefaciens* ont été isolés. Ces mutants ont été nommés *rat* (pour *recalcitrant to Agrobacterium transformation*) et parmi eux on retrouve plusieurs mutants pour des protéines arabinogalactanes de la paroi cellulaire qui présentent des défauts d'attachement avec la bactérie pathogène (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012).

Avant d'être transféré, l'ADN-T est préparé sous forme d'une molécule à simple brin. Cette étape implique les deux nucléases VirD1 et VirD2. VirD2 reste par la suite fixée à l'extrémité 5' de l'ADN-T simple brin, ce qui facilite son transport, et le complexe nucléo-protéique ainsi formé est nommé brin-T (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012). La translocation du brin-T

est assurée par un système de sécrétion de type IV. Celui-ci est composé de trois unités (Christie, 2004, Zechner et al., 2012). La première, liée à la membrane cellulaire interne, regroupe des molécules ATPases (VirD4, VirB4 et VirB11) importantes pour la reconnaissance du brin-T et pour l'activation physique de son transfert. La seconde unité formée principalement des protéines VirB8, VirB9 et VirB10 constitue, au sein de l'espace périplasmique, le cœur du système de sécrétion. Enfin des multimères de VirB2 composent la troisième unité correspondante au pilus extracellulaire qui permet de pénétrer dans la cellule hôte.

Une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte, il est supposé que le brin-T s'associe avec les protéines effectrices VirE2 pour former le complexe-T. La présence de séquences de localisation nucléaire sur VirD2 et VirE2 facilite l'adressage du complexe-T vers le noyau de la cellule hôte. De plus VirE2 interagit avec la protéine végétale VIP1 qui, après phosphorylation, est, elle aussi, adressée vers le noyau (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012).

Dans le noyau, l'ADN-T s'intègre de façon aléatoire dans le génome de l'hôte, avec cependant une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine (Pitzschke and Hirt, 2010, Gelvin, 2012). Pour expliquer le mécanisme d'intégration, deux hypothèses, non forcément exclusives, sont envisageables (Tzfira et al., 2004). Dans la première l'ADN-T simple brin est directement inséré par recombinaison dans une région du génome végétal pour laquelle il présente une microhomologie. Dans la seconde le brin complémentaire de l'ADN-T est synthétisé et la molécule double-brin est insérée par un processus de cassure-religation. Cette dernière hypothèse a récemment été renforcée par de nouvelles données expérimentales (Liang and Tzfira, 2013).

2.2. Réponses de défense de la plante

Les premières études portant sur les réponses de défense des plantes à une attaque par *A. tumefaciens* suggéraient que ces réponses étaient totalement inhibées dès les premiers stades de l'infection (Veena et al., 2003, Ditt et al., 2005). Toutefois des travaux ultérieurs vinrent nuancer cette vue. Analysant le transcriptome de cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* exposées à *A. tumefaciens* pendant 48 heures, Ditt et al. (2006) montrèrent que les

expressions des gènes de défense pouvaient aussi bien être induites que réprimées. Dans le même esprit Lee et al. (2009) s'intéressèrent aux voies de défense contrôlées par les hormones chez les plantes. Ils démontrèrent notamment qu'après l'intégration de l'ADN-T dans le génome d'*A. thaliana*, les niveaux d'éthylène et d'acide salicylique dans les cellules transformées augmentaient de manière continue au cours du développement tumoral. Toutefois cette augmentation n'était pas corrélée avec l'activation des voies de signalisation habituelles de ces deux hormones. Ainsi même si la suraccumulation d'acide salicylique dans des plantes transgéniques pouvait causer une limitation du développement de la maladie induite par *A. tumefaciens*, ce processus de défense demeurait indépendant de l'induction des gènes de défense habituellement régulés par l'acide salicylique et n'impliquait pas la mise en place de SAR (*Systemic Acquired Resistance*). Un autre résultat marquant de cette étude était l'absence d'accumulation de jasmonate dans les tumeurs d'*A. thaliana*. Parallèlement les mécanismes d'ARN interférent ont été analysés dans les étapes précoces de l'interaction *A. tumefaciens*-plantes hôtes (Dunoyer et al., 2006). Il apparaît ainsi que la production de petits ARN interférent correspondant aux gènes de l'ADN-T est importante dans les tissus végétaux infectés mais que l'inhibition de cette production joue aussi un rôle crucial pour l'efficacité de transformation par l'ADN-T. Enfin la possibilité qu'*A. tumefaciens* induise chez la plante une réponse immunitaire de type PTI (*PAMPs-Triggered Immunity*) a été explorée. L'immunité de type PTI repose sur la capacité des plantes à reconnaître certains motifs moléculaires associés aux pathogènes. Elle met en jeu des récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*) composés d'un domaine extracellulaire LRR (*Leucine-Rich Repeat*) et d'un domaine intracellulaire de type kinase. Les flagellines bactériennes sont d'ordinaire de puissants éliciteurs de PTI chez les plantes mais de façon surprenante, et sûrement en raison de leurs propriétés conformationnelles particulières, les flagellines d'*A. tumefaciens* ne sont pas reconnues par les récepteurs PTI d'*A. thaliana*. En revanche les plantes possédant le récepteur EFR sont capables de percevoir le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu d'*A. tumefaciens* et d'enclencher en conséquence une cascade de défense aboutissant à une restriction de l'efficacité de transformation par l'ADN-T (Zipfel et al., 2006).

Pris collectivement, les résultats mentionnés ci-dessus tendent à décrire un processus phytopathogénique original au cours duquel les interactions entre *A. tumefaciens* et la

plante hôte conduisent à une certaine limitation des réponses de défense des végétaux, permettant ainsi une cohabitation relative des deux organismes au sein de la tumeur. Une enquête plus approfondie des réponses de défense de la plante devrait aider à préciser les caractéristiques de cette cohabitation.

2.3. Développement tumoral

Une fois intégrés dans le génome de la plante hôte, les gènes de l'ADN-T sont exprimés. Parmi ceux-ci se trouvent des gènes impliqués dans la biosynthèse des phytohormones auxine et cytokinine. Sur l'ADN-T de la souche *A. tumefaciens* C58, les gènes *iaaH* et *iaaM* codent respectivement pour une indole-acetamide hydrolase et une tryptophane 2-oxygénase qui contribuent tous deux à la production d'acide 3-indole-acétique, tandis que le gène *ipt* code pour une isopentényl transférase qui catalyse la synthèse d'une cytokinine (Britton et al., 2008). L'accumulation d'auxine et de cytokinine après transformation par l'ADN-T crée un déséquilibre hormonal qui conduit à une dédifférenciation cellulaire et au développement néoplasique d'un organe tumoral chez la plante (Veselov et al., 2003).

Une des caractéristiques les plus marquantes de ce processus est l'apparition au sein des tumeurs végétales d'un nouveau système vasculaire. Ce phénomène qui a été largement décrit chez l'espèce végétale *Ricinus communis* L. (Aloni et al., 1995) a aussi été mis en évidence dans notre laboratoire sur des tumeurs d'*A. thaliana* (Fig. 4). Dans ces tumeurs, les cellules du xylème tendent à se multiplier en formant des raies plus ou moins homogènes, alignées les unes à côté des autres ; elles créent ainsi un réseau annexe de circulation au sein des tumeurs végétales. Les cellules du phloème perdent quant à elles leur organisation primordiale. De plus il est possible d'observer entre les cellules du xylème et du phloème une zone cambiale apparemment active, composée de plusieurs rangées cellulaires. La néovascularisation est une étape critique de la genèse tumorale et plusieurs éléments indiquent que la molécule d'éthylène, dont la production est stimulée par les auxines et cytokinines, joue un rôle crucial à ce niveau (Ullrich and Aloni, 2000, Wachter et al., 2003).

Une autre hormone qui apparaît importante dans le développement tumoral est l'acide abscissique. En effet les tumeurs sont des structures en formation continue qui ne disposent pas par conséquent de la protection habituelle des tissus sains. Les tumeurs

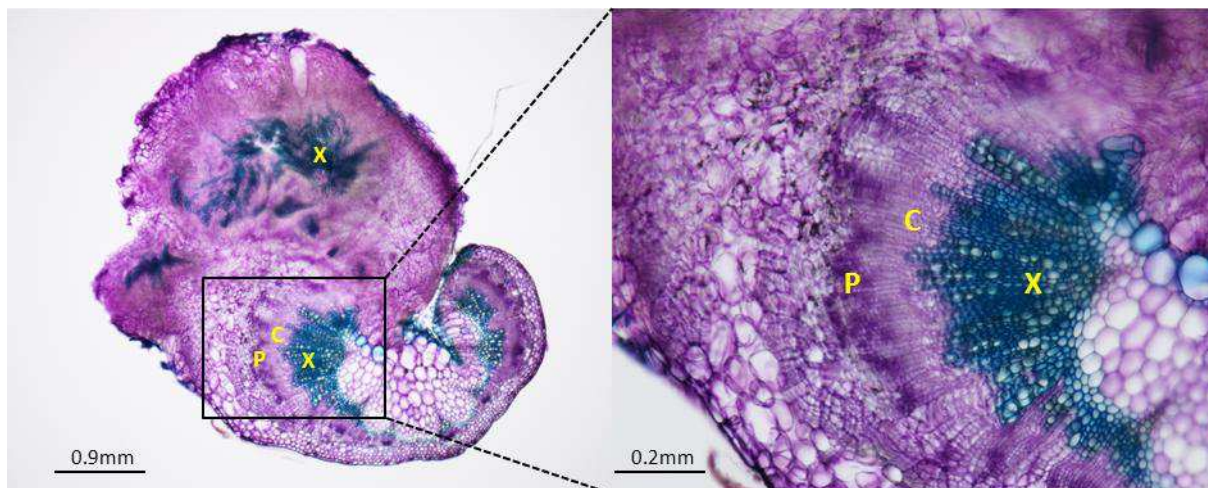


Figure 4: Vascularisation des tumeurs végétales. Sections transverses (80µm) de tumeurs d'*A. thaliana* (21 jours post-infection), colorées au bleu de toluidine et observées au microscope (Nikon AZ 100). Les tissus du xylème (X) sont en bleu clair et ceux du phloème (P) en violet foncé. Les tissus du cambium (C) sont en violet clair. Des barres d'échelle indicatives sont présentées.

montrent ainsi une évaporation marquée. Or il a été établi que l'acide abscissique qui s'accumule dans les tumeurs favorise la synthèse d'osmoprotecteurs et de subérine qui limitent les effets de ce stress hydrique (Efetova et al., 2007).

Par ailleurs, comme les niveaux de production d'hormones par les cellules végétales transformées sont des facteurs clefs du développement tumoral, la question de savoir si toutes les cellules d'une tumeur étaient porteuses de l'ADN-T a été l'objet de plusieurs études. Par l'analyse histologique, notamment dans des tumeurs de *Ricinus comunis* L., des zones d'expression d'un gène *GUS* inséré dans l'ADN-T d'une souche virulente d'*A. tumefaciens*, il a été montré que 25% seulement des cellules tumorales exprimaient le gène rapporteur (Rezmer et al., 1999). Utilisant la même méthode nous avons, nous aussi, examiné la proportion de cellules transformées dans des tumeurs d'*A. thaliana* et sommes arrivés aux mêmes constatations (Fig. 5). Seulement une partie des tissus tumoraux est porteuse de l'ADN-T bien que, globalement, le nombre de cellules transformées augmentent entre des tumeurs de 12 jours et des tumeurs de 21 jours. De plus, d'après ces expériences, nous n'avons pu ni identifier une zone privilégiée de transformation au sein des tumeurs, ni trouver de corrélation claire entre les zones transformées et la morphologie de la tumeur. Récemment une approche par hybridation *in situ* révéla que plus de 95% des cellules d'une tumeur mature d'*A. thaliana* contenait le transcrite du gène *nos* (*nopaline synthase*) de l'ADN-T (Deeken et al., 2006). De fait ce résultat suggère que, même si toutes les cellules d'une

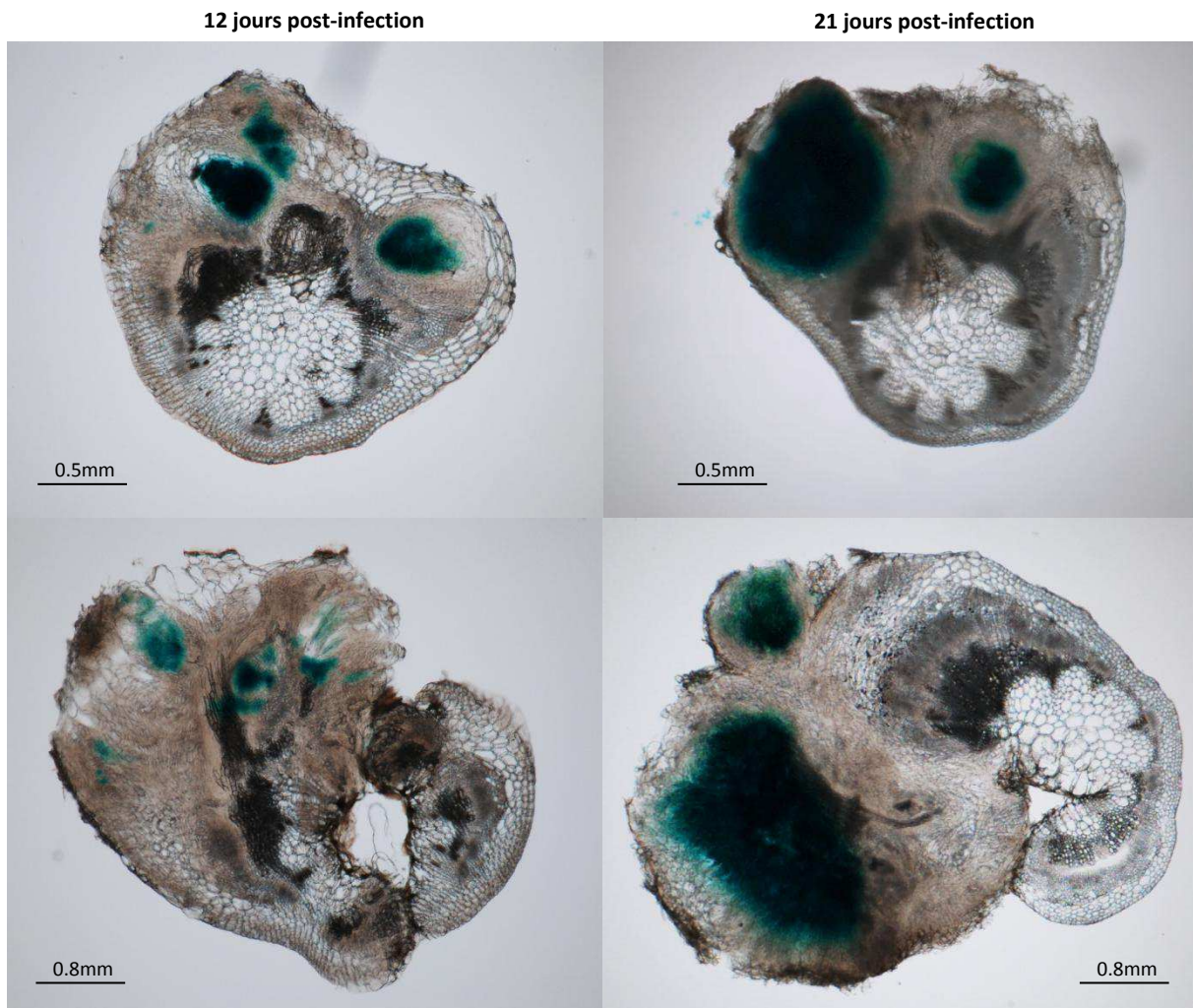


Figure 5: Localisation des cellules transformées dans les tumeurs végétales. Des plantes d'*A. thaliana* Col-0 ont été infectées avec la souche A281 d'*A. tumefaciens* contenant dans son ADN-T le gène rapporteur *GUS* (Rezmer et al., 1999). 12 et 21 jours après l'infection, des coupes transverses de tumeurs (80µm d'épaisseur) ont été obtenues, colorées et observées au microscope (Nikon AZ 100). Des barres d'échelle indicatives sont présentées.

tumeur ne sont pas transformées ou si tous les gènes de l'ADN-T ne sont pas simultanément exprimés dans une tumeur, pratiquement toutes les cellules tumorales contiennent en revanche les ARN messagers des gènes de l'ADN-T.

Du point de vue métabolique, les tumeurs végétales passent d'un régime aérobie et autotrophe à un régime anaérobie et hétérotrophe. Les profils d'expression de gènes importants pour les processus photosynthétiques et le transport électronique dans les mitochondries sont ainsi réprimés dans les tumeurs comparativement à des tissus sains alors que ceux de certains gènes impliqués dans l'apport énergétique par fermentation sont induits (Deeken et al., 2006). Les tumeurs se comportent également comme des puits

métaboliques. Elles détournent la circulation d'eau de la plante à son profit et accumulent de nombreux composés, dont des anions, des sucres et des acides aminés. Cette augmentation est en outre corrélée avec les profils d'expression de différents gènes codant pour des transporteurs et des enzymes clefs de ces voies métaboliques (Pavlovkin et al., 2002, Deeken et al., 2006).

2.4. Symptômes de la maladie et gamme d'hôtes d'*A. tumefaciens*

Conformément aux caractéristiques tumorales exposées ci-dessus les plantes infectées par *A. tumefaciens* peuvent présenter différents symptômes liés à un ralentissement de croissance. En inhibant les fonctions physiologiques de la plante telles que le transport d'eau et de nutriments, les tumeurs sont responsables d'une baisse importante de la quantité et de la qualité des productions végétales. De plus les tumeurs sont souvent des points d'entrée faciles pour d'autres pathogènes de la plante.

Pour définir la gamme d'hôtes d'*A. tumefaciens*, il est pertinent de distinguer les hôtes qu'*A. tumefaciens* peut transformer avec son ADN-T, des hôtes chez lesquels elle cause la maladie de la galle du collet. En effet si les espèces végétales sont les hôtes naturels pour le transfert de l'ADN-T, des transformations de cellules animales et fongiques ont également pu être réalisées dans des conditions de laboratoire (Lacroix et al., 2006).

Dans leur étude datée de 1976, De Cleene et De Ley recensent plus de 600 espèces végétales, appartenant à 331 genres et à 93 familles différentes, susceptibles d'être infectées par *A. tumefaciens*. La grande majorité de ces espèces sont des dicotylédones, bien que certaines monocotylédones des ordres des *Liliales* et *Arales* peuvent aussi être des hôtes de la bactérie pathogène. Cette définition de la gamme d'hôtes d'*A. tumefaciens* doit néanmoins être nuancée par le fait qu'il existe une diversité relativement importante chez l'espèce pathogène et que, par conséquent, certaines souches d'*A. tumefaciens* pourraient induire spécifiquement la maladie chez un certain nombre d'hôtes bien particuliers. De façon plus générale, les facteurs moléculaires mentionnés ci-avant, impliqués dans les processus infectieux et de développement tumoral, sont des déterminants majeurs de la capacité d'une souche d'*A. tumefaciens* à infecter une plante donnée.

Economiquement la galle du collet cause fréquemment d'importantes pertes dans les productions en pépinières d'arbres fruitiers, de rosiers et de vignes, et cela dans plusieurs pays du monde. Elle est notamment considérée comme la principale maladie d'origine bactérienne des arbres fruitiers à noyaux des pays de la zone Méditerranée (Pionnat et al., 1999). Aux Etats-Unis, la galle du collet affecte également de façon significative les productions de noisetiers (Pulawska, 2010). Pour lutter contre ces dégâts, différentes stratégies de détection (par PCR par exemple) et de bio-contrôle (infection avec des souches antagonistes d'*A. tumefaciens*) ont été et sont encore développées (Pulawska and Sobiczewski, 2005, Dandurishvili et al., 2011).

2.5. Rôle des opines dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

2.5.1. Les différentes opines et la classification des plasmides Ti

En plus des gènes codant pour la synthèse de phytohormones, les ADN-T d'*A. tumefaciens* portent des gènes impliqués dans la formation de petits composés carbonés appelés génériquement opines (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). Les études de plusieurs tumeurs induites par différentes souches d'*A. tumefaciens* ont montré que la nature des opines produites dans les tumeurs pouvait être très variée. A ce jour plus de 20 opines différentes ont été identifiées. Une classification en sept groupes distincts des plasmides Ti, en fonction des opines que leur ADN-T pouvait synthétiser, a ainsi été mise en place (Table 1).

Les plasmides les mieux caractérisés sont du type nopaline et octopine. Selon les substrats disponibles dans les cellules transformées de la tumeur, les gènes codant pour des synthèses d'opines peuvent produire différents composés. Sur les ADN-T de type octopine, le gène *ocs* (*octopine synthase*) peut catalyser la synthèse d'octopine, de lysopine, d'histopine, d'acide octopinique et de sulfonopine (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998, Flores-Mireles et al., 2012), le gène *mas* (*mannopine synthase*) est responsable de la production de mannopine et d'acide mannopinique et enfin le gène *ags* (*agropine synthase*) code pour une protéine impliquée dans la cyclisation de mannopine en agropine. Pour les plasmides de

Type de plasmide Ti	Principales opines produites
- Octopine	Octopine, acide octopinique, lysopine, histopine, agropine, mannopine, acides mannopinique et agropinique, sulfonopine
- Nopaline	Nopaline, acide nopalinique, agrocinopines A+B
- Agropine	Agropine, mannopine, acides mannopinique et agropinique, agrocinopines C+D, leucinopine, leucinopine lactame, L,L succinamopine
- Succinamopine	D,L succinamopine, succinamopine lactame, succinopine
- Lippia	Agrocinopines C+D
- Chrysoptine / succinamopine	Chrysoptine, composé de type Amadori, L,L succinamopine, L,L leucinopine
- Chrysoptine / nopaline	Chrysoptine, composé de type Amadori, nopaline

Table 1: Liste des différents types de plasmide Ti. Liste établie d'après Dessaux et al., 1998 et Flores-Mireles et al., 2012

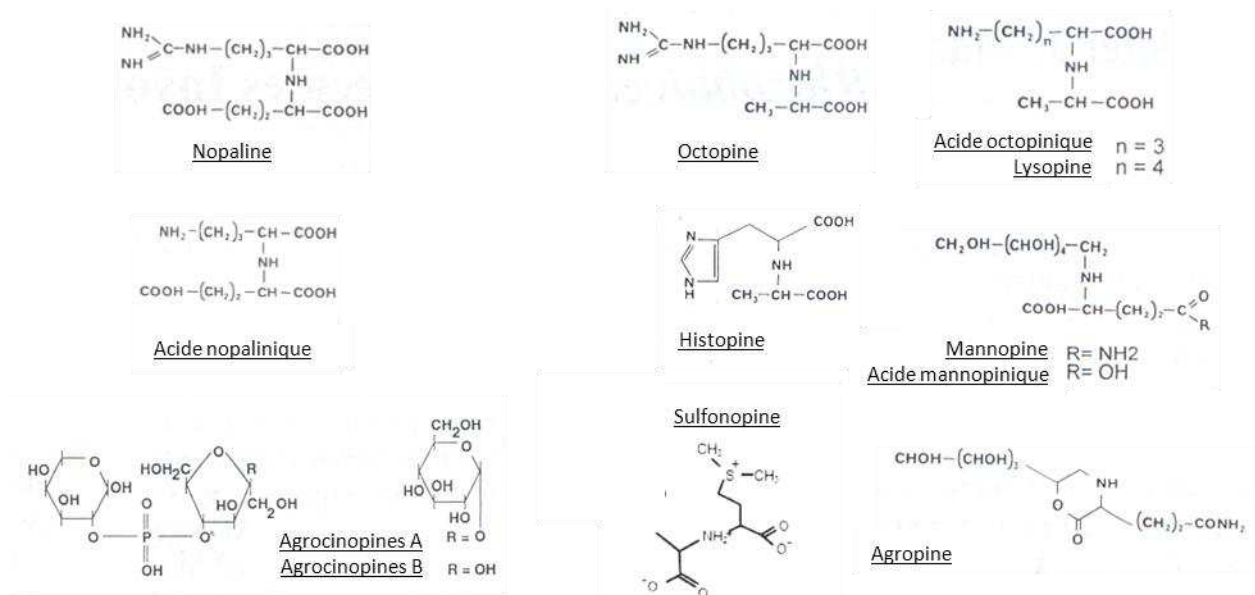


Figure 6: Structures chimiques des principales opines produites par les souches d'*A. tumefaciens* de type nopaline et octopine. D'après Dessaux et al., 1998 et Flores-Mireles et al., 2012.

type nopaline, les synthèses de nopaline et d'acide nopalinique sont assurées par le produit du gène *nos* (*nopaline synthase*) tandis que la production d'agrocinopines (agrocinopine A et B) est due au produit du gène *acs* (*agrocinopines synthase*). Les agrocinopines des plasmides

de type nopaline ont la particularité d’être les seules opines ne contenant pas d’azote (Fig. 6) (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998).

De manière remarquable, et comme évoqué précédemment, les différences qui peuvent exister au niveau des gènes de synthèse des opines entre plusieurs types d’ADN-T ne corrélerent pas nécessairement avec des différences similaires au niveau d’autres régions du plasmide Ti, par exemple celle de virulence. En outre une classification des souches d’*A. tumefaciens* basée sur le type du plasmide Ti qu’elles abritent ne recouvrira pas nécessairement la classification en espèces génomiques de ces souches. La figure 7 illustre sommairement cette complexité due à la diversité naturelle des plasmides Ti. Enfin si une cellule d’*A. tumefaciens* ne peut héberger qu’un seul type de plasmide Ti à la fois, l’analyse comparative de différents isolats naturels a montré que cette association pouvait être variée et que des plasmide Ti de type différent pouvaient se retrouver chez une même souche d’*A. tumefaciens* (Shams et al., 2012). Si ce phénomène s’explique logiquement par la nature mobile du réplicon et par sa compétence au transfert horizontal, la question de savoir s’il existe des déterminants dans le génome non-accessoire d’*A. tumefaciens* pouvant expliquer

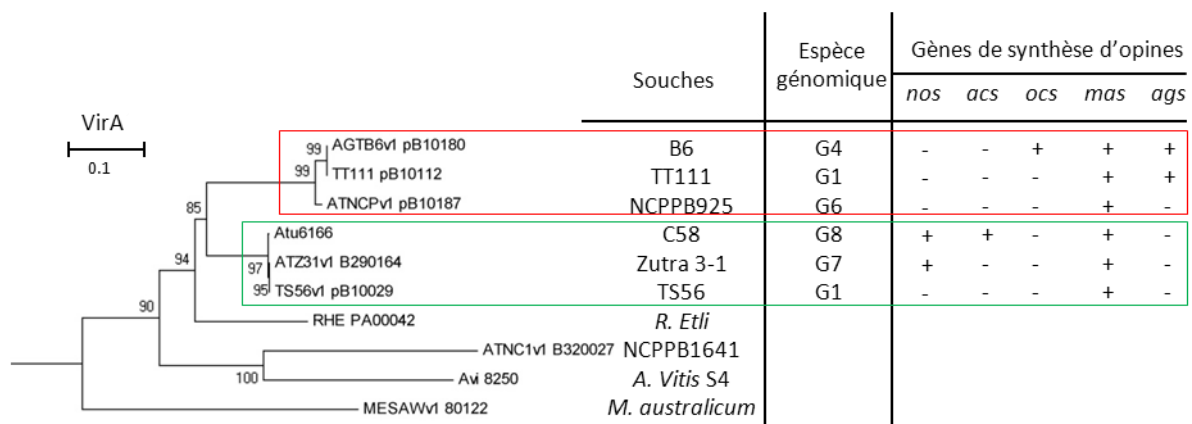


Figure 7: Caractérisation des plasmides Ti de différentes souches d’*A. tumefaciens*. Six souches d’*A. tumefaciens* ont été classées en deux clades distincts selon les homologies de séquence de la protéine VirA encodée par le plasmide Ti. L’arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel Mega5 (méthode Neighbor-joining, réglages par défaut). En parallèle sont renseignés les espèces génomiques correspondantes ainsi que les gènes de synthèse d’opines identifiés sur les ADN-T respectifs (*nos*: nopaline synthase, *acs*: agrocinoïdines synthase, *ocs*: octopine synthase, *mas*: mannopine synthase, *ags*: agropine synthase). Les informations de séquence et d’annotation ont été tirées du projet AgrobacterScope du Génoscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/about/collabprojects.php?P_id=51). La présence de gènes annotés *mas* sur les ADN-T de souches nopaline demeure pour l’instant sans explication.

la présence préférentiellement dans une souche bactérienne de tel ou tel type de plasmide Ti n'a pas été examinée jusqu'à présent.

2.5.2. Le concept d'opine ou comment *A. tumefaciens* transforme la tumeur végétale en niche écologique

Dans son acception canonique, le concept d'opine définit les opines comme des molécules de petite taille dont la production dans les tumeurs est déclenchée par *A. tumefaciens* pour subvenir à sa multiplication et pour promouvoir la dissémination de ses traits de virulence (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998).

Une des clefs de ce concept réside en la présence sur les plasmides Ti d'opérons spécialisés dans le transport et le catabolisme des opines dont les ADN-T de ces mêmes plasmides assurent la synthèse. Ainsi dans les plasmides de type octopine la région *Occ* permet l'assimilation d'octopine, d'acide octopinique et de lysopine. Dans les plasmides de type nopaline la région *Noc* est responsable de l'importation et de la dégradation de la nopaline en proline tandis que le transport et le catabolisme des agrocinopines sont, eux, assurés par les produits des gènes *accABCDEFG*. Les expressions des régions *Occ*, *Noc* et *Acc* sont contrôlées respectivement par les régulateurs transcriptionnels *OccR*, *NocR* (tous deux membres de la famille *LysR*) et *AccR* (membre de la famille *FucR*). Les promoteurs de ces trois régions sont également inductibles par leurs opines correspondantes (Dessaux et al., 1998).

Bien que certaines espèces bactériennes différentes des agrobactéries, comme *Pseudomonas* sp. soient aussi capables d'assimiler des opines, la co-présence sur les plasmides Ti de gènes impliqués à la fois dans la synthèse et la dégradation de ces composés apparaît comme une véritable marque de fabrique des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). Il est notamment supposé que cette association conférerait un avantage sélectif aux populations d'*A. tumefaciens* colonisant les tumeurs et possiblement en compétition avec d'autres bactéries dépourvues d'un tel système. Plusieurs expériences, utilisant à la fois des plantes génétiquement modifiées pour produire des opines et des souches bactériennes capables ou incapables d'assimiler ces opines, supportent l'hypothèse du concept d'opine en montrant que la

croissance des souches utilisatrices des opines était favorisée au contact des plantes transgéniques (Savka and Farrand, 1997, Dessaux et al., 1998). Il est toutefois à noter qu'il n'existe jusqu'à présent aucune preuve directe de la validité du concept d'opine dans le compartiment tumoral induit par des souches virulentes d'*A. tumefaciens*.

2.5.3. Le quorum-sensing (QS)

A côté de leurs rôles en tant que source nutritives contribuant à la création d'une niche écologique favorable à *A. tumefaciens*, certaines opines remplissent également une fonction de signalisation. Les opines conjugatives peuvent ainsi initier le processus de communication intercellulaire nommé quorum-sensing et contrôlent de la sorte le transfert horizontal ainsi que la réplication végétative du plasmide Ti.

*Le texte qui suit est la version provisoire d'une revue sur le quorum-sensing d'*A. tumefaciens* destinée à être publiée dans un numéro spécial du journal « Frontiers in Plant-Microbe interaction ». Le texte a bénéficié de la relecture critique de D. Faure.*

Common and uncommon characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* quorum-sensing

Abstract:

In *Agrobacterium tumefaciens* horizontal transfer and vegetative replication of oncogenic Ti plasmids involve a cell-to-cell communication process called quorum-sensing (QS). This QS-system belongs to the Gram-negative LuxR/LuxI class. The LuxI-like protein TraI synthesizes *N*-acyl-homoserine lactone molecules which act as diffusible QS-signals and activate, at a critical concentration, the LuxR-like transcriptional factor TraR, thereby initiating the QS-regulatory pathway. For the last twenty years, *A. tumefaciens* has stood as a prominent model in the understanding of the LuxR/LuxI type of QS systems. A number of studies also unveiled features which were unique to *A. tumefaciens* QS, some of them being directly related to the phytopathogenic lifestyle of the bacteria. In this review we will present the current state of knowledge regarding the genetic and molecular basis of QS in *A. tumefaciens*. We will also describe how interactions with plant host modulate the QS pathway of *A. tumefaciens*, and discuss what could be the advantages for the agrobacteria in selecting such a tightly regulated QS-system to disseminate the Ti plasmids.

Introduction:

In its canonical definition, quorum-sensing (QS) refers to a process through which a bacterial population is able to monitor its cell density and accordingly to mount coordinate responses (Fuqua et al., 1994). This phenomenon relies on the synthesis, diffusion and perception of small signal molecules (autoinducers) which allow bacteria to communicate with each other and to regulate gene expression. In the last forty years a number of studies have established that QS was widespread in bacterial kingdom although the nature of the signal molecules

and/or signaling networks as well as the functions regulated by QS may considerably vary depending on the species (Miller and Bassler, 2001, Frederix and Downie, 2011, Stevens et al., 2012, Pereira et al., 2013).

In Proteobacteria the typical QS model is epitomized by the LuxI/LuxR bioluminescence system of *Vibrio fischeri* which was described as early as 1970 (Nealson et al., 1970, Eberhard, 1972). In summary LuxI catalyzes the synthesis of an *N*-acyl-homoserine lactone derivate (the 3-oxo-hexanoylhomoserine lactone or 3OC6HSLs) which acts as an autoinducer and accumulates in a cell density-dependent manner. At a critical concentration these 3OC6HSL molecules bind to their ligands, the transcriptional factors LuxR and the newly formed dimers induce the expression of the *lux* operon which includes not only genes responsible for bioluminescence but also *luxI*. This last autoregulatory action results in an exponential increase in the production of autoinducers and accounts for the characteristic pattern of QS-dependent bioluminescence in *V. fischeri* populations which rapidly shifts at the quorum concentration from an “off” state to an “on” state.

Interestingly many homologues of LuxI and LuxR proteins have been found in other bacterial species like *Pseudomonas aeruginosa*, *Pectobacterium atrosepticum* and *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua et al., 1994, Fuqua et al., 1996). The first milestone in the study of *A. tumefaciens* QS was achieved by Piper et al., (1993) with the functional characterization of the TraR protein, the LuxR homologue. This seminal finding introduced a new area of research regarding horizontal transfer of virulence Ti plasmids in *A. tumefaciens* and stimulated thereafter a large amount of works which made the phytopathogen species a leading model for the investigation of LuxI/LuxR QS systems over the last two decades. In this review we will recap the most striking results obtained in deciphering the genetic network as well as the molecular basis of *A. tumefaciens* QS. We will also present how this QS system, consistently with the phytopathogenic lifestyle of *A. tumefaciens*, is integrated into an exquisite regulatory set-up, including various opine regulons and lactonase activities. Finally we will discuss the relevance of such complex network to carry out the dissemination of the Ti plasmid genes in the plant tumor environment.

1. Genetic network of *A. tumefaciens* QS

1.1. A LuxI/LuxR type QS integrating an antagonist component

The first insight of a QS system in *A. tumefaciens* was gained with the functional characterization of a *traR* gene which was homologue to *V. fischeri luxR* and whose product acted as a transcriptional activator in presence of a co-inducer. Actually two versions of the *traR* gene were found almost concomitantly in two Ti plasmids of nopaline- and octopine-type (Piper et al., 1993, Fuqua and Winans, 1994). These two genes displayed high homology between them but were located in Ti plasmid regions totally dissimilar, the expressions of each being controlled by specific opines. Soon after this discovery, the chemical formula of the co-inducer required for TraR activity was determined by spectrometry analysis as being 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8HSL) (Fig. 1) (Zhang et al., 1993) and the gene *traI*, for which very closely related sequences also exist in nopaline- and octopine-type Ti plasmids, was proved to be responsible for OC8HSL synthesis (Hwang et al., 1994).

Like other LuxI/LuxR type QS systems, *A. tumefaciens* QS comprises another component which negatively modulates the responses of TraR and OC8HSL. In a paper by Hwang et al., (1995) the Ti plasmid-encoded protein TraM was found to suppress TraR transcriptional activity. Further yeast two-hybrid assays showed that the two proteins could directly interact and from these data it was deduced that association between TraM and TraR, by preventing proper TraR binding to DNA, was responsible for inhibition of TraR-mediated responses (Hwang et al., 1999). Two subsequent findings strengthened the negative regulatory functions exerted by TraM on QS. First it was established that the protein could block TraR activity even after the transcription factor had bound to DNA (Luo et al., 2000) and second TraM was demonstrated to promote TraR proteolysis (Costa et al., 2012). The gene *traM* is present in all nopaline and octopine-type Ti plasmids analyzed so far. The octopine-type Ti plasmid A6 possesses even a second functional *traM* gene borne on a chromosome, surely as a result of gene duplication (Wang et al., 2006a). Remarkably all TraM proteins have high homology between them but are not related to any other proteins found in the databases.

The implications of TraM action for the dynamics of the system will be discussed in the following.

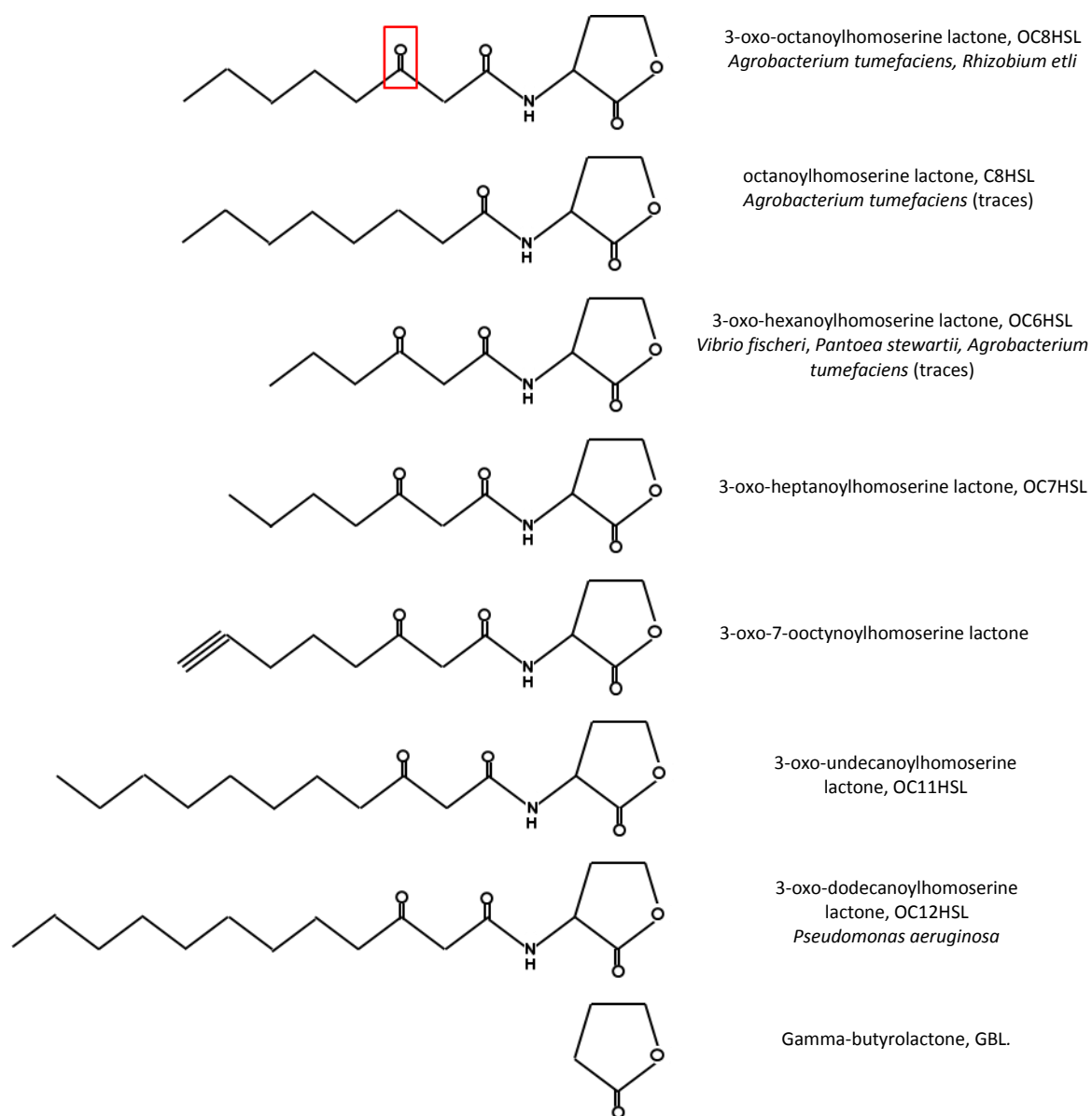


Figure 1: Structures of the *A. tumefaciens* QS signal OC8HSL and of the OC8HSL analogues mentioned in this review. In parallel are indicated the full name of the molecule, its abbreviation as well as the bacterial species in which the compound acts as a QS signal. The frame in red highlights the C3 position which can be either unsubstituted (like C8HSL) or substituted with hydroxy or oxo groups.

1.2. QS-regulated genes are involved in feedback control and Ti plasmid dissemination

Chronologically the first genes identified as TraR-regulated, and consequently QS-regulated, were OC8HSL synthesis *tral* gene and the *tra* genes involved in conjugation of the Ti plasmid (Piper et al., 1993, Hwang et al., 1994). Then there were the regulatory gene *traM* (Hwang et al., 1995) and finally the *rep* genes required for vegetative replication of the Ti plasmid (Li and Farrand, 2000). Along with these researches, four 18bp-inverted repeat operator sequences (called tra box I, II, III and IV) whose disruption abolished TraR transactivation were found in the promoters of the QS-regulated genes and these promoters were assigned to two distinct classes (class I-like and class II-like) according to the position of the tra boxes relatively to the transcription start site and the -35 element of the promoter (Fuqua and Winans, 1996a). Noticeably *traR* has been reported as a self-regulated gene though no tra box is present in its promoter region (Fuqua and Winans, 1994).

As a summary of the previous efforts an extensive survey of QS-regulated genes has been recently carried out, both in nopaline-type and octopine-type Ti plasmids, using gene arrays and a TraR-overexpressing system (Cho and Winans, 2007). The results globally confirmed the previous data. Only genes located in the Ti plasmids were affected. In nopaline-type Ti plasmid 31 genes were upregulated by TraR overexpression and 25 in octopine-type Ti plasmid. Among the genes common to the two backgrounds were the *tra*, *rep* and *traM* genes. Moreover the operon structures and the promoter regulations by tra boxes of these genes were well conserved between the two backgrounds.

The operons *traCDGyci* and *traAFBH* are divergently transcribed from a single class II-like promoter activated by a tra box I and autorepressed by TraA, TraC and TraD (Cho and Winans, 2007). These genes code for a DNA transfer and replication machinery involved in the conjugative processing of Ti plasmid (Farrand et al., 1996, Cook et al., 1997, Cho and Winans, 2007). The promoter of *tral-trbBCDEJKLFGHI* operon belongs also to the class II-like but is activated by a tra box II. The genes *trb* encode a mating pair formation system for the transfer of the Ti plasmid which is related to members of the type IV secretion family (Li et al., 1998). Among the proteins encoded by these genes, TrbJ and TrbK also act synergistically to implement entry exclusion mechanism which ensures that conjugation events cannot

occur between donor and recipient *A. tumefaciens* cells harboring similar Ti plasmids (Cho et al., 2009). In agreement with the gene functions, TraR-mediated upregulation of the three *traCDGyci*, *traAFBH* and *tral-trbCDEJKLFGHI* operons results in induction of Ti plasmid conjugation. On the other hand the control of *tral* expression by TraR leads to a positive feedback which amplifies, through increase in OC8HSL production, the QS responses of *A. tumefaciens* (Hwang et al., 1994). As an illustration of this effect exogenous supply of OC8HSL to *A. tumefaciens* cells initiated for QS accelerated the TraR-mediated induction of Ti plasmid conjugation (Fuqua and Winans, 1996a).

Curiously *traM* gene coding for the TraR antiactivator appears also to be upregulated by TraR (Hwang et al., 1995). It was proposed that this regulatory mechanism allows the cells to produce TraM proteins at levels sufficient to inhibit the available TraR under conditions of basal-level expression and that later on, when the expression of *traR* is induced, the resulting increased levels of TraR protein would overcome the available TraM, thence triggering the QS response. This model actually highlights the importance of relative TraR and TraM protein levels for QS implementation and suggests that TraM significantly contributes to the quorum-dependent dimension of the system by delaying the moment when TraR is able to transactivate target genes (Su et al., 2008). Consistently a *traM* defective strain was shown to be QS active in a population-independent manner (Piper and Farrand, 2000) and a mathematical approach claimed that TraM was necessary for the existence of the *A. tumefaciens* QS “off” state (Goryachev et al., 2005). Another implication of the *traM* regulation by TraR is that rate of TraR production must at one point exceed rate of TraM production, otherwise QS would continuously be inhibited. Evidence that TraM is specifically transcribed from a promoter mildly activated by a tra box IV (White and Winans, 2007) is in line with this requirement. Alternatively an interesting but yet unexplored possibility to explain induction of *traM* expression by TraR would be that this mechanism provides the cells with a mean to limit or shut off the QS process when this one is too strongly activated and becomes for instance too demanding energetically. This down-regulation loop is in fact common in LuxI/LuxR systems (Gelencser et al., 2012). Either way a more critical examination of TraM regulation is still needed to fully clarify its role in QS. Additionally it has been shown that acetosyringone, a phenolic compound released by

wounded plant cells, could also induce expression of *traM*, suggesting that during first steps of tumorigenesis TraM could efficiently inhibit QS activity (Cho and Winans, 2005).

The expression of the operon *repABC* was initially shown to be strongly stimulated by TraR both in nopaline- and octopine-type backgrounds and this stimulation was correlated with a drastic increase in number of Ti plasmid copies (Li and Farrand, 2000, Pappas and Winans, 2003a). However in the array experiment mentioned previously (Cho and Winans, 2007), *repABC* upregulation by TraR was barely detectable. Authors argued that this result was probably due to the very weak basal expression of the operon and that it did not question the role of QS in elevating Ti plasmid copies because in their experimental conditions the number of Ti plasmids per cell was still superior to one. Another interpretation of this result might be that increased Ti plasmid copies culminates in a negative feedback possibly bringing back the expressions of the *repABC* genes to their basal levels, thereby avoiding continuous and anarchic multiplication of the replicon. The promoter architecture of *repABC* may support this hypothesis. Three different TraR-dependent (*repAP1*, 2 and 3) and one TraR-independent (*repAP4*) promoters control the expression of the operon (Pappas and Winans, 2003b). *RepAP4* is thought to mediate the Ti plasmid replication associated with cell division but it is also autorepressed by RepA and RepB. Moreover *repAP4* is located downstream of *repAP1*, 2 and 3. It is therefore conceivable that autorepression of *repAP4* might impair activation of TraR-dependent promoters. Additionally expression of *repABC* can be induced by the virulence proteins VirA and VirG, comforting the notion that the regulation of this operon is complex and might be sensitive to different physiological states (Cho and Winans, 2005, Pappas, 2008).

2. Molecular basis of *A. tumefaciens* QS

A central aspect of the LuxI/LuxR type QS systems resides in the way autoinducers, transcriptional factors and promoter DNA interact with each other. Better understanding these mechanisms is therefore of special importance to evaluate the specificity of the system. Given the large variety of acylhomoserine lactone derivatives which serve as QS signals, it may also represent a privileged opportunity to get insight into possible crosstalks

between different bacterial QS or to develop strategies of quorum-quenching. Combining biochemical and structural approaches with analysis of mutant strains and *in vivo* expression assays, the researches on *A. tumefaciens* QS undoubtedly assemble one of the most elaborate set of data in this domain.

2.1. Tral and OC8HSL synthesis

To identify the substrates of OC8HSL synthesis, enzymatic activity of purified *A. tumefaciens* Tral was tested in presence of different molecules (More et al., 1996). It was thus determined that 3-oxo-octanoyl-acyl carrier protein (OC8-ACP) was the fatty acid donor and S-adenosylmethionine (SAM) the homoserine lactone precursor involved in OC8HSL synthesis. Mechanistically the synthesis reaction is proposed to occur in a “bi-ter” (two substrates, three products) way. The donation of the 3-oxo-octanoyl branch to the amine of SAM leads to the releases of first apo-ACP, then OC8HSL and finally methylthioadenosine (Parsek et al., 1999). All enzymes of the LuxI family are expected to share similar mechanisms of reactions, though varying in the acyl chain length and oxidation state at C3 of their acyl-ACP substrates. High-resolution crystal structures were obtained for two Tral homologous proteins: Esal of *Pantoea stewartii* synthesizing 3-oxo-hexanoylhomoserine lactones and LasI of *Pseudomonas aeruginosa* synthesizing 3-oxo-dodecanoylhomoserine lactones (Watson et al., 2001, Gould et al., 2004). Analysis of these structures revealed that conserved residues in the N-terminal part of the protein were essential for SAM-binding and that selectivity of the acyl-ACP substrate was dependent on a V-shaped cleft passing through the enzyme. Other results also suggested that selectivity of LuxI-like proteins could be affected by availability of different acyl-ACP substrates. Noticeably in *A. tumefaciens*, besides OC8HSL, traces of OC6HSL and octanoylhomoserine lactone (C8HSL) synthesis were found (Zhu et al., 1998).

2.2. OC8HSL specifically interacts with TraR

If, by analogy with other LuxI/LuxR QS, *A. tumefaciens* QS autoinducer molecules were thought to form dimers with their LuxR-like receptors (Fuqua et al., 1996), the first evidence

of this interaction was obtained through purified active TraR complexes which co-eluted with OC8HSLs in a ratio 1:1 (Zhu and Winans, 1999). Analysis of protein turnover also indicated that binding of OC8HSL occurred rapidly in cells, surely during the own synthesis of TraR on polysomes (Zhu and Winans, 2001).

Further crystal structures provided a mechanistic explanation for the specific interaction between TraR and OC8HSL by showing that the N-terminal part of TraR formed an enclosed cavity into which OC8HSL molecule could be engulfed and tightly maintained through numerous hydrophobic contacts as well as four hydrogen bonds (Vannini et al., 2002, Zhang et al., 2002b). To analyze the specificity of the interaction between OC8HSL and TraR, thirty-one analogs of OC8HSLs were tested for their abilities to activate TraR. Most of these compounds turned out to be potent antagonists of TraR in wild-type conditions of TraR expression and significant stimulators in conditions of TraR overexpression, demonstrating thereby that the specificity of the interaction between TraR and its ligand could be dependent on TraR concentration (Zhu et al., 1998). Moreover the 3-oxo function of OC8HSL molecule seemed to play important role in the interaction process as 3-oxo-C6-, 3-oxo-C7-, 3-oxo-C11-, 3-oxo-C12- and 3-oxo-7-octynoyl- homoserine lactone derivatives could also activate TraR, though with a much lower intensity than OC8HSL (Zhu et al., 1998, Luo et al., 2003b). Consistently non conservative mutations in TraR of the Threonine 129 which was predicted to stabilize the 3-oxo group in the binding pocket led to strong impairment of TraR activity (Chai and Winans, 2004). In addition alanine 49 and glutamine 58 in the N-terminal part of TraR were found to be important for the binding of the C8 acyl chain of OC8HSL since their conversion to bulkier amino-acid resulted in higher affinity towards homoserine lactone derivatives with shorter acyl chain (Chai and Winans, 2004).

2.3. Interaction between OC8HSL and TraR facilitates formation of active homodimers

The observation that C-terminal deletion mutants of TraR exerted strong dominant negativity over their wild-type counterparts led to the hypothesis that TraR-OC8HSL complexes had to multimerize to be active (Luo and Farrand, 1999). Thereafter, use of size exclusion chromatography allowed establishing that purified active OC8HSL-TraR complexes formed homodimers and hybrid expression reporter systems demonstrated that OC8HSL

was required for this event to take place (Qin et al., 2000). The existence of active OC8HSL-TraR homodimers was further supported by analysis of crystal structures which also suggested that these ones were significantly asymmetric (Vannini et al., 2002, Zhang et al., 2002b). Two dimerization domains were identified in TraR sequence, one in the N-terminal part of the protein, partially overlapping with the OC8HSL-binding domain and another, less extensive, in the C-terminal part (Luo et al., 2003a). Several findings illustrated the role of OC8HSL binding in the maturation and dimerization process of TraR. In absence of OC8HSL, TraR proteins were intrinsically unstructured, insoluble in cells and rapidly degraded by proteases; on the opposite presence of OC8HSL directed the release of active TraR into cytosol and enhanced the resistance of the protein against proteolysis (Qin et al., 2000, Zhu and Winans, 2001, Pinto and Winans, 2009). Additionally the proper folding of TraR and acquisition of mature ternary structure following interaction with OC8HSL was shown to be mediated by the chaperone GroESL (Chai and Winans, 2009).

2.4. TraR-OC8HSL homodimers specifically recognizes tra boxes

As mentioned above tra boxes are 18bp-inverted repeat operator sequences with a pronounced dyad symmetry found in the two classes of TraR-regulated promoters (Fuqua and Winans, 1996a). Crystallization of TraR-OC8HSL complexes in presence of the tra box I sequence postulated that each subunit of TraR-OC8HSL dimer bound to half of the tra box via C-terminal helix-turn-helix DNA binding motifs, thereby leading to an extensive DNA-protein interaction (Vannini et al., 2002, Zhang et al., 2002b). However it was later demonstrated that six nucleotides at the center of the tra boxes did not interact with TraR and that yet these nucleotides contributed to proper activation of transcription, presumably by creating a flexible DNA bend (White and Winans, 2007). In parallel different screenings of TraR mutants resulted in the identification of three regions, located in the N- and C-terminal part of the protein, which were critical for transactivation function but not for accumulation or DNA binding ability (Qin et al., 2004a, White and Winans, 2005, Qin et al., 2009). This finding suggested that these regions could cooperatively modulate recruitment of RNA polymerase and thereby differently control the expressions of the TraR-regulated genes.

Consistently some TraR mutants defective in transactivation of the *traI* promoter could still activate the *traM* promoter (Costa et al., 2009).

2.5. TraM-mediated inactivation of TraR is due to oligomeric association

In a first effort to better understand how TraM could deactivate TraR, two crystal structures of TraM were obtained, showing that the protein formed homodimers with one unit linked to the other by an extensive hydrophobic interface (Chen et al., 2004, Vannini et al., 2004). The importance of this interface and the dimerization properties of TraM were also assessed using deletion mutants (Qin et al., 2004b). In addition purifications of inactive TraR/TraM complexes carried out by different groups and with different biochemical techniques led to the conclusion that the inactive complexes were composed of 2 TraR-OC8HSL dimers and 2 TraM dimers both *in vitro* and *in vivo* (Chen et al., 2004, Vannini et al., 2004, Qin et al., 2007). Several domains important for this oligomerization and the resulting inhibitory effect were identified both in TraR and TraM sequences (Luo et al., 2000, Swiderska et al., 2001, Qin et al., 2007). Finally, to explain the way TraM could inactivate DNA-bound TraR-OC8HSL dimers, a recent study convincingly proposed a stepwise mechanism according to which the apparition of inactive TraR-OC8HSL/TraM complexes was preceded by a nucleoprotein intermediate comprising one dimer of each protein in association with DNA (Qin et al., 2007).

3. *A. tumefaciens* QS and interactions with plant host

3.1. Role of the opines: master control and fine-tuning

Opines are small organic compounds which are produced during development of crown gall disease in transformed plant cells through the action of synthesis genes present on the T-DNA. Traditionally *A. tumefaciens* plasmids are classified according to the opine or the combination of opines they contribute to produce (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). The two types which are the most studied in laboratories are from the octopine-type

and the nopaline-type. *A. tumefaciens* Ti plasmids also harbor operons specialized in the uptake and assimilation of the opines they contribute to produce. This characteristic led about forty years ago to the formulation of the opine concept stating that opines are key mediators of the *A. tumefaciens*/plant host interactions (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). Several lines of evidence notably support the notion that opine production creates specific ecological niches for populations of *A. tumefaciens* which are thence favored compared to other bacterial species unable to assimilate the compounds (Dessaux et al., 1998, Platt et al., 2012b). Moreover it has been known for more than thirty years now that specific opines, called conjugal opines, are strictly required to enable conjugation of the *A. tumefaciens* Ti plasmid (Kerr et al., 1977, Petit et al., 1978). Therefore the finding at the beginning of the 1990s that this phenomenon was also dependent on the TraR/TraI QS system, sparked off significant interest and a number of studies addressed the problem of understanding how these regulatory steps could be related. Successive genetic, sequence and promoter dissections ultimately achieved the complete elucidation of the signaling pathway, clearly establishing the prominent role played by the conjugal opines for *traR* expression and QS initiation (Fig. 2).

In the case of nopaline-type Ti plasmids, agrocinosines A and B which are a mixture of two non-nitrogenous phosphodiester esters of sugars serve as conjugal opines (Ellis et al., 1982). These molecules can provoke, presumably by direct inhibitory interaction, the release of the transcriptional repression exerted by AccR, a member of the FucR family of transcriptional regulator (Beck von Bodman et al., 1992). In turn this derepression causes the expression of the two divergently oriented operons *acc* and *arc*. The operon *acc* encodes seven proteins involved in internalization and degradation of agrocinosines plus the repressor AccR (Kim and Farrand, 1997) while the operon *arc* encodes five proteins, the fourth being TraR (Piper et al., 1999). In contrast in octopine-type Ti plasmids, *traR* is the last of fourteen genes in the *occ* operon which codes for functions associated with octopine assimilation (Fuqua and Winans, 1996b). Octopine molecules are formed in transformed plant cells from arginine and pyruvate and act as conjugal opines by binding to OccR, a transcriptional activator of the LysR family, thereby eliciting transcription of the *occ* operon including *traR* (Habeb et al., 1991, Cho and Winans, 1993). Remarkably absence of the conjugal opines totally forbids QS-mediated conjugation of both nopaline and octopine-type Ti plasmids. Moreover, despite

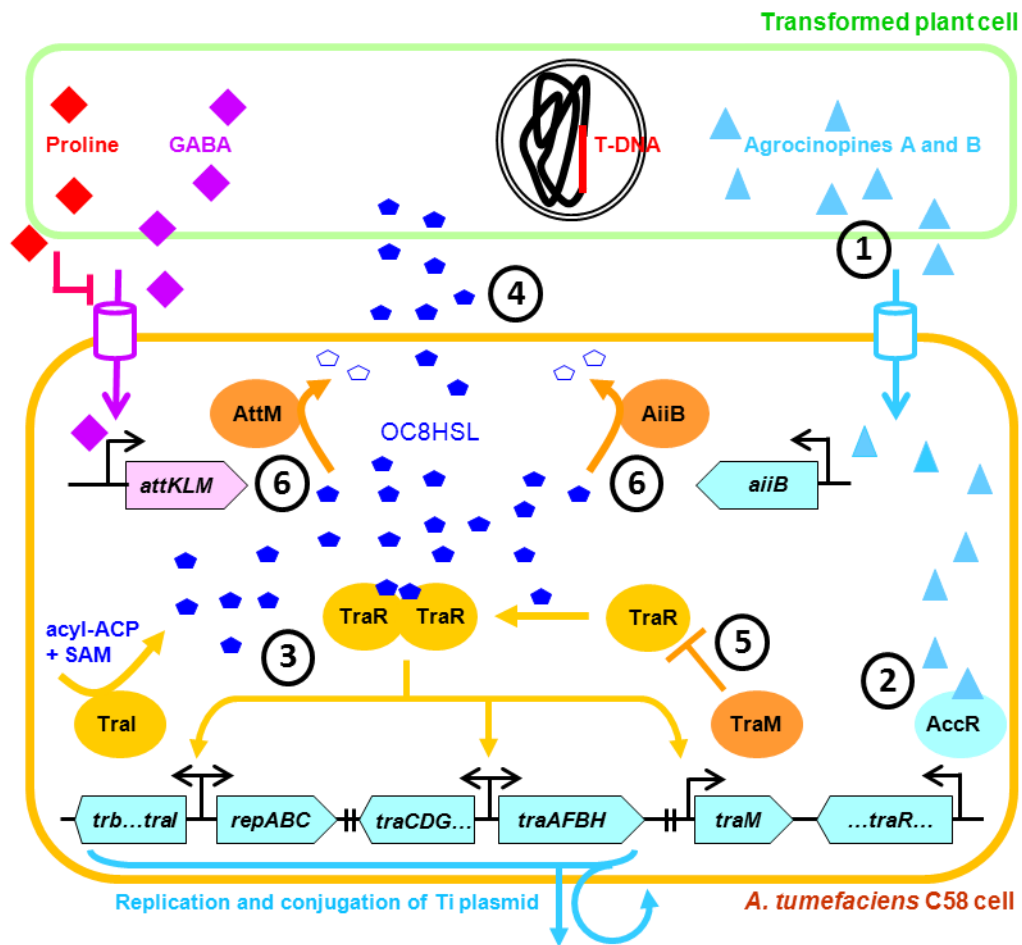


Figure 2: Representation of the sophisticated hierarchical QS regulation in *A. tumefaciens* strain C58. QS-dependent conjugation and copy-number amplification of the Ti plasmid is initiated when OC8HSL and TraR reach appropriate concentration and form transcriptional active dimers. QS-signalling is positively regulated by the conjugal opines agrocinopines which are produced by the transformed plant cells (1) and induce production of TraR by releasing AccR repressive action (2). Then, active TraR-OC8HSL dimers activate the production of Tral, thereby triggering the synthesis of OC8HSLs (3) which are diffusible molecules (4). The QS activation is delayed by the TraR-antagonist TraM (5), as well as OC8HSL-cleaving lactonases AiiB and AttM (6) whose expressions are controlled by agrocinopines and GABA, respectively. SAM: S-adenosylmethionine; ACP: acyl carrier protein; the Ti plasmid genes and the At plasmid genes are in blue and pink boxes respectively.

the differences in *traR* location, the structures of the TraR-regulated operons are well conserved between the nopaline- and octopine-type backgrounds (Cho and Winans, 2007). This feature actually supports the notion that *traR* and TraR-regulated genes constitute a functional unit, subject to fortuitous recombination events in the course of *A. tumefaciens* evolution, and whose integration under the strict control of an opine regulon would have

resulted in an important selective advantage for the bacteria (Piper et al., 1999, Oger and Farrand, 2001).

In addition to the master control depicted above, opines are also involved in at least two other fine-tuning QS regulatory mechanisms. The first one was described in the *A. tumefaciens* strain R10 harboring an octopine-type Ti plasmid, with the existence of a TraR antiactivator, different from TraM, named TrlR, encoded by the Ti plasmid and whose expression was inducible by the opine mannopine (Zhu and Winans, 1998). TrlR strongly resembles TraR but lacks its DNA-binding domain and experimental data provided evidence that TrlR could block TraR activity by forming inactive TrlR:TraR dimers (Chai et al., 2001). However the impact of TrlR on QS implementation, especially *in vivo*, remains poorly understood. A second example of QS fine-tuning by opines is documented. In the nopaline-type *A. tumefaciens* C58 strain, expression of the Ti plasmid gene *aiiB* was shown to be induced by the agrocinopines, the same opines which were required for QS initiation (Haudecoeur et al., 2009b). Curiously *aiiB* codes for a lactonase, highly similar to the AiiA lactonase from *Bacillus thuringiensis*. These proteins belong to a large family of Zn-hydrolases that encompasses lactonases of *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Mezorhizobium*, *Photobacterium* and *Rhizobium*. Biochemical and structural properties of AiiB were investigated and showed that the protein is able to cleave the lactone rings of a large range of homoserine lactone derivatives, with general preference for non 3-oxo-substituted molecules and substrates with an acyl chain longer than 4 carbons (Liu et al., 2007). Further conjugation experiments demonstrated the capacity of this lactonase to modulate *A. tumefaciens* QS responses both *in vitro* and *in planta* (Haudecoeur et al., 2009b). Globally the characteristics of *trlR* and *aiiB* (specific to octopine- and nopaline-type respectively, close homologues of *traR* and *aiiA* respectively) suggest that these two genes arose from gene duplication (for *trlR*) and horizontal gene transfer (for *aiiB*). On the other hand their conservation under the control of opine regulons imply that there would be paradoxically an advantage for *A. tumefaciens* cells to somehow dampen QS communication at moments when opines, including conjugal opines, accumulate in tumors.

3.2. Expression of the OC8HSL-degrading AttM (=BlcC) lactonase is induced by plant metabolites

Like AiiB, the AttM (=BlcC) protein is a member of the AiiA lactonase family and has been shown in different studies to degrade various homoserine lactone derivatives, including gamma-butyrolactone (GBL) and OC8HSLs. The gene *attM* is part of the three-gene *attKLM* operon which codes for the catabolic pathway converting GBL to succinate, through gamma-hydroxybutyrate (GHB) and succinic semialdehyde (SSA) intermediates (Chai et al., 2007). Remarkably if AttM confers to *A. tumefaciens* the ability to grow with GBL as sole source of carbon, it does not with OC8HSLs (Carlier et al., 2004). Expression of *attKLM* operon is tightly controlled by the transcriptional repressor AttJ. Carbon and nitrogen starvation, GBL, GHB and SSA can all release the action of AttJ, thence allowing expression of *attKLM* genes (Zhang et al., 2002a, Carlier et al., 2004). The plant metabolite gamma-amino butyric acid (GABA), through conversion to SSA (Chevrot et al., 2006, Wang et al., 2006b), and the plant defense signaling hormone salicylic acid, through an unknown mechanism (Yuan et al., 2008), can also induce *attM* expression. Because of the GABA induction, it was proposed that AttM activity could coincide with QS communication during interactions between *A. tumefaciens* and plant hosts. However, in tomatoes tumors, the effect of AttM on QS-dependent Ti plasmid conjugation was weak and transient (Khan and Farrand, 2009). Although the enzymatic properties of the lactonase AttM on OC8HSL or GBL have never been compared so far, it is likely that they would depend on the concentrations in the environment of each compound involved in the regulation and activities of the *attKLM* operon. The ability of AttM to interfere with *A. tumefaciens* QS in plant tumors would consequently be contingent on relative levels of GABA, GBL, GHB, SSA and OC8HSL.

To gain an insight into these processes, the capacity of *A. tumefaciens* to uptake GABA was extensively investigated in the last years and revealed two distinct transport systems. The gene *atu2422*, located on the circular chromosome, is widely conserved in the *Agrobacterium* genus and codes for a periplasmic GABA-binding protein controlling GABA import through the *bra* ABC transporter (Planamente et al., 2010). Downregulation of *atu2422* expression by sRNA AbcR1 was reported in stationary phase cell cultures (Wilms et al., 2011). Interestingly the GABA import by *atu2422* is strongly antagonized by proline,

alanine and valine, suggesting that these compounds which accumulate in tumors could also modulate the lactonase activity of AttM (Haudecoeur et al., 2009a). In comparison the periplasmic binding protein encoded by the linear chromosome gene *atu4243* appears highly specific to GABA as, among several tested amino-acids or derivatives, only trans-4-aminocrotonic acid displayed inhibitory effect on GABA import (Planamente et al., 2012). Homologues of *Atu4243* are rarer in the *Agrobacterium* genus than homologues of *Atu2422* and could not even be found in some genomic species of *A. tumefaciens* (Planamente et al., 2012). Strikingly expression of *atu4243* is totally repressed by *atu4232*-encoded protein and mechanisms of derepression are so far unknown even if it would not be surprising that they involve a plant metabolite (Planamente et al., 2012). *A. tumefaciens* strains deficient in *Atu4232* and overexpressing *Atu4243* are also impaired in their ability to colonize tumors, presumably due to toxic effect following uncontrolled GABA import and conversion into the reactive oxygen species SSA (Planamente et al., 2013). Collectively these data illustrate the complexity of factors coming at play when searching to determine the impact of AttM on *A. tumefaciens* QS. A next step of special interest would be to critically examine plant metabolism in order to evaluate how the GABA, GBL and SSA produced in the tumors are likely to activate AttM in colonizing *A. tumefaciens* cells. Such studies might reveal that role of AttM varies according to the metabolic status of the plant hosts or that AttM can in certain circumstances contribute to delay Ti plasmid dissemination when conditions are unfavorable and concentrations of GABA and toxic SSA too high. In this sense testing the conjugation efficiency of an *A. tumefaciens* donor strain defective for *attM* in transgenic plant tumors which overaccumulate GABA could bring about valuable information.

Another interesting feature of the gene *attM* is its location on the companion At plasmid. Thus it is the only component involved in *A. tumefaciens* QS which is not present on the Ti plasmid. Ecologically this characteristic raises interesting questions and notably that to know whether the dissociation of the At and Ti plasmids could result in a QS deregulation. To date very little is known about the maintenance of the At plasmid in *A. tumefaciens* populations. No gene essential for the survival of *A. tumefaciens* C58 is carried by the At plasmid (Goodner et al., 2001, Wood et al., 2001). On the other hand the At plasmid encodes several functions which confer or may confer fitness advantage to agrobacteria in plant tumors (Haudecoeur et al., 2009b). Besides the degradation of butyrolactones and their derivatives

mentioned above, the At plasmid is involved in the assimilation of some opines of the Amadori family (ex. deoxyfructosyl-glutamate and deoxyfructosyl glutamine) (Vaudequin-Dransart et al., 1998, Baek et al., 2005). The At plasmid also seems to have a positive impact on the virulence capacity of *A. tumefaciens* (Matthysse et al., 2008). One can therefore reasonably assume that, like it is the case for Ti plasmids, the tumor compartment is the appropriate environment for dissemination of the At plasmid. It may even be possible that conjugation of At and Ti plasmids are related events, and that this mechanism would ensure the conservation of the reciprocally beneficial functions carried by the two replicons. Further investigations are still required to shed light on these aspects.

3.3. Plant responses to OC8HSLs

The interactions between *A. tumefaciens* and plant hosts are mediated by several factors, from the phenolic compounds disseminated at wound sites which direct the T-DNA transfer into plant cells to the opines produced in the tumor niche which control horizontal transfer of bacterial plasmids. It is therefore tempting to speculate about a possible implication of QS signal molecules in this generic trans-kingdom association, especially as in the recent years several lines of evidence showed that *N*-acyl-homoserine lactone molecules could induce specific responses in eukaryote cells (Williams, 2007). For instance, in axenic plant systems, exogenous supply of different homoserine lactone derivatives was found to modulate plant immunity and development although the outcomes drastically differed according to the nature of the tested QS molecules (Klein et al., 2009, Hartmann and Schikora, 2012).

To our knowledge only three studies investigated the impact of OC8HSL on plants. In the first one authors devised an inducible gene expression system based on TraR-OC8HSL activation which they introduced in *Arabidopsis thaliana* plants (You et al., 2006). To verify that induction with OC8HSL did not affect the transcriptome of the transformed plants, they extracted RNA from 12 day-old seedlings treated or not by foliar application with 1mM of OC8HSL for 24 hours and carried out microarray experiments using Agilent technology. Processing of the data prompted them to conclude that no gene was differentially expressed by presence of the QS signal. In a second paper, proteome analysis of *A. thaliana* roots grown for 24 hours in a hydroponic system in presence or not of 10 μ M of OC8HSL revealed

that levels of 53 proteins involved in metabolism of carbohydrate and energy, protein biosynthesis, defense responses and cytoskeleton remodeling, were significantly affected by the QS signal (Miao et al., 2012). The modest number of proteins differentially affected in this study suggests that plants sense *A. tumefaciens* QS signals only in a very restricted way. It is also noteworthy that in the two mentioned experiments the used concentrations of homoserine lactone derivatives were in the micro- and milli-molar range while concentrations at which QS molecules are active in *A. tumefaciens* are usually rather in the nano-molar range. Finally *A. thaliana* defense responses upon exposure to OC8HSL-producing *Rhizobium etli* were recently analyzed and the results established that this condition had no impact on the plant defense (Zarkani et al., 2013), thereby strengthening the notion that plants are immune to OC8HSLs.

4. Implications and selective advantages of the tightly regulated QS system in *A. tumefaciens*

Taken together the data presented above described a very sophisticated system in which *A. tumefaciens* QS action is not only placed under the strict control of the conjugal opine regulon but is also modulated by various adjacent components like antiactivator or lactonases (Fig. 2). Now we will discuss the implications of such hierarchical regulatory cascades and speculate about the selective advantages they may confer to *A. tumefaciens*.

4.1. Conjugation of Ti plasmid in opine-producing tumors

As mentioned previously the expression of *traR* gene requires the presence of conjugal opines. Therefore the QS system of *A. tumefaciens* functions only in host plants and only after transformed tissues have accumulated sufficient amount of conjugal opines. This restriction suggests that mature tumors are the most conducive environments for Ti plasmid dissemination and that, in these plant tumors, the selective advantages conferred to *A. tumefaciens* by harboring a functional Ti plasmid would overcome the associated costs of maintenance. Supporting these notions, it has been demonstrated that Ti plasmid imposed a

high fitness cost under conditions reminiscent of tumorigenesis but not anymore when opines were fully supplied (Platt et al., 2012a). It has also been observed that large proportion of *A. tumefaciens* cells present in mature tumors were devoid of Ti plasmids or harbored a mutated Ti plasmid (Fortin et al., 1993, Belanger et al., 1995). Thus the master control by conjugal opines would allow a large redistribution of functional Ti plasmids in an *A. tumefaciens* population where the pool of the replicon would be relatively low. The resulting selective advantages would be manifold. By amplifying the number of genes involved in opine assimilation, this mechanism would increase the colonizing fitness of the *A. tumefaciens* population, especially in older tumors where nutritive resources are scarcer. Multiplication of *vir* genes may also enhance aggressiveness of the bacteria and several reports already correlated an impairment of *A. tumefaciens* QS communication with a diminution of the crown gall symptoms (Haudecoeur et al., 2009b, Planamente et al., 2010, Planamente et al., 2012). At last the potential of migratory cells to initiate new infections would be increased. Interestingly Ti plasmid transfers to other bacterial species present in plant tumors are also possible and would thereby favor natural diversity. In this regard it is unfortunate that, even if the plant tumors are generally considered as privileged entry points for other bacteria, no information about composition of plant tumor microbiomes are available for the moment.

4.2. Does *A. tumefaciens* QS really measure a quorum of donor cells?

Since the finding that *A. tumefaciens* QS controlled Ti plasmid conjugation, it has been a nagging question to figure out the relevance of such a system in which donor cells could only monitor density of other donors already harboring an OC8HSL-producing Ti-plasmid. Indeed as conjugation cannot happen in a cell already containing a resident Ti plasmid (Cho et al., 2009), the risk of uselessly activating, at the quorum concentration, the horizontal transfer machinery in absence of sufficiently numerous recipient cells seems great. Nonetheless, as it was just evoked previously, master control of QS by conjugal opines might provide a nice way to circumvent this difficulty by allowing Ti plasmid conjugation only in an environment where the proportion of recipient cells would have extended. In this regard adjusting activation of the *tra* regulon according to a quorum of donor cells should maximize the

efficiency of Ti plasmid dissemination and would be fully sensible. In laboratory conditions all the data collected firmly sustain the notion that *A. tumefaciens* QS functions as a cell density dependent process. However these conditions, using most of the time cell cultures and constant concentration of conjugal opines to initiate QS, may reflect natural conditions only in a faraway fashion. In *V. fischeri* the quorum nature of the system is defined by a production of LuxR at relatively high basal level and by a concentration of OC6HSL which increases as a function of cell density till reaching the threshold of LuxR activation (Miller and Bassler, 2001). Contrastingly in *A. tumefaciens*, production of active TraR is subordinated to the presences of conjugal opines and of the antiactivator TraM. Taking full consideration of this characteristic implies that QS can be dissociated from cell density and that QS can promote Ti plasmid conjugation at different cell concentration as long as active TraR is present in appropriate amount. Another element of complexity here may be brought by the non-linear accumulation of OC8HSL in tumors. Indeed plant tumors are not homogenous structures; they emerged from wound sites and underwent neoplastic expansion (Aloni et al., 1995, Veselov et al., 2003). In these complex environments colonizing *A. tumefaciens* shall form different clusters of cells more or less isolated one from the other and located in surface or intercellular spaces where diffusion rate are different as well as temporally changing. It therefore appears unlikely that the OC8HSL concentration does mirror the cell density of the pathogen. Interestingly when simulating transition to quorum sensing in liquid cell cultures or biofilm, Goryachev et al., (2005) noticed that the first condition required a much higher threshold density than the second and they consequently came to the conclusion that *A. tumefaciens* QS served as a detector of biofilm formation rather than a sensor of cell concentration. If growing attention has been given in the last years to mechanisms of biofilm formation in *A. tumefaciens* (Tomlinson et al., 2010, Hibbing and Fuqua, 2012), no data so far have related them to QS and very little is known about biofilm formation in the context of interactions with plant host. But it would definitely be relevant for the bacteria to rest the coordination of Ti plasmid conjugation upon biofilm perception since these cell aggregates would constitute a very appropriate context for activation of the horizontal transfer machinery, either by minimizing the distances between donor and recipient cells or by acting as a shield against all kinds of physical perturbations.

4. Conclusion

In this review we described the *A. tumefaciens* TraI/TraR QS system and showed how it exquisitely regulated dissemination of Ti plasmids.

The QS systems of LuxI/LuxR type are generally thought to have originated early in evolution of Gram-negative Proteobacteria, with functional pairs of autoinducer synthases and receptors coevolving as regulatory cassettes, although in many cases these cassettes could also be inherited horizontally (Gray and Garey, 2001). In *A. tumefaciens* the TraI/TraR system and the related QS-regulated genes are well conserved in all nopaline- and octopine-type strains studied to date, suggesting that this regulatory mechanism has been anciently selected by the bacteria. The target genes of *A. tumefaciens* QS are involved in dissemination of Ti plasmids, both by replication and conjugation, but also in positive and negative feedback control with the OC8HSL-synthesis TraI enzyme and the TraM antiactivator. Different studies demonstrated that this last protein played a critical role in the implementation of the QS, even if it is not clear yet whether TraM is more relevant in delaying QS activation or in stabilizing and limiting QS activity.

At the molecular level the *A. tumefaciens* QS communication has been largely deciphered. Two crystal structures were notably obtained for TraR, in association with OC8HSL and DNA, providing first class access to the interaction specificities of the system. Thorough biochemical investigations of active and inactive complexes also allowed to better understand multimerization processes of the QS components.

Consistently with the particular phytopathogenic lifestyle of the bacteria, it appeared that *A. tumefaciens* employed an original QS scheme consisting in the addition of differently acquired regulatory elements. The most important of these elements, common to all *A. tumefaciens* strains, are the conjugal opines which accumulate in tumors as a consequence of plant transformation and are strictly required for *traR* expression and hence for QS initiation. In parallel, only specific to some *A. tumefaciens* strains, lactonases like AiiB and AttM or supplementary antiactivator like TrIR can also modulate QS responses. This complex network of horizontal and lateral regulation suggests that there would be an advantage for *A. tumefaciens* to restrain as much as possible the window of QS activation.

Assessing reasons why a biological system has been selected is always challenging because this selection hinges on a trade-off between advantages and drawbacks which cannot be fully appreciated in laboratory conditions. By perusing different hypothesis, we nonetheless indicated that the tight regulation of *A. tumefaciens* QS surely allowed the bacteria to disseminate the Ti plasmid in an environment where carrying the replicon would be clearly advantageous and at a moment when the energetic and physical factors would be ideal.

For the future, important questions still remain to be answered in order to complete our understanding of *A. tumefaciens* QS functioning during interactions with plant host. For instance how do conjugal opines and TraM cooperate to produce active TraR-OC8HSL dimers? Precise dosage of conjugal opines in the course of tumor development as well as advances in knowledge of *traM* regulation might help solve this interrogation. It would also be very interesting to better determine how *attM* can interfere with OC8HSL levels in tumors and what are the ecological implications regarding horizontal transfers of both At and Ti plasmids. At last analysis of bacterial populations found in natural tumors could deliver exciting results regarding abundance of potential Ti plasmid recipient cells. This kind of data might also unveil the extent of competition between the phytopathogen and other bacterial species present in plant tumors, thence leading to a novel appreciation of *A. tumefaciens* QS activity.

3. Bibliographie

Aloni, R., Pradel, K. & Ullrich, C. (1995) The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. *Planta*, 196, 597-605.

Baek, C. H., Farrand, S. K., Park, D. K., Lee, K. E., Hwang, W. & Kim, K. S. (2005) Genes for utilization of deoxyfructosyl glutamine (DFG), an amadori compound, are widely dispersed in the family Rhizobiaceae. *FEMS Microbiol Ecol*, 53, 221-33.

Beck Von Bodman, S., Hayman, G. T. & Farrand, S. K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 643-7.

Belanger, C., Canfield, M. L., Moore, L. W. & Dion, P. (1995) Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown gall tumors. *J Bacteriol*, 177, 3752-7.

Britton, M.T., Escobar, M.A. & Dandekar, A.M. (2008) The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. Pages 183-220 in *Agrobacterium from Biology to Biotechnology*. T. Tzfira, V. Citovsky, Springer, 750pp.

Carrier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y. & Faure, D. (2004) The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 951-7.

Chai, Y., Tsai, C. S., Cho, H. & Winans, S. C. (2007) Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL, and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 189, 3674-9.

Chai, Y. & Winans, S. C. (2004) Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol Microbiol*, 51, 765-76.

Chai, Y. & Winans, S. C. (2009) The chaperone GroESL enhances the accumulation of soluble, active TraR protein, a quorum-sensing transcription factor from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 191, 3706-11.

Chai, Y., Zhu, J. & Winans, S. C. (2001) TrIR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrIR:TraR dimers. *Mol Microbiol*, 40, 414-21.

Chen, G., Malenkos, J. W., Cha, M. R., Fuqua, C. & Chen, L. (2004) Quorum-sensing antiactivator TraM forms a dimer that dissociates to inhibit TraR. *Mol Microbiol*, 52, 1641-51.

- Chen, L., Chen, Y., Wood, D. W. & Nester, E. W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 184, 4838-45.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E. & Faure, D. (2006) GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7460-4.
- Cho, H., Pinto, U. M. & Winans, S. C. (2009) Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. *J Bacteriol*, 191, 3375-83.
- Cho, H. & Winans, S. C. (2005) VirA and VirG activate the Ti plasmid repABC operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14843-8.
- Cho, H. & Winans, S. C. (2007) TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, 63, 1769-82.
- Cho, K. & Winans, S. C. (1993) Altered-function mutations in the *Agrobacterium tumefaciens* OccR protein and in an OccR-regulated promoter. *J Bacteriol*, 175, 7715-9.
- Christie, P. J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 11, 1-3.
- Cook, D. M., Li, P. L., Ruchaud, F., Padden, S. & Farrand, S. K. (1997) Ti plasmid conjugation is independent of vir: reconstitution of the tra functions from pTiC58 as a binary system. *J Bacteriol*, 179, 1291-7.
- Costa, E. D., Chai, Y. & Winans, S. C. (2012) The quorum-sensing protein TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is susceptible to intrinsic and TraM-mediated proteolytic instability. *Mol Microbiol*, 84, 807-15.
- Costa, E. D., Cho, H. & Winans, S. C. (2009) Identification of amino acid residues of the pheromone-binding domain of the transcription factor TraR that are required for positive control. *Mol Microbiol*, 73, 341-51.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. & Nesme, X. (2010) Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by recA allele analysis: *Agrobacterium* recA diversity. *Microb Ecol*, 60, 862-72.
- Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., Keshelava, R., Tediashvili, M., Vainstein, A., Khmel, I., Szegedi, E. & Chernin, L. (2011) Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on

tomato plants. *J Appl Microbiol*, 110, 341-52.

De Cleene, M. & De Ley, J. (1976) The host range of crown gall. *Botanical Review*, 42, 390-466.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Muller, T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T. & Hedrich, R. (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell*, 18, 3617-34.

Dessaux, Y., Petit, A., and Tempe, J. (1992) Opines in Agrobacterium biology. Pages 109-136 in: Molecular signals in plant-microbe communications. D. P. S. Vermaed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 521 pp.

Dessaux, Y, Petit, A., Farrand, S.K., Murphy, P.J. (1998) Opines and opine-like molecules involved in Plant-Rhizobiaceae Interactions. Pages 173-197 in The Rhizobiaceae, Molecular biology of model plant-associated bacteria. H.P. Spaik, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Academic Publisher, 566 pp.

Ditt, R. F., Nester, E. & Comai, L. (2005) The plant cell defense and Agrobacterium tumefaciens. *FEMS Microbiol Lett*, 247, 207-13.

Ditt, R. F., Kerr, K. F., De Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L. & Nester, E. W. (2006) The Arabidopsis thaliana transcriptome in response to Agrobacterium tumefaciens. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 665-81.

Dunoyer, P., Himber, C. & Voinnet, O. (2006) Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. *Nat Genet*, 38, 258-63.

Eberhard, A. (1972) Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol*, 109, 1101-5.

Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C. W., Stingl, N., Mueller, M., Hartung, W., Hedrich, R. & Deeken, R. (2007) A central role of abscisic acid in drought stress protection of Agrobacterium-induced tumors on Arabidopsis. *Plant Physiol*, 145, 853-62.

Ellis, J. G., Kerr, A., Petit, A. & Tempe, J. (1982) Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids "The role of agrocinopines. *Molecular and General Genetics MGG*, 186, 269-274.

Farrand, S. K., Hwang, I. & Cook, D. M. (1996) The tra region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *J Bacteriol*, 178, 4233-47.

Flores-Mireles, A. L., Eberhard, A. & Winans, S. C. (2012) Agrobacterium tumefaciens can obtain sulphur from an opine that is synthesized by octopine synthase using S-methylmethionine as a substrate. *Mol Microbiol*, 84, 845-56.

- Fortin, C., Marquis, C., Nester, E. W. & Dion, P. (1993) Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *J Bacteriol*, 175, 4790-9.
- Frederix, M. & Downie, A. J. (2011) Quorum sensing: regulating the regulators. *Adv Microb Physiol*, 58, 23-80.
- Fuqua, C. & Winans, S. C. (1996a) Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol*, 178, 435-40.
- Fuqua, C. & Winans, S. C. (1996b) Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the traR gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol Microbiol*, 20, 1199-210.
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, 50, 727-51.
- Fuqua, W. C. & Winans, S. C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, 176, 2796-806.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 176, 269-75.
- Gelencser, Z., Choudhary, K. S., Coutinho, B. G., Hudaiberdiev, S., Galbats, B., Venturi, V. & Pongor, S. (2012) Classifying the topology of AHL-driven quorum sensing circuits in proteobacterial genomes. *Sensors*, 12, 5432-44.
- Gelvin, S. B. (2012) Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's Journey to the Host Genome. *Front Plant Sci*, 3, 26.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. & Slater, S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2323-8.
- Goryachev, A. B., Toh, D. J., Wee, K. B., Lee, T., Zhang, H. B. & Zhang, L. H. (2005) Transition to quorum sensing in an *Agrobacterium* population: A stochastic model. *PLoS Comput Biol*, 1, 16.
- Gould, T. A., Schweizer, H. P. & Churchill, M. E. (2004) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Mol Microbiol*, 53, 1135-46.
- Gray, K. M. & Garey, J. R. (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology*, 147, 2379-87.

- Habeeb, L. F., Wang, L. & Winans, S. C. (1991) Transcription of the octopine catabolism operon of the *Agrobacterium* tumor-inducing plasmid pTiA6 is activated by a LysR-type regulatory protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 4, 379-85.
- Hartmann, A. & Schikora, A. (2012) Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. *J Chem Ecol*, 38, 704-13.
- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B. J., Morera, S. & Faure, D. (2009a) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14587-92.
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009b) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.
- Hibbing, M. E. & Fuqua, C. (2012) Inhibition and dispersal of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms by a small diffusible *Pseudomonas aeruginosa* exoproduct(s). *Arch Microbiol*, 194, 391-403.
- Hwang, I., Cook, D. M. & Farrand, S. K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J Bacteriol*, 177, 449-58.
- Hwang, I., Li, P. L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E. & Farrand, S. K. (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4639-43.
- Hwang, I., Smyth, A. J., Luo, Z. Q. & Farrand, S. K. (1999) Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Mol Microbiol*, 34, 282-94.
- Kerr, A., Manigault, P. & Tempe, J. (1977) Transfer of virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*. *Nature*, 265, 560-561.
- Khan, S. R. & Farrand, S. K. (2009) The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol*, 191, 1320-9.
- Kim, H. & Farrand, S. K. (1997) Characterization of the acc operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84. *J Bacteriol*, 179, 7559-72.
- Klein, I., Von Rad, U. & Durner, J. (2009) Homoserine lactones: do plants really listen to bacterial talk? *Plant Signal Behav*, 4, 50-1.

Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A. & Citovsky, V. (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet*, 22, 29-37.

Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Gueguen, L., Daubin, V., Muller, D. & Nesme, X. (2011) Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol Evol*, 3, 762-81.

Lee, C. W., Efetova, M., Engelmann, J. C., Kramell, R., Wasternack, C., Ludwig-Muller, J., Hedrich, R. & Deeken, R. (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21, 2948-62.

Li, P. L., Everhart, D. M. & Farrand, S. K. (1998) Genetic and sequence analysis of the pTiC58 trb locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J Bacteriol*, 180, 6164-72.

Li, P. L. & Farrand, S. K. (2000) The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the repABC family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J Bacteriol*, 182, 179-88.

Liang, Z. & Tzfira, T. (2013) In vivo formation of double-stranded T-DNA molecules by T-strand priming. *Nat Commun*, 4.

Liu, D., Thomas, P. W., Momb, J., Hoang, Q. Q., Petsko, G. A., Ringe, D. & Fast, W. (2007) Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry*, 46, 11789-99.

Luo, Z. Q. & Farrand, S. K. (1999) Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9009-14.

Luo, Z. Q., Qin, Y. & Farrand, S. K. (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem*, 275, 7713-22.

Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Qin, Y. & Farrand, S. K. (2003a) Mutational analysis of TraR. Correlating function with molecular structure of a quorum-sensing transcriptional activator. *J Biol Chem*, 278, 13173-82.

Luo, Z. Q., Su, S. & Farrand, S. K. (2003b) In situ activation of the quorum-sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acyl-homoserine lactone ligands: kinetics and consequences. *J Bacteriol*, 185, 5665-72.

- Matthysse, A. G., Jaeckel, P. & Jeter, C. (2008) attG and attC mutations of *Agrobacterium tumefaciens* are dominant negative mutations that block attachment and virulence. *Can J Microbiol*, 54, 241-7.
- Miao, C., Liu, F., Zhao, Q., Jia, Z. & Song, S. (2012) A proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* seedling responses to 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signal. *Biochem Biophys Res Commun*, 427, 293-8.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 165-99.
- More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A. & Winans, S. C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, 272, 1655-8.
- Morton, E. R., Merritt, P. M., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2013) Large Deletions in the pAtC58 Megaplasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Can Confer Reduced Carriage Cost and Increased Expression of Virulence Genes. *Genome Biol Evol*, 5, 1353-64.
- Mougel, C., Thioulouse, J., Perriere, G. & Nesme, X. (2002) A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 573-86.
- Nair, G. R., Liu, Z. & Binns, A. N. (2003) Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. *Plant Physiol*, 133, 989-99.
- Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, 104, 313-22.
- Oger, P. & Farrand, S. K. (2001) Co-evolution of the agrocinopine opines and the agrocinopine-mediated control of TraR, the quorum-sensing activator of the Ti plasmid conjugation system. *Mol Microbiol*, 41, 1173-85.
- Otten, L., Canaday, J., Gerard, J. C., Fournier, P., Crouzet, P. & Paulus, F. (1992) Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids--a review. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 279-87.
- Pappas, K. M. (2008) Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid*, 60, 89-107.
- Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2003a) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol*, 48, 1059-73.
- Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2003b) The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid repABC operon. *Mol Microbiol*, 49, 441-55.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4360-5.

- Pavlovkin, J., Okamoto, H., Wachter, R., Lauchli, A. & Ullrich, C. I. (2002) Evidence for high activity of xylem parenchyma and ray cells in the interface of host stem and *Agrobacterium tumefaciens* induced tumours of *Ricinus communis*. *J Exp Bot*, 53, 1143-54.
- Pereira, C. S., Thompson, J. A. & Xavier, K. B. (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 156-81.
- Petit, A., Tempe, J., Kerr, A., Holsters, M., Van Montagu, M. & Schell, J. (1978) Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature*, 271, 570-572.
- Pinto, U. M. & Winans, S. C. (2009) Dimerization of the quorum-sensing transcription factor TraR enhances resistance to cytoplasmic proteolysis. *Mol Microbiol*, 73, 32-42.
- Pionnat, S., Keller, H., Hericher, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X. & Poncet, C. (1999) Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4197-206.
- Piper, K. R., Beck Von Bodman, S. & Farrand, S. K. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, 362, 448-50.
- Piper, K. R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I. & Farrand, S. K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 32, 1077-89.
- Piper, K. R. & Farrand, S. K. (2000) Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J Bacteriol*, 182, 1080-8.
- Pitzschke, A. & Hirt, H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *Embo J*, 29, 1021-32.
- Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Morera, S. & Faure, D. (2012) Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 86, 1085-99.
- Planamente, S., Morera, S. & Faure, D. (2013) In planta fitness-cost of the Atu4232-regulon encoding for a selective GABA-binding sensor in *Agrobacterium*. *Commun Integr Biol*, 6, 23692.
- Planamente, S., Vigouroux, A., Mondy, S., Nicaise, M., Faure, D. & Morera, S. (2010) A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by structure-function analysis of the periplasmic binding protein Atu2422 in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biol Chem*, 285, 30294-303.
- Platt, T. G., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2012a) A cooperative virulence plasmid imposes a high fitness cost under conditions that induce pathogenesis. *Proc Biol Sci*, 279, 1691-9.

Platt, T. G., Fuqua, C. & Bever, J. D. (2012b) Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen. *Evolution*, 66, 1953-65.

Pulawska, J. & Sobiczewski, P. (2005) Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *J Appl Microbiol*, 98, 710-21.

Pulawska, J. (2010) Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp.. *Journal of Plant Pathology*, 92, 87-98.

Qin, Y., Keenan, C. & Farrand, S. K. (2009) N- and C-terminal regions of the quorum-sensing activator TraR cooperate in interactions with the alpha and sigma-70 components of RNA polymerase. *Mol Microbiol*, 74, 330-46.

Qin, Y., Luo, Z. Q. & Farrand, S. K. (2004a) Domains formed within the N-terminal region of the quorum-sensing activator TraR are required for transcriptional activation and direct interaction with RpoA from *agrobacterium*. *J Biol Chem*, 279, 40844-51.

Qin, Y., Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Beck Von Bodman, S. & Farrand, S. K. (2000) Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J*, 19, 5212-21.

Qin, Y., Smyth, A. J., Su, S. & Farrand, S. K. (2004b) Dimerization properties of TraM, the antiactivator that modulates TraR-mediated quorum-dependent expression of the Ti plasmid tra genes. *Mol Microbiol*, 53, 1471-85.

Qin, Y., Su, S. & Farrand, S. K. (2007) Molecular basis of transcriptional antiactivation. TraM disrupts the TraR-DNA complex through stepwise interactions. *J Biol Chem*, 282, 19979-91.

Rezmer, C., Schlichting, R., Wachter, R. & Ullrich, C. I. (1999) Identification and localization of transformed cells in *agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta*, 209, 399-405.

Savka, M. A. & Farrand, S. K. (1997) Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nat Biotechnol*, 15, 363-8.

Shams, M., Campillo, T., Lavire, C., Muller, D., Nesme, X. and Vial, L. (2012)

Rapid and Efficient Methods to Isolate, Type Strains and Determine Species of *Agrobacterium* spp. in Pure Culture and Complex Environments, Biochemical Testing, Dr. Jose C. Jimenez-Lopez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0249-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/rapid-and-efficient-methods-to-isolate-type-strains-and-determine-species-of-agrobacterium-spp-in-pu>

Stevens, A. M., Schuster, M. & Rumbaugh, K. P. (2012) Working together for the common good: cell-cell communication in bacteria. *J Bacteriol*, 194, 2131-41.

- Su, S., Khan, S. R. & Farrand, S. K. (2008) Induction and loss of Ti plasmid conjugative competence in response to the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal. *J Bacteriol*, 190, 4398-407.
- Swiderska, A., Berndtson, A. K., Cha, M. R., Li, L., Beaudoin, G. M., 3rd, Zhu, J. & Fuqua, C. (2001) Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator. *J Biol Chem*, 276, 49449-58.
- Tomlinson, A. D., Ramey-Hartung, B., Day, T. W., Merritt, P. M. & Fuqua, C. (2010) *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. *Microbiology*, 156, 2670-81.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. & Citovsky, V. (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet*, 20, 375-83.
- Ullrich, C. I. & Aloni, R. (2000) Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot*, 51, 1951-60.
- Uraji, M., Suzuki, K. & Yoshida, K. (2001) A new method for construction of Ti plasmid-less strains in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res Suppl*, 1, 173-4.
- Vannini, A., Volpari, C. & Di Marco, S. (2004) Crystal structure of the quorum-sensing protein TraM and its interaction with the transcriptional regulator TraR. *J Biol Chem*, 279, 24291-6.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. & Marco, S. D. (2002) The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J*, 21, 4393-401.
- Vaudequin-Dransart, V. R., Petit, A., Chilton, W. S. & Dessaux, Y. (1998) The Cryptic Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Cointegrates with the Ti Plasmid and Cooperates for Opine Degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 583-591.
- Veena, Jiang, H., Doerge, R. W. & Gelvin, S. B. (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J*, 35, 219-36.
- Veselov, D., Langhans, M., Hartung, W., Aloni, R., Feussner, I., Gotz, C., Veselova, S., Schlomski, S., Dickler, C., Bachmann, K. & Ullrich, C. I. (2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta*, 216, 512-22.
- Wachter, R., Langhans, M., Aloni, R., Gotz, S., Weilmunster, A., Koops, A., Temguia, L., Mistrik, I., Pavlovkin, J., Rascher, U., Schwalm, K., Koch, K. E. & Ullrich, C. I. (2003) Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 133, 1024-37.

- Wang, C., Zhang, H. B., Chen, G., Chen, L. & Zhang, L. H. (2006a) Dual control of quorum sensing by two TraM-type antiactivators in *Agrobacterium tumefaciens* octopine strain A6. *J Bacteriol*, 188, 2435-45.
- Wang, C., Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2006b) Succinic semialdehyde couples stress response to quorum-sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, 62, 45-56.
- Watson, W. T., Murphy, F. V. T., Gould, T. A., Jambeck, P., Val, D. L., Cronan, J. E., Jr., Beck Von Bodman, S. & Churchill, M. E. (2001) Crystallization and rhenium MAD phasing of the acyl-homoserinelactone synthase Esal. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57, 1945-9.
- White, C. E. & Winans, S. C. (2005) Identification of amino acid residues of the *Agrobacterium tumefaciens* quorum-sensing regulator TraR that are critical for positive control of transcription. *Mol Microbiol*, 55, 1473-86.
- White, C. E. & Winans, S. C. (2007) The quorum-sensing transcription factor TraR decodes its DNA binding site by direct contacts with DNA bases and by detection of DNA flexibility. *Mol Microbiol*, 64, 245-56.
- Williams, P. (2007) *Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world*, Microbiology. 2007 Dec;153(Pt 12):3923-38.
- Wilms, I., Voss, B., Hess, W. R., Leichert, L. I. & Narberhaus, F. (2011) Small RNA-mediated control of the *Agrobacterium tumefaciens* GABA binding protein. *Mol Microbiol*, 80, 492-506.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutyavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V. & Nester, E. W. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-23.
- You, Y. S., Marella, H., Zentella, R., Zhou, Y., Ulmasov, T., Ho, T. H. & Quatrano, R. S. (2006) Use of bacterial quorum-sensing components to regulate gene expression in plants. *Plant Physiol*, 140, 1205-12.
- Young, J.M. (2008) *Agrobacterium-Taxonomy of plant-pathogenic Rhizobium species*. Pages 183-220 in *Agrobacterium from Biology to Biotechnology*. T. Tzfira, V. Citovsky, Springer, 750pp.
- Yuan, Z. C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K. F. & Nester, E. W. (2008) Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid

and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and Agrobacterium--plant co-evolution. *Cell Microbiol*, 10, 2339-54.

Zarkani, A. A., Stein, E., Rohrich, C. R., Schikora, M., Evguenieva-Hackenberg, E., Degenkolb, T., Vilcinskis, A., Klug, G., Kogel, K. H. & Schikora, A. (2013) Homoserine lactones influence the reaction of plants to rhizobia. *Int J Mol Sci*, 14, 17122-46.

Zechner, E. L., Lang, S. & Schildbach, J. F. (2012) Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 1073-87.

Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2002a) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4638-43.

Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A. & Tate, M. E. (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature*, 362, 446-8.

Zhang, R. G., Pappas, K. M., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J. M., Anderson, J. C., Bashkin, J. K., Winans, S. C. & Joachimiak, A. (2002b) Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature*, 417, 971-4.

Zhu, J., Beaber, J. W., More, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A. & Winans, S. C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 180, 5398-405.

Zhu, J. & Winans, S. C. (1998) Activity of the quorum-sensing regulator TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is inhibited by a truncated, dominant defective TraR-like protein. *Mol Microbiol*, 27, 289-97.

Zhu, J. & Winans, S. C. (1999) Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4832-7.

Zhu, J. & Winans, S. C. (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1507-12.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T. & Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125, 749-60.

Chapitre II. Fonctions régulées par les agrocinopines chez *A. tumefaciens* C58

1. Contexte scientifique

Le processus infectieux d'*A. tumefaciens* C58 conduit à l'accumulation dans les tumeurs végétales d'opines telles que la nopaline et les agrocinopines. Plusieurs études ont par le passé mis en évidence que les cellules d'*A. tumefaciens* C58 pouvaient assimiler ces deux composés qu'elles contribuent à synthétiser. Il a également été démontré comment les agrocinopines, jouant le rôle d'opines conjugatives, pouvaient initier le système quorum-sensing (QS) d'*A. tumefaciens* C58, en inhibant le répresseur transcriptionnel AccR, et comment elles contrôlaient de la sorte la conjugaison et la réplication végétative du plasmide Ti. Par ailleurs les agrocinopines induisent l'expression du gène *aiiB* codant pour une lactonase qui impacte négativement la signalisation QS. Les agrocinopines remplissent donc deux fonctions apparemment paradoxales : d'une part elles sont nécessaires pour activer le QS d'*A. tumefaciens*, d'autre part elles promeuvent l'expression d'un gène anti-QS. Cette situation illustre en fait la complexité des processus régulés par les agrocinopines chez *A. tumefaciens* et souligne la nécessité de mieux caractériser ces derniers afin d'élargir notre compréhension des interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes au sein des tumeurs.

Sept types différents de systèmes de sécrétion ont été identifiés à ce jour. Parmi ceux-ci les systèmes de sécrétion de type 4 (T4SS) se caractérisent par la diversité non seulement des substrats qu'ils sont capables de transporter (ADN, protéines ou complexes ADN-protéines) mais également des environnements dans lesquels ils peuvent sécréter leurs substrats (cellules réceptrices ou milieu extracellulaire). Les T4SS ont principalement été étudiés chez les bactéries à Gram-négative (par exemple *Helicobacter pylori*, *Escherichia Coli*, *Legionella* spp. ou *A. tumefaciens*). *A. tumefaciens* possède 3 T4SS distincts. Le T4SS_{ADN-T} assure le transfert de l'ADN-T depuis la cellule procaryote vers la cellule eucaryote hôte. Le T4SS_{pTi} et le T4SS_{pAt} sont impliqués dans les processus conjugatifs du plasmide Ti et du plasmide At, respectivement. Différentes analyses tendent à montrer que ces trois systèmes ne sont pas redondants fonctionnellement. Les régulations des systèmes T4SS_{ADN-T} et T4SS_{pTi} ont par

ailleurs été largement étudiées. A l'opposé peu de choses est connu sur les mécanismes d'activation du système T4SS_{pAt}, spécialement dans le contexte des interactions entre *A. tumefaciens* et la plante hôte.

2. Présentation des travaux

Notre intérêt initial ici portait sur les réponses transcriptionnelles globales d'*A. tumefaciens* aux agrocinopines et sur les implications biologiques de ces réponses. Comme les agrocinopines ne sont pas disponibles commercialement et sont difficiles à synthétiser, nous avons tiré profit d'une lignée *accR* mutante d'*A. tumefaciens* C58 comme alternative de choix pour l'étude des réponses aux agrocinopines modulées par le répresseur AccR. Combinant séquençage ADN à haut débit et analyses transcriptomiques, nous avons ainsi pu définir précisément le régulon AccR d'*A. tumefaciens* C58. Nos résultats montrent qu'en plus du QS et de l'assimilation des agrocinopines, AccR contrôle l'expression des gènes codant pour le T4SS_{pAt} et pour NocR, un régulateur des gènes de catabolisme de la nopaline.

Des tests de détection d'opines et de conjugaison *in planta* confirmèrent que la consommation de nopaline et la conjugaison du plasmide At étaient exacerbées dans des conditions où l'activité répressive d'AccR était levée. De plus en comparant les fréquences de conjugaison des plasmides Ti et At *in vitro* ainsi que dans des tumeurs végétales, nous avons pu mettre en évidence que la co-régulation par AccR de ces conjugaisons promouvait le co-transfert des deux réplicons. Enfin les avantages que ce co-transfert pourrait conférer à *A. tumefaciens* ont été discutés à la lumière notamment des fonctions connues du plasmide At au cours des interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article révisé, soumis à publication dans la revue « *Molecular Microbiology* ».

3. Contributions

S. Planamente a réalisé les cultures cellulaires et les extractions d'ARN préalables aux analyses transcriptomiques. S. Mondy a effectué les analyses des données du séquençage ADN à haut débit. Comme spécifié dans la partie « Material and Methods », les analyses

transcriptomiques et de séquençage ont été effectuées en collaboration avec des plateformes techniques du Génopole et d'Imagif respectivement. Les mutants d'*A. tumefaciens* utilisés dans cette étude étaient déjà disponibles dans le laboratoire. Le texte a bénéficié des relectures critiques d'Y. Dessaux, D. Faure et S. Morera.

Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumor

Abstract

The plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58 harbors three independent type IV secretion (T4SS) machineries. T4SS_{T-DNA} promotes the transfer of the T-DNA to host plant cells, provoking tumor development and accumulation of opines such as nopaline and agrocinopines. T4SS_{pTi} and T4SS_{pAt} control the conjugation among agrobacteria of the Ti and At plasmids, respectively. Activity of T4SS_{pTi} is controlled by the agrocinopine-responsive transcriptional repressor AccR. In this work, we compared the genome-wide transcriptional profile of the wild-type *A. tumefaciens* strain C58 with that of its *accR* KO-mutant for delineating the AccR regulon. In addition to the genes that encode agrocinopine catabolism and T4SS_{pTi}, we found that AccR also regulated genes coding for nopaline catabolism and T4SS_{pAt}. Further opine detection and conjugation assays confirmed the enhancement of nopaline consumption and At plasmid conjugation frequency in *accR*. Moreover, co-regulation of the T4SS_{pTi} and T4SS_{pAt} correlated with the co-transfer of the At and Ti plasmids both *in vitro* and in plant tumors. Finally, unlike T4SS_{pTi}, T4SS_{pAt} activation does not require quorum-sensing. Overall this study highlights the regulatory interplays between opines, At and Ti plasmids that contribute to a concerted dissemination of the two replicons in bacterial populations colonizing the plant tumor.

Introduction

The genome of the phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* is composed of a linear chromosome, a circular chromosome as well as two dispensable plasmids, the tumor-inducing (Ti) plasmid and the 'Agrobacterium tumefaciens' (At) plasmid (Goodner *et al.*, 2001, Wood *et al.*, 2001). *A. tumefaciens* is well known for its ability to transform plant cells

upon transfer of a piece of DNA, the T-DNA, which is part of the Ti plasmid. This leads to the emergence of plant tumors that are the symptoms of the crown gall disease. *Agrobacterium* cells can also transfer Ti or At plasmid DNA to other bacteria via conjugation. These horizontal gene transfers from *A. tumefaciens* to plant and bacterial cells utilize three distinct type IV secretion systems (T4SSs). Two of them are borne on the Ti plasmid: the T4SS_{T-DNA} which is encoded by some *vir* genes and allows the transfer of the T-DNA from *A. tumefaciens* to plant cells (Christie, 2004), and the T4SS_{pTi} which is encoded by the *tra*_{pTi} regulon and is required for the conjugation of the Ti plasmid (Li *et al.*, 1998). The At plasmid harbors a third T4SS_{pAt} that is involved in its own conjugation (Chen *et al.*, 2002).

The expression of genes that encode the T4SS_{T-DNA} is tightly regulated by plant compounds such as phenolics and sugars. The expression of the *vir* genes allows the assembly of T4SS_{T-DNA} and the transfer of the T-DNA from virulent agrobacteria to plant cells (Gelvin, 2006; Pitzschke and Hirt, 2010). Once integrated into the plant genome, the T-DNA drives the synthesis of phytohormones which are responsible for the neoplastic development of tumors (Ullrich and Aloni, 2000; Veselov *et al.*, 2003). T-DNA also encodes the production of organic compounds, called opines, which are used as nutrients and regulatory signals by agrobacteria colonizing the tumor tissues (Dessaux *et al.*, 1992). The T-DNA genes *nos* and *acs* of the model strain *A. tumefaciens* C58 code for the synthesis of the opines nopaline and agrocinopines (A and B) respectively (Depicker *et al.*, 1982, Joos *et al.*, 1983).

Nopaline is a condensate of arginine and alpha-ketoglutarate while agrocinopines A and B are phosphodiester derivatives of sugars (Lippincott *et al.*, 1973; Ryder *et al.*, 1984). The assimilation pathways of nopaline (*noc* genes) and agrocinopines (*acc* genes) are encoded by the Ti plasmid of *A. tumefaciens* C58. The *noc* operons encode an ABC-transporter of nopaline as well as several enzymes (nopaline oxidases, arginase, nopaline dehydrogenase, and ornithine cyclodeaminase) responsible for the degradation of nopaline into proline (Schardl and Kado, 1983; Farrand and Dessaux, 1986; Sans *et al.*, 1987; Zanker *et al.*, 1992; Zanker *et al.*, 1994). The *noc* operons are nopaline-inducible and regulated by NocR, a transcriptional repressor of the LysR family (Kreusch *et al.*, 1995; Marincs and White, 1993; Marincs and White, 1995; von Lintig *et al.*, 1994; von Lintig *et al.*, 1991). Comparatively the *acc* region is composed of eight genes, namely *accRABCDEFGF*, all under the control of a single promoter. The genes *accABCDE* code for components of an ABC-transporter, while

accFG are involved in the degradation of the agrocinopines (Hayman and Farrand, 1988; Kim and Farrand, 1997). Finally AccR protein acts as a negative transcriptional regulator of the *acc* operon (Beck von Bodman *et al.*, 1992). The repression exerted by AccR on the *acc* operon can be released by the agrocinopines or phosphate starvation (Kim *et al.*, 2008).

The expression of the T4SS_{pTi} is tightly regulated by opines and the quorum-sensing signal 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8HSL). In the presence of agrocinopines, the master regulator AccR of *A. tumefaciens* C58 allows the de-repression of the *arc* operon which comprises the *traR* gene, a member of the *luxR* family (Piper *et al.*, 1999). Once bound by OC8HSL, TraR activates the transcription of the *rep* operon as well as that of the *tra* and *trb* operons (encoding T4SS_{pTi}) hence stimulating replication and conjugation of the Ti plasmid (Cho and Winans, 2007). Through this two-step regulation by AccR and TraR, the conjugation of the Ti plasmid can only occur at high cell density, in agrocinopine-accumulating plant tumors. Remarkably, additional controls delaying the Ti plasmid conjugation are operated by TraM that reduces the activity of TraR, and by the OC8HSL-cleaving lactonases BlcC and AiiB (Hwang *et al.*, 1995; Haudecoeur and Faure, 2010).

Little is known about the regulation of the T4SS_{pAt}, or the ecological functions of the At plasmid. The size of the At plasmid represents 10% (543 kb) of the *A. tumefaciens* C58 genome (Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001). Although it does not contain any essential genes, the At plasmid is present in almost all the virulent (harboring the Ti plasmid) and avirulent (defective for Ti plasmid) *A. tumefaciens* isolates (Lassalle *et al.*, 2011). Some reports mention that the At plasmid has a positive impact on *A. tumefaciens* virulence, suggesting a possible cooperation between At and Ti plasmid encoded genes (Nair *et al.*, 2003; Matthysse *et al.*, 2008). Moreover a mutant defective for the At plasmid-encoded lactonase BlcC was affected in fitness during the plant tumor colonization (Haudecoeur *et al.*, 2009), thereby highlighting the fact that At plasmid may play several functions in the course of interaction with plant hosts. The T4SS_{pAt} has been investigated so far in a single study in which all experiments were performed *in vitro* (Chen *et al.*, 2002). Consequently, the possible role of plant host in the regulation of the T4SS_{pAt} genes and transfer of the At plasmid is still unknown.

In this work, we investigated the role of the master-regulator AccR by comparative transcriptomics of the wild-type *A. tumefaciens* C58 vs. a constructed *accR* KO-mutant, and

by whole-genome sequencing to evaluate the relative abundance of the different replicons (chromosomes and plasmids). This work allowed the delineation of the AccR-regulon that encompasses not only the quorum-sensing regulated genes of the T4SS_{pTi} but also genes coding for the nopaline regulator NocR and the T4SS_{pAt} machinery. In addition the transfer frequencies of Ti and At plasmids were measured *in vitro* and *in planta*, revealing that the simultaneous acquisition of the two plasmids by recipient agrobacteria was enhanced when AccR repression was relieved in donor cells, either due to a mutation or the action of the agrocinopines accumulating in plant tumors.

Results

The *A. tumefaciens* *accR* mutant harbors several copies of the Ti plasmid and constitutively produces quorum-sensing signals

To investigate the role of the agrocinopine-responsive regulator AccR in *A. tumefaciens* C58, we used a KO-mutant in which a gentamycin resistance cassette (Gm) has been inserted into the *accR* gene (Haudecoeur *et al.*, 2009). According to the literature (Beck von Bodman *et al.*, 1992; Piper and Farrand, 2000), both the production of the quorum-sensing signal and the Ti plasmid transfer are expected to be enhanced in an *accR* mutant. The OC8HSL signal and Ti plasmid conjugation were quantified *in vitro* and *in planta*, using *Arabidopsis thaliana* Col-0 as a host plant. In conjugation assays, the *A. tumefaciens* derivative C00 which is devoid of Ti and At plasmids was used as a recipient cell. The donor strains harbored either the Ti plasmid carrying *accR*::Gm mutation (pTi*accR*::Gm) or the control plasmid (pTi::Gm) carrying the wt *accR* allele. Both *in vitro* and *in planta*, the *accR* mutant overproduced OC8HSL by two orders of magnitude (Fig. 1A) when compared to the wild-type. In the agrocinopine-free cultures, no Ti plasmid transconjugants could be obtained using the control plasmid pTi::Gm while the transfer frequency reached $5 \cdot 10^{-4}$ transconjugants per donor cell (Trans/D) with pTi*accR*::Gm (Fig. 1B). In the *A. tumefaciens*-induced plant tumors (Fig. 1B), we were able to obtain pTi::Gm transconjugants because of agrocinopines accumulation in the plant tissues, but the transfer frequency of pTi::Gm ($2 \cdot 10^{-4}$ Trans/D/mg) remained one hundred times lower than that of pTi*accR*::Gm ($2 \cdot 10^{-2}$ Trans/D/mg).

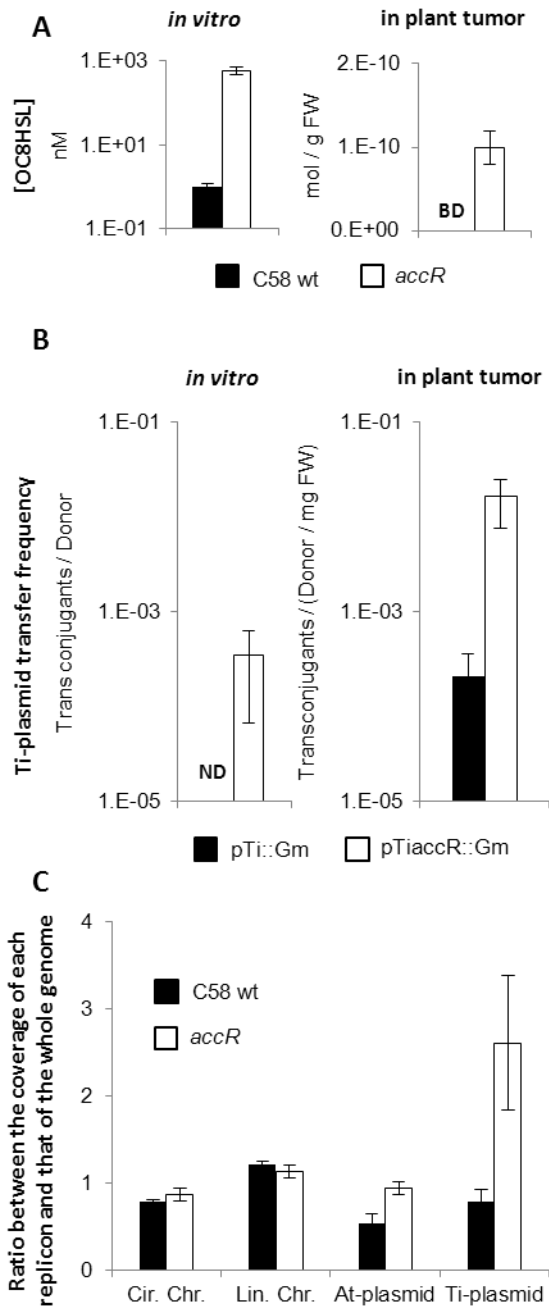


Figure 1: Characteristics of the *A. tumefaciens accR* mutant. **A** Quantification of the OC8HSLs produced by *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* *in vitro* and in 18dpi *Arabidopsis thaliana* plant tumors. BD: below detection (< 1 pmol / g FW). **B** Transfer frequency of *A. tumefaciens* pTi::Gm and pTiaccR::Gm *in vitro* and in 18dpi *A. thaliana* tumors (ND: not detected). **C** Copy-number of replicons was calculated in *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* cell cultures using the mean coverage values of the DNaseq (Cir. Chr.: circular chromosome; Lin. Chr.: linear chromosome). Mean values and SD from two independent experiments are presented.

The relative copy-numbers of the four replicons (circular and linear chromosomes, Ti and At plasmids) were quantified using high-throughput sequencing of genomic DNA from cell cultures of wild-type *A. tumefaciens* C58 (termed C58 wt) and its *accR* derivative. Using the sequencing data, we calculated a coverage value for the whole genome as well as a coverage value for each replicon. Comparing these values to each other allowed us to conclude that both circular and linear chromosomes were on average present at a similar copy-number in the

cell cultures of *A. tumefaciens* C58 wt and its *accR* derivative. We also observed that on average the copy-number of the At plasmid was slightly higher in the *accR* mutant strain than in the C58 wt, suggesting that AccR derepression may lead to an increase of At plasmid copies. In contrast, the *accR* mutant strain clearly harbored more copies of the Ti plasmid than does C58 wt. Based on our data we estimated that the *accR* mutant had three copies of

Ti plasmid while the C58 wt strain had only one (Fig. 1C). These data are consistent with previous reports showing that the activation of QS led to a three to sevenfold increase in the copy-number of Ti plasmid (Li and Farrand, 2000, Pappas and Winans, 2003).

Transcriptomics defined *AccR* as a regulator of quorum-sensing signal production, induction of T4SS_{pTi}, T4SS_{pAt} and assimilative pathway of nopaline

Transcriptomes of the *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* mutant were compared using Nimblegen microarrays. Only genes with a fold change (Fch) value above 3 and a P value below 0.05 were considered in this analysis. Moreover, since the *accR* mutant harbored three copies of the Ti plasmid, Fch values of the Ti plasmid genes were corrected by a factor of three. Using these filters, 70 differentially-expressed genes were identified (Table S1), among which 60 were upregulated in the *accR* background. Noticeably, most of the *accR*-regulated genes (63 out of 70) were present on the Ti (39 genes) and At (24 genes) plasmids, highlighting a synchronized regulation of functions encoded by these two replicons (Fig. 2A). Seven differentially-expressed genes of the Ti and At plasmids were further analyzed by quantitative RT-qPCR (Fig. 2B). A slight difference between RT-qPCR and microarray values was observed for the two genes *atu6131* (*traM*) and *atu6043* (*repA*) in contrast to the five other genes *atu5108* (*traG_{pAt}*), *atu5162* (*avhB1*), *atu5168* (*avhB7*), *atu6045* (*repC*) and *atu6029* (*nocR*). We also noticed that the expression of *acc* genes (*atu6139* to *atu6145*) and *arc* genes (*atu6133* to *atu6137*) which are known to be directly controlled by *AccR* (Piper *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2008) were strongly upregulated in the *accR* mutant (Table S1). Therefore we concluded that the microarray results were solid and could be analyzed in more details.

The differentially expressed genes belong to different functional classes according to the genome annotations from the *Agrobacterium* consortium (<http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html>). Among the 10 down-regulated genes, 6 are associated with transport functions and more precisely 5 are identified as periplasmic binding proteins: 3 are predicted to bind amino acids (*atu1399*, *atu1413* and *atu4534*), one to bind ribose (*atu3200*) and the last one to bind dicarboxylate molecules (*atu2744*). On the other hand, the 60 upregulated genes fall into nine categories: 1-biosynthesis of cofactors,

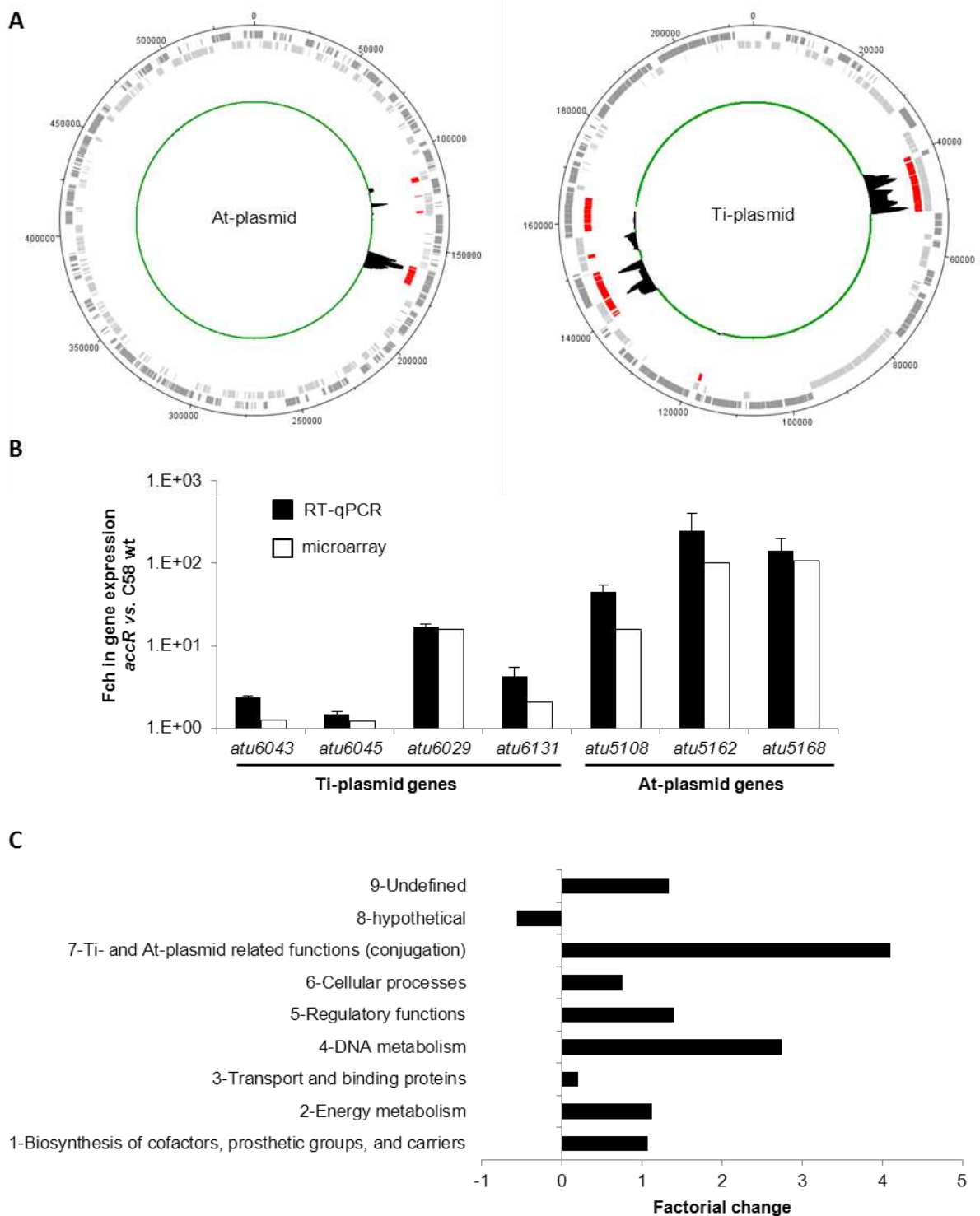


Figure 2: Comparative transcriptomics of the *A. tumefaciens accR* mutant vs. C58 wt. **A** Transcriptome graphs (black: upregulation and green: not differentially expressed) on the circular plots of At and Ti plasmids. The tracks from the outside to the inside represent (1) forward CDS (dark grey); (2) reverse CDS (light grey); (3) annotated differentially expressed genes (red). **B** Comparison of the expression fold change (Fch) in *accR* vs. C58 wt for 7 genes using quantitative RT-PCR (RT-qPCR) or microarray techniques. Mean values and SD of two independent experiments are presented. **C** Factorial changes for the 9 functional categories of the upregulated genes in *accR*.

prosthetic groups and carriers, 2-energy metabolism, 3-transport, 4-DNA metabolism, 5-regulatory functions, 6-cellular processes, 7-plasmid functions (conjugation), 8-hypothetical protein, and 9-undefined.

In an attempt to identify the functional classes which were the most affected by the derepression of *AccR*, factorial changes were calculated for each gene category (Fig. 2C). This method compares the distribution of differentially expressed genes classified in functional categories with the distribution of all classified genes in *A. tumefaciens* C58 (see Material and Methods). Thus the distance from zero of the factorial change value is interpreted as the impact of our experimental conditions on the relevant functional category. Strikingly the group with the highest factorial change was the one associated with the Ti plasmid and At plasmid conjugation systems (class 7). Although the upregulation of T4SS_{pTi} genes in *accR* background was expected, that of T4SS_{pAt} genes has never been reported. Of the 15 genes coding for the T4SS_{pAt}, 14 were strongly induced in the *accR* mutant with Fch comprised between 15 and 122 (Table S1). Another interesting functional category was associated with DNA metabolism (class 4) but solely one Ti plasmid gene, *yci* (*atu6122*), was associated with this class: it encodes a putative nuclease that is known to be part of the *tra*_{pTi} regulon regulated by quorum-sensing (Cho and Winans, 2007).

Special attention was also paid to the regulatory group (class 5) since its members might be major actors in the reprogramming of the expression of the *A. tumefaciens* C58 genes in plant tumors. Three differentially expressed regulatory genes were borne on the Ti plasmid (*tral*, *traR* and *nocR*) and one on the At plasmid (*rctB*). The quorum-sensing genes *tral* (*atu6042*) and *traR* (*atu6134*) were upregulated 442 and 54 times, respectively, while *nocR* was upregulated 15 times. *NocR* is involved in the regulation of the catabolism of the opine nopaline (von Lintig *et al.*, 1991). The At plasmid-encoded transcriptional regulator *rctB* (*atu5116*) was found to be induced about 6 times. Noticeably, *rctB* orthologs control the conjugation of the symbiotic plasmid in the *A. tumefaciens*-related species *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* (Perez-Mendoza *et al.*, 2005, Nogales *et al.*, 2013).

AccR-regulon: the quorum-sensing pathway and Ti plasmid transfer

The *AccR*-mediated control of quorum-sensing signal production was experimentally validated by the high level of OC8HSL and elevated Ti plasmid transfer frequencies observed

for the *accR* mutant (Fig. 1). Previous transcriptomic data (Cho and Winans, 2007) and those collected in this work offered the opportunity to compare the TraR-regulon (quorum-sensing) and AccR-regulon. Despite some differences in the experimental design (a plasmid vector overexpressing TraR vs. KO-mutation in *accR* gene), the source of microarrays (Agilent vs. Nimbelgene) and the analysis of transcriptomic data (with or without taking into account the replicon copy-numbers), common genes of the TraR- and AccR-regulons were identified (Table S2). More precisely, the 22 *tra* genes which are involved in the Ti plasmid conjugation constituted the core of the quorum-sensing regulated genes. They were the only ones to be upregulated in both experiments. In addition to Ti plasmid conjugation genes, this comparison also confirmed the upregulation of *atu6096* (hypothetical protein) gene, for which a role in quorum-sensing, conjugation or host interaction is yet unknown.

AccR-regulon: a regulatory link between the agrocinopine and nopaline pathways

Through transcriptomics and RT-qPCR (Fig. 2B), we established that *nocR* (*atu6029*) was upregulated approximately 15 times in the *accR* background. In *A. tumefaciens* C58, the transcriptional regulator NocR, when bound to the opine nopaline, stimulates the expression of the *noc* genes which are involved in nopaline uptake and catabolism (von Lintig *et al.*, 1991, von Lintig *et al.*, 1994). We therefore assumed that AccR

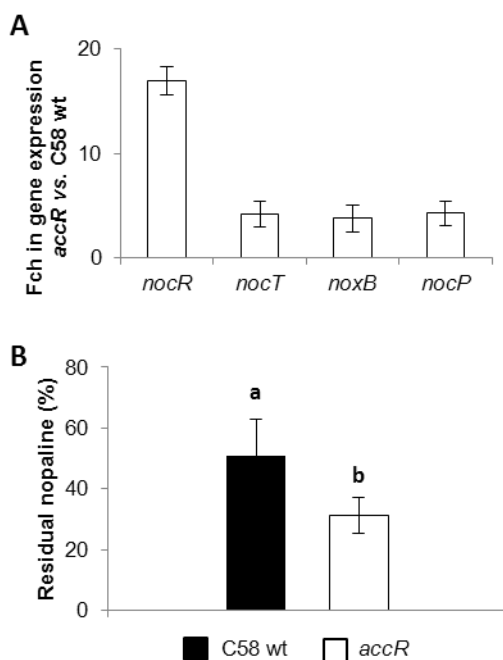


Figure 3: Nopaline catabolism in *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* mutant. C58 wt and *accR* cell cultures at an initial OD₆₀₀ of 0.1, supplemented or not with 1mM of nopaline, were grown to an OD₆₀₀ of approximately 0.4. **A** *accR* vs. C58 wt expression fold changes (Fch) for *nocR* and three *noc* genes (*nocT*, *noxB* and *nocP*) measured by quantitative RT-PCR in the absence of nopaline. **B** Percentage of remaining nopaline in C58 wt and *accR* cell cultures. Non-parametric Mann and Whitney test (n=3; p<0.05) was used and different letters indicate statistical significance. Mean values and SD of three independent experiments are presented.

derepression could alter the nopaline pathway. Expression of the genes *nocT* (*atu6027*), *nocP* (*atu6028*) and *noxB* (*atu6021*), which belong to the two *noc* operons encoding proteins involved in the transport and degradation of nopaline, were compared by RT-qPCR in the *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* mutant (Fig. 3A). All of them were more expressed in the *accR* background, suggesting that AccR derepression could potentiate the catabolism pathway of the nopaline. This hypothesis was tested by comparing the nopaline degradation capabilities of the *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* mutant (Fig. 3B). The *accR* mutant was more efficient than the wt strain for nopaline assimilation, therefore establishing a regulatory link between the agrocinopine pathway that is controlled by AccR and the nopaline pathway controlled by NocR.

AccR-regulon: enhancement of the Ti plasmid and At plasmid co-transfer

The upregulation of the At plasmid conjugation genes in the *accR* mutant prompted us to evaluate the transfer and co-transfer frequencies of the Ti and At plasmids *in vitro* as well as in plant tumors. In these conjugation assays, the donor strains hosted the pTiaccR::Gm or the control pTi::Gm plasmids, while the recipient strain was *A. tumefaciens* strain C58 derivative C00 which is devoid of Ti and At plasmids. The results are presented in Fig. 4A. *In vitro*, the transfer frequency of the At plasmid using the *accR* mutant as a donor was about 40 times higher than that observed using the strain expressing the wt *accR* allele ($4 \cdot 10^{-5}$ vs. $9 \cdot 10^{-7}$ Trans/D). This experiment correlated the upregulation of the T4SS_{pAt} genes with an increased conjugation frequency of the At plasmid in the *accR* background.

In plant tumors, the conjugation assays also confirmed the activation of the At plasmid transfer with the *accR* mutant comparatively to the control genotype ($5 \cdot 10^{-2}$ vs. $1 \cdot 10^{-3}$ Trans/D/mg). Interestingly, when measuring the co-transfer of both At and Ti plasmids in plant tumor, we observed that, for both C58(pTiaccR::Gm) and C58(pTi::Gm) donor strains, the co-transfer frequency occurred at a similar level as the transfer frequency of the single Ti plasmid (Fig. 4A). This finding indicates that in plant tumors the conjugations of the Ti and At plasmids are related. It also suggests that for the plasmid exhibiting the lower transfer frequency (i.e. Ti plasmid), the co-transfer with the plasmid exhibiting the higher transfer frequency (i.e. At plasmid) would be the rule. We therefore propose to call the At and Ti plasmids companion plasmids.

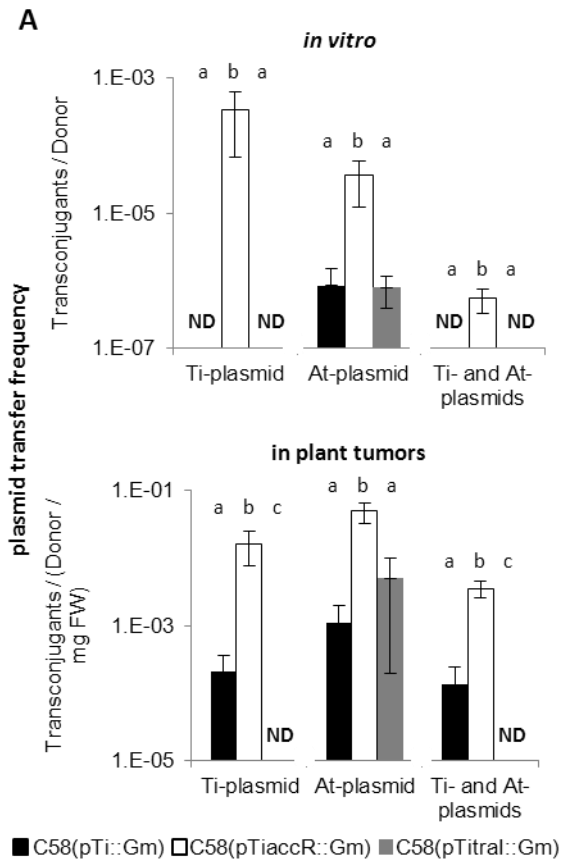
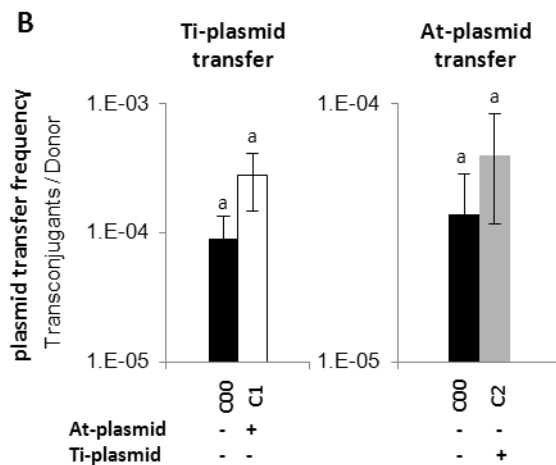


Figure 4: Transfer frequencies of *A. tumefaciens* C58 plasmids in different contexts. **A** Transfer frequencies *in vitro* and in *A. thaliana* plant tumors (18dpi) of Ti plasmid, At plasmid and At and Ti plasmids using C58(pTi::Gm), C58(pTiaccR::Gm) or C58(pTital::Gm) as donor strains. For each plasmid condition non parametric Kruskal-Wallis and post-hoc Tuckey tests ($4 < n < 8$; $p < 0.01$) were used to compare the transfer frequencies of the three donor strains. The different letters indicate the statistical significance. ND: not detected. **B** *In vitro* transfer frequencies of Ti plasmid and At plasmid using C58(pTiaccR::Gm) as donor strain and three different recipient cells, C00, C1 (harboring the At plasmid but not the Ti plasmid) and C2 (harboring the Ti plasmid but not the At plasmid). In the two conditions non-parametric Mann and Whitney tests ($n=6$; $p < 0.05$) confirmed that the two populations were not significantly different. Mean values and SD of two or three independent experiments including two to four replicates are presented.



The At plasmid conjugation is independent of quorum-sensing and T4SS_{pTi} machinery

Evidence that AccR negatively controlled the conjugation of both Ti and At plasmids raised questions about the possible involvement of AccR-modulated quorum-sensing in the enhancement of At plasmid conjugation. To explore this hypothesis, we used a pTital::Gm

derivative which is defective for the synthesis of quorum-sensing signal OC8HSL due to a KO-mutation in *tral* (Haudecoeur *et al.*, 2009). In pure culture and plant tumors, the frequencies of At plasmid transfer were similar whenever the reference C58(pTi::Gm) or C58(pTital::Gm) were used as donor strains (Fig. 4A), strongly suggesting that the conjugation of At plasmid is independent of quorum-sensing. Moreover, since in C58(pTital::Gm) mutant, the Ti plasmid transfer machinery was not functional anymore, this result also indicated that the Ti plasmid conjugation system did not contribute to the transfer of the At plasmid. Reciprocally, it was previously demonstrated that At plasmid conjugation machinery cannot transfer the Ti plasmid (Chen *et al.*, 2002).

The Ti or At plasmid transfer was not affected by resident plasmid.

We evaluated whether the presence of a plasmid (At or Ti) in a recipient cell could favor the acquisition of the companion one. Using the donor strain harboring pTiaccR::Gm, we compared the transfer frequencies of the Ti plasmid into two different recipient cells harboring (strain C1) or missing (C00) the At plasmid. Conversely, using the same donor, we evaluated the transfer frequency of the At plasmid in two distinct recipient strains harboring (strain C2) or missing (C00) the Ti plasmid (Fig. 4B). The measured frequencies revealed that the presence of a plasmid, Ti or At, in an *A. tumefaciens* C58 cell has no effect on its ability to receive its companion plasmid.

Discussion

This work delineated the regulon of the Ti plasmid-encoded regulator AccR and highlighted its role in the concerted regulation of *A. tumefaciens* Ti plasmid and companion At plasmid horizontal transfers.

The AccR-regulon controls the expression of at least 70 chromosomal and plasmid genes, which represent approximately 1.5% of all the *A. tumefaciens* genes. As exposed in Fig. 5, the analysis of these differentially expressed genes revealed that the AccR-regulon cannot be limited to the quorum-sensing pathway and agrocinopine assimilation, but encompasses other functions such as T4SS_{pAt} and nopaline assimilation. It is also noteworthy that the AccR

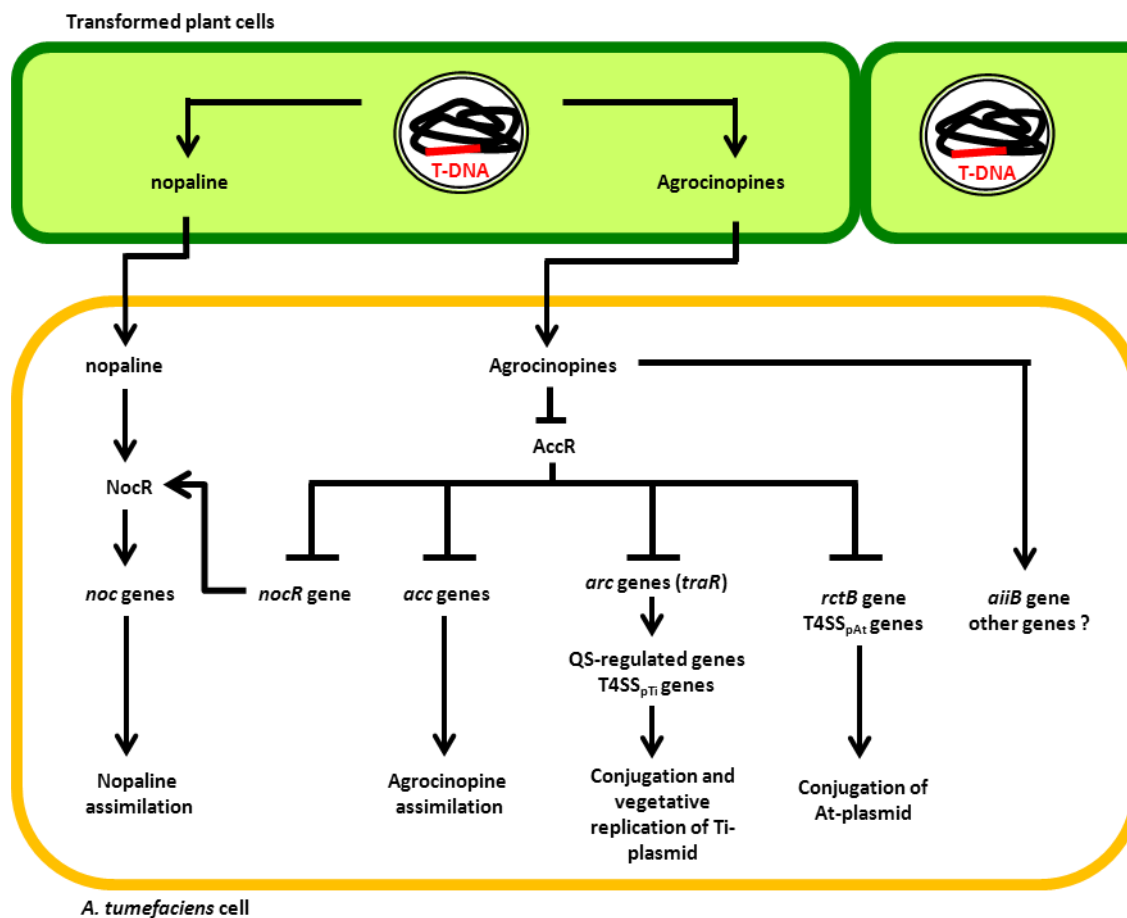


Figure 5: Schematic representation of the AccR-regulon in *A. tumefaciens*. AccR negatively controls expression of *nocR*, *acc* genes, *arc* genes (including *traR*), *rctB* and *T4SS_{pAt}* genes. Upon agrocinopines sensing, AccR derepression leads to enhanced nopaline and agrocinopines assimilation, conferring a selective advantage to colonizing agrobacteria in plant tumors. Stimulated expression of *traR* initiates quorum-sensing (QS) processes and dissemination of Ti plasmids by conjugation and copy-number amplification. In parallel upregulation of *T4SS_{pAt}* genes results in an increased frequency of At plasmid conjugation. At last agrocinopines may have AccR-independent impact; they notably induce expression of the lactonase-encoding *aiiB* gene.

regulon does not perfectly overlap with the agrocinopine responses. For instance our transcriptomic data confirmed previous results indicating that the lactonase-encoding *aiiB* gene does not belong to the AccR regulon, although its expression is induced by agrocinopines (Carlier *et al.*, 2003; Haudecoeur *et al.*, 2009).

The regulatory link between AccR and nopaline catabolism has never been reported so far. Our results showed for the first time that the AccR inactivation permitted a higher expression of the transcriptional regulator NocR, which is necessary, with nopaline, for the

activation of the *noc* operons. Hence, AccR derepression would potentiate *noc* activation in bacterial cells. The advantage that agrobacteria could gain from this regulatory connection is an increased assimilation of nopaline and consequently an enhanced selective advantage during tumor development.

This study also extended our current knowledge in the field of horizontal gene transfer by demonstrating that the conjugation of the *A. tumefaciens* C58 At plasmid, like that of the Ti plasmid, was negatively controlled by AccR. This finding was in line with a previous result (Chen *et al.*, 2002) showing that the presence of the Ti plasmid in donor cells reduced the conjugation frequencies of the At plasmid 10 folds. We are now able to claim that AccR is undoubtedly part of this mechanism as AccR derepression leads to a stimulation of TSS4_{pAt} genes and hence of At plasmid conjugal activity. It should be noticed that AccR derepression is not required for At plasmid conjugation, as this phenomenon may occur in *A. tumefaciens* C58 wt. However the co-regulation by agrocinopines-responsive repressor AccR allows the synchronization between the conjugations of At and Ti plasmids in plant tumors. As a consequence the co-transfer of At and Ti plasmids is strongly favored. In this line, previous investigations revealed that Ti plasmid conjugation can promote *Agrobacterium* chromosome transfer (Dessaux *et al.*, 1989). Altogether, the crown-gall tumor therefore appears as a site where a massive shuffling of *Agrobacterium* replicons can occur, increasing the genomic diversity of pathogen populations.

At a mechanistic level, this study led us to investigate the involvement of quorum-sensing in the regulation of the At plasmid conjugation. Using a *traI* mutant defective for the synthesis of the OC8HSL signal, we showed that the conjugation of the At plasmid was independent of quorum-sensing. In support of this conclusion, the examination of the *avhB* and *tra*_{pAt} promoters did not reveal any *tra* boxes which are characteristics of genes regulated by quorum-sensing (Fuqua and Winans, 1996). More likely AccR-mediated enhancement of the At plasmid conjugation involves RctB, the expression of which increased in the *accR* mutant. In *Rhizobiaceae*, proteins coded by *rctB* orthologs are well-known activators of the plasmid conjugation (Perez-Mendoza *et al.*, 2005, Nogales *et al.*, 2013).

Ecologically, the co-transfer of the At plasmid with the Ti plasmid is relevant in several respects. For instance the At plasmid encodes functions for the assimilation of some opines and butyrolactone derivatives which accumulate in plant tumors (Vaudequin-Dransart *et al.*,

1998; Baek *et al.*, 2005; Chai *et al.*, 2007; Haudecoeur *et al.*, 2009). The At plasmid might therefore confer a selective advantage to colonizing *A. tumefaciens* cells. In addition, as At plasmid encodes the lactonase BlcC which regulates quorum-sensing and conjugation of Ti plasmid (Khan and Farrand, 2009; Haudecoeur and Faure, 2010), the co-transfer of both replicons might prevent the deregulation of these processes. Taken together these elements support the notion that the regulatory interweaving of At and Ti plasmid conjugations is important for the adaptive lifestyle of *A. tumefaciens* to plant tumors.

Finally, at a time when plasmidomes start to be under acute scrutiny (Walker, 2012) our results provide an interesting example of the way some environmental factors, host- and pathogen-derived (i.e. opines and quorum-sensing molecules) act to select the bacterial plasmid composition in a given ecological niche (here the plant tumor). The characterization of similar mechanisms regulating the co-transfer of plasmids in other bacterial species should extend our understanding of plasmidomes.

Material and Methods

Bacterial strains and culture conditions

All the *A. tumefaciens* used in this work were derivatives of *A. tumefaciens* C58. The pTiC58 derivatives pTiaccR::Gm, pTi::Gm and pTitrall::Gm were obtained by inserting a gentamycin-resistance cassette into the genes *atu6138*, *atu6148* and *atu6042*, respectively (Haudecoeur *et al.*, 2009). The plasmid pTi::Km was obtained by inserting a kanamycin-resistance cassette into the gene *atu6148*. Rifampicin-resistant recipient strains C00 and C1 were derived from *A. tumefaciens* C58 wt cured of the At and Ti plasmids, and cured of the Ti plasmid alone, respectively. Strain C2 resulted from the Ti plasmid conjugation of pTi::Km into the recipient strain C00. *A. tumefaciens* was cultivated at 30°C in *Agrobacterium* broth (AB) minimal medium (Chilton *et al.*, 1974) supplemented with ammonium chloride (1g/L) and mannitol (2g/L) except when an alternative source of carbon is indicated, or in Luria Bertani modified medium (LBm; NaCl 5g/L instead of 10 g/L). Antibiotic concentrations were the following: gentamycin: 25µg/ml; kanamycin: 50µg/ml; rifampicin: 100µg/ml.

Quantification of OC8HSL and nopaline

For the OC8HSL quantification, aliquots of cell culture supernatants or ethyl acetate extracts of plant tumors were spotted onto TLC silica plates (C18-reverse phase, Whatman) and incubated with the OC8-HSL-bioindicator strain *A. tumefaciens* NT1(pZLR4) as previously described (Cha *et al.*, 1998). Tested samples were compared with a calibration curve obtained with pure OC8HSL (Sigma-Aldrich).

For the nopaline quantification, aliquots of cell culture supernatants were spotted on high-quality chromatography paper (Whatman 3MM) and submitted to high-voltage electrophoresis in 1.1M acetic acid / 0.7M formic acid buffer. Arginine functions of the nopaline molecules were detected using phenantrenequinone (Sigma-Aldrich) reagent (typically 100ml of 0.1%phenantrenequinone in absolute ethanol + 25ml of 6N NaOH) and UV visualization. Quantification was performed with a calibration curve of pure nopaline and the Gel analysis tool of ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Conjugation assays

For *in vitro* assays, overnight cultures in LBm of recipient and donor cells were mixed in an equal ratio (1:1). Ten μ l were transferred into 190 μ l of ABm and incubated at 30°C for 24 hours. For *in planta* assay, overnight cultures in LBm of recipient and donor cells were mixed in a ratio (1:0.4) and plated onto LBm-agar. These cultures were then used to inoculate 21-day old *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants in wounds generated at the base of the stem. Eighteen days post-infection, tumors were collected and crushed into NaCl 0.8% to recover the bacteria. *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants were grown in controlled environment chambers at 22°C with an 8 hours photoperiod and 65% hygrometry.

Suspension dilutions of *in vitro* and *in planta* conjugation assays were spotted onto selective agar media to enumerate the different bacterial populations. LBm-agar with appropriate antibiotics was used to enumerate donors, recipients and Ti plasmid transconjugants. AB-agar supplemented with gamma-butyrolactone (2 g/L) as carbon source and appropriate antibiotics were used to enumerate At plasmid transconjugants as well as At and Ti plasmid transconjugants. In all experiments, presence of the At plasmid in a selection of putative transconjugants was verified by PCR.

DNA and RNA extractions

Overnight cultures of *A. tumefaciens* C58 wt and *accR* cells were subcultured at an initial OD₆₀₀ of 0.1 in 50ml of AB mannitol, supplemented or not with 1mM of nopaline, in 500ml flasks. Cells were grown at 28°C for approximately 9 hours until early log phase (OD₆₀₀=0.4). Different aliquots of cells were harvested by centrifugation and stored at -80°C. DNA was extracted and purified according to (Birnboim and Doly, 1979). RNA extraction was performed using phenol according to (Planamente *et al.*, 2012).

Genome sequencing

For each genetic background, paired-end libraries (280bp +/- 120) were prepared in duplicates from 5µg of total genomic DNA using the Genomic DNA Library Prep kit (Illumina). Sequencing was performed on the IlluminaGAIIx (Imagif platform, Gif-sur-Yvette, France) using the 36-cycle sequencing kit v4, and the resulting images were analyzed through Illumina pipeline. The raw sequences were filtered and trimmed on quality (quality threshold 0.05) and length (removal of 3 nucleotides from the 5' end and minimum length 50 nucleotides). Sequence mapping and coverage calculations were performed using CLC Genomic Workbench 5.5.1 with the following parameters for the mapping: 0.8 identity on 0.5 read length.

Transcriptomics

RNA samples were reversed transcribed into cDNA using the WTA1 TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma). Resulting cDNA samples were purified using GenElute™ Clean-Up kit (Sigma) and labeled with Cy3 monoreactive dye. Purified Cy3-labelled cDNA were hybridized to NimbleGen 4-plex microarrays (Roche) containing probe sets for 5,355 genes that represent the entire *A. tumefaciens* C58 genome. After hybridation, microarrays were washed three times and scanned in MS200 NimbleGen scanner (Roche) at the PartnerChip platform (GénopoleEvry, France). Fluorescent signals were quantified using NimbleScan software and further processed and normalized with GeneSpring GX11 (Agilent). Normalized data of different samples were pairwise compared and P values corresponding to statistical t-test were attributed for each gene.

Calculation of factorial changes

The method of factorial change for the processing of transcriptomic data is described in Deeken *et al.*, 2006. Briefly the factorial change is the natural logarithm of the ratio of the percentage of differentially expressed genes in a functional category to the percentage of all genes of that category. The mathematical formula used is the following: factorial change = $\ln(\text{DE}_a/\text{DE}_t) / (T_a/T_t)$ where DE_a is the number of differentially expressed genes annotated in the category a, DE_t the total number of differentially expressed genes in our experiment, T_a the number of genes annotated in the category a and T_t the total number of annotated genes in *A. tumefaciens* C58.

Quantitative RT-PCRs

cDNA was prepared from 1µg of RNA using RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) following the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCRs were performed with Lightcycler® 480 II (Roche) apparatus. The data were processed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. For all primer sets the similarities of amplification efficiencies were controlled. The internal control used was the gene *atu2422* shown to be unaffected by our experimental conditions.

Table S1: List of differentially expressed genes in *A. tumefaciens* C58 *accR* vs. wt. The rows in yellow highlight *accR* as well as the three genes for which the fold change (Fch) passes beyond the threshold of significance if we take into account the three copies of the Ti plasmid in *accR*.

atu code	Name	Fch	Function
<i>atu1399</i>		-3.89	ABC transporter, substrate binding protein [amino acid]
<i>atu1413</i>		-3.78	ABC transporter, substrate binding protein [branched chain amino acid]
<i>atu2744</i>		-3.01	C4-dicarboxylate binding protein
<i>atu2022</i>	<i>adh</i>	3.31	NADP-dependent alcohol dehydrogenase
<i>atu3198</i>		-6.31	ABC transporter, substrate binding protein [ribose]
<i>atu3200</i>		-3.03	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [ribose]
<i>atu4534</i>		-3.05	ABC transporter, substrate binding protein [amino acid]
<i>atu5108</i>	<i>traG-At</i>	15.65	conjugal transfer protein
<i>atu5109</i>	<i>traD-At</i>	19.43	conjugal transfer protein
<i>atu5110</i>	<i>traC-At</i>	15.58	conjugal transfer protein
<i>atu5116</i>	<i>rctB</i>	5.99	transcriptional regulator protein
<i>atu5117</i>		6.64	hypothetical protein
<i>atu5118</i>		51.17	aminotransferase, class II
<i>atu5124</i>	<i>atrB</i>	4.46	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase
<i>atu5161</i>		97.76	conserved hypothetical protein
<i>atu5162</i>	<i>avhB1</i>	100.41	type IV secretion protein AvhB1
<i>atu5163</i>	<i>avhB2</i>	46.41	type IV secretion protein AvhB2
<i>atu5164</i>	<i>avhB3</i>	22.1	type IV secretion protein AvhB3
<i>atu5165</i>	<i>avhB4</i>	122.88	type IV secretion protein AvhB4
<i>atu5166</i>	<i>avhB5</i>	92.88	type IV secretion protein AvhB5
<i>atu5167</i>	<i>avhB6</i>	72.28	type IV secretion protein AvhB6
<i>atu5168</i>	<i>avhB7</i>	106.1	type IV secretion protein AvhB7
<i>atu5169</i>	<i>avhB8</i>	59.85	type IV secretion protein AvhB8
<i>atu5170</i>	<i>avhB9</i>	66.48	type IV secretion protein AvhB9
<i>atu5171</i>	<i>avhB10</i>	46.66	type IV secretion protein AvhB10
<i>atu5172</i>	<i>avhB11</i>	31.75	type IV secretion protein AvhB11
<i>atu5173</i>		28.95	dehydrogenase
<i>atu5485</i>		-4.78	hypothetical protein
<i>atu5486</i>		-3.22	hypothetical protein
<i>atu5492</i>		-3.59	conserved hypothetical protein
<i>atu5493</i>		-3.2	hypothetical protein
<i>atu6029</i>	<i>nocR</i>	15.98	transcriptional regulator, LysR family for nopaline metabolism
<i>atu6030</i>		33.27	ORF13 hypothetical protein
<i>atu6031</i>	<i>trbI</i>	93.59	conjugal transfer protein
<i>atu6032</i>	<i>trbH</i>	252.55	conjugal transfer protein
<i>atu6033</i>	<i>trbG</i>	158.98	conjugal transfer protein
<i>atu6034</i>	<i>trbF</i>	305.52	conjugal transfer protein
<i>atu6035</i>	<i>trbL</i>	66.96	conjugal transfer protein
<i>atu6036</i>	<i>trbK</i>	11.08	entry-exclusion protein

<i>atu6037</i>	<i>trbJ</i>	213.53	conjugal transfer protein
<i>atu6038</i>	<i>trbE</i>	149.18	conjugal transfer protein
<i>atu6039</i>	<i>trbD</i>	240.71	conjugal transfer protein
<i>atu6040</i>	<i>trbC</i>	266.34	conjugal transfer protein
<i>atu6041</i>	<i>trbB</i>	139.88	conjugal transfer protein
<i>atu6042</i>	<i>traI</i>	442.71	autoinducer synthesis protein
<i>atu6096</i>		22.95	conserved hypothetical protein
<i>atu6097</i>	<i>fic</i>	12.24	cell filamentation protein
<i>atu6098</i>		3.48	transcriptional regulator, HTH family
<i>atu6121</i>	<i>ych</i>	10.84	conserved hypothetical protein
<i>atu6122</i>	<i>yci</i>	172.43	nuclease
<i>atu6123</i>		122.95	conserved hypothetical protein
<i>atu6124</i>	<i>traG</i>	132.19	conjugal transfer protein, Coupling protein
<i>atu6125</i>	<i>traD</i>	82.79	conjugal transfer protein, Dtr system
<i>atu6126</i>	<i>traC</i>	534.24	conjugal transfer protein, Dtr system
<i>atu6127</i>	<i>traA</i>	65.89	OriT nicking enzyme, Dtr system
<i>atu6128</i>	<i>traF</i>	28.86	Conjugative pilin processing protease
<i>atu6129</i>	<i>traB</i>	215.47	conjugal transfer protein
<i>atu6130</i>	<i>traH</i>	33.84	conserved hypothetical protein
<i>atu6132</i>	<i>mcpA</i>	3.82	methyl-accepting chemotaxis protein
<i>atu6133</i>		30.26	conserved hypothetical protein
<i>atu6134</i>	<i>traR</i>	54.06	transcriptional regulator
<i>atu6135</i>		53.32	Sucrose phosphorylase-like protein
<i>atu6136</i>		73.24	Na ⁺ /phosphate symporter
<i>atu6137</i>		177.15	hypothetical protein
<i>atu6138</i>	<i>accR</i>	18.87	Repressor of the <i>acc</i> and <i>arc</i> operons
<i>atu6139</i>	<i>accA</i>	20.18	ABC transporter, substrate binding protein [agrocinosines A and B]
<i>atu6140</i>	<i>accB</i>	24.35	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [agrocinosine]
<i>atu6141</i>	<i>accC</i>	25.38	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [agrocinosine]
<i>atu6142</i>	<i>accD</i>	17.26	ABC transporter, membrane spanning protein [agrocinosine]
<i>atu6143</i>	<i>accE</i>	20.91	ABC transporter, membrane spanning protein [agrocinosine]
<i>atu6144</i>	<i>accF</i>	12.67	agrocinosine phosphodiesterase
<i>atu6145</i>	<i>accG</i>	14.2	arabinose phosphate phosphatase
<i>atu6146</i>		4.92	conserved hypothetical protein
<i>atu6147</i>		9.96	conserved hypothetical protein

Table S2 : List of genes regulated by quorum-sensing. The list was obtained by comparing our transcriptomic data with a previous report (Cho and Winans, 2007). Only genes common to the two studies are mentioned. Fch¹: fold change in gene expression found in the present study. Fch²: fold change in gene expression found in Cho and Winans, 2007.

atu code	Name	Function	Fch ¹	Fch ²
<i>atu6030</i>	<i>orf13</i>	hypothetical protein	33.27	13.74
<i>atu6031</i>	<i>trbI</i>	conjugal transfer protein	93.59	34.78
<i>atu6032</i>	<i>trbH</i>	conjugal transfer protein	252.55	42.52
<i>atu6033</i>	<i>trbG</i>	conjugal transfer protein	158.98	13.09
<i>atu6034</i>	<i>trbF</i>	conjugal transfer protein	305.52	30.27
<i>atu6035</i>	<i>trbL</i>	conjugal transfer protein	66.96	1.16
<i>atu6036</i>	<i>trbK</i>	entry-exclusion protein	11.08	31.56
<i>atu6037</i>	<i>trbJ</i>	conjugal transfer protein	213.53	37.53
<i>atu6038</i>	<i>trbE</i>	conjugal transfer protein	149.18	7.78
<i>atu6039</i>	<i>trbD</i>	conjugal transfer protein	240.71	15.24
<i>atu6040</i>	<i>trbC</i>	conjugal transfer protein	266.34	24.93
<i>atu6041</i>	<i>trbB</i>	conjugal transfer protein	139.88	9
<i>atu6042</i>	<i>tral</i>	autoinducer synthesis protein	442.71	10.06
<i>atu6096</i>		conserved hypothetical protein	22.95	9.78
<i>atu6122</i>	<i>yci</i>	nuclease	172.43	14.52
<i>atu6123</i>		conserved hypothetical protein	122.95	16.22
<i>atu6124</i>	<i>traG</i>	conjugative transfer protein, Coupling protein	132.19	29.45
<i>atu6125</i>	<i>traD</i>	conjugative transfer protein, Dtr system	82.79	7.41
<i>atu6126</i>	<i>traC</i>	conjugal transfer protein, Dtr system	534.24	25.11
<i>atu6127</i>	<i>traA</i>	OriT nicking enzyme, Dtr system	65.89	1.35
<i>atu6128</i>	<i>traF</i>	Conjugative pilin processing protease	28.86	28.44
<i>atu6129</i>	<i>traB</i>	conjugal transfer protein	215.47	15.67
<i>atu6130</i>	<i>traH</i>	conserved hypothetical protein	33.84	3.63

References

- Baek, C. H., Farrand, S. K., Park, D. K., Lee, K. E., Hwang, W. & Kim, K. S. (2005) Genes for utilization of deoxyfructosyl glutamine (DFG), an amadori compound, are widely dispersed in the family *Rhizobiaceae*. *FEMS Microbiol Ecol*, 53, 221-33.
- Beck Von Bodman, S., Hayman, G. T. & Farrand, S. K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 643-7.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y. & Faure, D. (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4989-93.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 1119-29.
- Chai, Y., Tsai, C. S., Cho, H. & Winans, S. C. (2007) Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL, and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 189, 3674-9.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D. W. & Nester, E. W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 184, 4838-45.
- Cho, H. & Winans, S. C. (2007) TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, 63, 1769-82.
- Christie, P. J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 1694, 219-34.
- Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Muller, T., Kaiser, W. M., *et al.* (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell*, 18, 3617-34.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. & Goodman, H. M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet*, 1, 561-73.

Dessaux, Y., Petit, A., Ellis, J. G., Legrain, C., Demarez, M., Wiame, J.-M., Popoff, M., & Tempé, J. (1989). Ti plasmid-controlled chromosome transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 171, 6363–6366.

Dessaux, Y., Petit, A., and Tempe, J. 1992. Opines in *Agrobacterium* biology. Molecular signals in plant-microbe communications. D. P. S. Vermaed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 109-136.

Farrand, S. K. & Dessaux, Y. (1986) Proline biosynthesis encoded by the noc and occ loci of *Agrobacterium* Ti plasmids. *J Bacteriol*, 167, 732-4.

Fuqua, C. & Winans, S. C. (1996) Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol*, 178, 435-40.

Gelvin, S. B. (2006) *Agrobacterium* virulence gene induction. *Methods Mol Biol*, 343, 77-84.

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., *et al.* (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2323-8.

Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.

Haudecoeur, E. & Faure, D. (2010) A fine control of quorum-sensing communication in *Agrobacterium tumefaciens*. *Commun Integr Biol*, 3, 84-8.

Hayman, G. T. & Farrand, S. K. (1988) Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *J Bacteriol*, 170, 1759-67.

Hwang, I., Cook, D. M. & Farrand, S. K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J Bacteriol*, 177, 449-58.

Joos, H., Inze, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M. & Schell, J. (1983) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell*, 32, 1057-67.

Khan, S. R. & Farrand, S. K. (2009) The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol*, 191, 1320-9.

Kim, H. & Farrand, S. K. (1997) Characterization of the acc operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84. *J Bacteriol*, 179, 7559-72.

- Kim, H. S., Yi, H., Myung, J., Piper, K. R. & Farrand, S. K. (2008) Opine-based *Agrobacterium* competitiveness: dual expression control of the agrocinopine catabolism (acc) operon by agrocinopines and phosphate levels. *J Bacteriol*, 190, 3700-11.
- Kreusch, D., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1995) Ti plasmid-encoded octopine and nopaline catabolism in *Agrobacterium*: specificities of the LysR-type regulators OccR and NocR, and protein-induced DNA bending. *Mol Gen Genet*, 249, 102-10.
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., *et al.* (2011) Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol Evol*, 3, 762-81.
- Li, P. L., Everhart, D. M. & Farrand, S. K. (1998) Genetic and sequence analysis of the pTiC58 trb locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J Bacteriol*, 180, 6164-72.
- Li, P. L. & Farrand, S. K. (2000) The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the repABC family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J Bacteriol*, 182, 179-88.
- Lippincott, J. A., Beiderbeck, R. & Lippincott, B. B. (1973) Utilization of octopine and nopaline by *Agrobacterium*. *J Bacteriol*, 116, 378-83.
- Marincs, F. & White, D. W. (1993) Nopaline causes a conformational change in the NocR regulatory protein-nocR promoter complex of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiT37. *Mol Gen Genet*, 241, 65-72.
- Marincs, F. & White, D. W. (1995) Divergent transcription and a remote operator play a role in control of expression of a nopaline catabolism promoter in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biol Chem*, 270, 12339-42.
- Matthysse, A. G., Jaeckel, P. & Jeter, C. (2008) attG and attC mutations of *Agrobacterium tumefaciens* are dominant negative mutations that block attachment and virulence. *Can J Microbiol*, 54, 241-7.
- Morton, E. R., Merritt, P. M., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2013) Large Deletions in the pAtC58 Megaplasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Can Confer Reduced Carriage Cost and Increased Expression of Virulence Genes. *Genome Biol Evol*, 2013, 19.
- Nair, G. R., Liu, Z. & Binns, A. N. (2003) Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. *Plant Physiol*, 133, 989-99.
- Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Olivares, J. & Sanjuan, J. (2013) Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environ Microbiol*, 15, 811-21.

Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2003) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol*, 48, 1059-73.

Perez-Mendoza, D., Sepulveda, E., Pando, V., Munoz, S., Nogales, J., Olivares, J., *et al.* (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol*, 187, 7341-50.

Piper, K. R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I. & Farrand, S. K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 32, 1077-89.

Piper, K. R. & Farrand, S. K. (2000) Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J Bacteriol*, 182, 1080-8.

Pitzschke, A. & Hirt, H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *Embo J*, 29, 1021-32.

Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Morera, S. & Faure, D. (2012) Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 86, 1085-99.

Ryder, M. H., Tate, M. E. & Jones, G. P. (1984) Agrocinopine A, a tumor-inducing plasmid-coded enzyme product, is a phosphodiester of sucrose and L-arabinose. *J Biol Chem*, 259, 9704-10.

Sans, N., Schroder, G. & Schroder, J. (1987) The *Noc* region of Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cyclodeaminase. *Eur J Biochem*, 167, 81-7.

Schardl, C. L. & Kado, C. I. (1983) A functional map of the nopaline catabolism genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Gen Genet*, 191, 10-6.

Ullrich, C. I. & Aloni, R. (2000) Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot*, 51, 1951-60.

Vaudequin-Dransart, V. R., Petit, A., Chilton, W. S. & Dessaux, Y. (1998) The Cryptic Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Cointegrates with the Ti Plasmid and Cooperates for Opine Degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 583-591.

Veselov, D., Langhans, M., Hartung, W., Aloni, R., Feussner, I., Gotz, C., *et al.* (2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta*, 216, 512-22.

Von Lintig, J., Zanker, H. & Schroder, J. (1991) Positive regulators of opine-inducible promoters in the nopaline and octopine catabolism regions of Ti plasmids. *Mol Plant Microbe Interact*, 4, 370-8.

Von Lintig, J., Kreusch, D. & Schroder, J. (1994) Opine-regulated promoters and LysR-type regulators in the nopaline (noc) and octopine (occ) catabolic regions of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 176, 495-503.

Walker, A. (2012) Welcome to the plasmidome, *Nat Rev Microbiol*. 2012 May 14;10(6):379. doi: 10.1038/nrmicro2804.

Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., *et al.* (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-23.

Zanker, H., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1992) Opine transport genes in the octopine (occ) and nopaline (noc) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 174, 841-9.

Zanker, H., Lurz, G., Langridge, U., Langridge, P., Kreusch, D. & Schroder, J. (1994) Octopine and nopaline oxidases from Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular analysis, relationship, and functional characterization. *J Bacteriol*, 176, 4511-7.

Chapitre III. Caractérisation des protéines de liaison à la nopaline et à l'octopine chez les souches C58 et B6 d'*A. tumefaciens*

1. Contexte scientifique

La présence de composés organiques particuliers, nommés opines, au sein des tumeurs végétales induites par *A. tumefaciens* est connue depuis longtemps. La corrélation existante entre la nature de ces opines et le type de souche infectieuse constitua d'ailleurs un des premiers indices du processus de transformation interrègne par l'ADN-T d'*A. tumefaciens*. Par la suite, la découverte des mécanismes spécifiques d'assimilation par le phytopathogène des opines produites dans les tumeurs conduisit à la formulation du concept d'opine. Selon celui-ci, *A. tumefaciens* est capable, en détournant une partie du métabolisme végétal via la synthèse des opines, de se créer une niche écologique qui lui profite spécifiquement. L'hypothèse de l'avantage sélectif conféré à *A. tumefaciens* par les opines est supportée par plusieurs résultats expérimentaux, mais n'a jamais été directement testée au sein de l'environnement tumoral. Par ailleurs les bases génétiques et moléculaires sous-tendant cet avantage sélectif ne sont pas complètement comprises. Si les voies cataboliques de certaines opines, notamment la nopaline et l'octopine, sont bien caractérisées, nous ne connaissons pas l'ampleur de la reprogrammation génique qu'une opine est susceptible d'engendrer chez *A. tumefaciens*. Finalement peu d'information est disponible sur la façon dont *A. tumefaciens* est capable de reconnaître spécifiquement, et à l'exclusion d'autres espèces, les opines produites dans les tumeurs végétales.

Chez les bactéries, les protéines périplasmiques de liaison (*Periplasmic Binding Proteins / PBP*s) jouent un rôle important dans le transport sélectif de signaux moléculaires environnementaux. Ces PBP assurent la reconnaissance de la molécule cible (ou allocrite) et sont associées à des systèmes de transport de type ABC (*ATP-binding cassette*). De nombreuses structures tridimensionnelles de PBP bactériennes ont été obtenues à ce jour et ont conduit à leur classification en 6 groupes distincts (A à F). Ces données ont également

permis de mettre en évidence le mécanisme *venus flytrap* caractéristique de la liaison d'une PBP avec son ligand. Chez *A. tumefaciens* C58 plus de 150 gènes ont été identifiés comme codant pour des PBPs associées à des transporteurs ABC et la nature de leur ligand a été prédite par annotation automatique pour 142 d'entre elles. D'après ces données, la classe des PBPs reconnaissant des sucres est la plus importante chez *A. tumefaciens* C58. Trois PBPs impliquées dans la reconnaissance spécifique d'opines ont également été identifiées et parmi celles-ci se trouve NocT, la PBP qui se lie à la nopaline.

Pour finir notons que très peu de structures de PBPs d'*A. tumefaciens* ont été obtenues et aucune concernant des PBPs associées aux opines.

2. Présentation des travaux

Dans ce travail, nous avons évalué au sein de tumeurs de tomate l'avantage sélectif que conférait à *A. tumefaciens* C58 l'assimilation de nopaline. Pour ce faire nous avons généré un mutant *nocT* incapable d'importer la nopaline et analysé dans différentes conditions d'infection sa capacité à coloniser les tumeurs végétales en comparaison de son homologue sauvage. Nos résultats confirment la validité du concept d'opine. Par une approche transcriptomique nous avons également identifié 32 gènes d'*A. tumefaciens* C58 différentiellement exprimés en présence de nopaline. Pour certains de ces gènes leur implication dans les réponses à la nopaline n'avait jamais été établie jusqu'à présent. Une étude structurale de NocT a en outre permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent la spécificité de la reconnaissance par la PBP de la nopaline. Enfin combinant ces données structurales avec une analyse phylogénétique, la notion selon laquelle seules certaines souches d'*A. tumefaciens* sont capables de reconnaître et d'assimiler la nopaline produite dans les tumeurs végétales a été renforcée. L'ensemble de nos résultats est présenté sous forme d'article (version provisoire).

Dans un addendum, nous présentons certains résultats préliminaires concernant la PBP OccJ qui chez la souche B6 d'*A. tumefaciens* permet la reconnaissance et le transport de l'octopine. Développant la même approche que pour NocT, l'avantage sélectif conféré à B6 par l'assimilation d'octopine dans les tumeurs de tomate a été démontré. Nous basant sur des résultats de compétitions *in planta*, de structure et de phylogénie, nous avons

également entamé une comparaison entre les couples OccJ/octopine et NoctT/nopaline, en termes de spécificité et de sélectivité.

3. Contributions

Ce travail fait l'objet d'une collaboration avec le LEBS (Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale, Gif-sur-Yvette). Les structures et expériences de calorimétrie ont été réalisées sous la responsabilité d'A. Vigouroux et S. Morera (que je remercie encore une fois pour cette intéressante et stimulante collaboration). Les parties « Results » et « Material and Methods » de l'article 3 ont été rédigées par S. Morera. Comme spécifié, les analyses transcriptomiques ont été accomplies par la plate-forme PartnerChip (Génopole, Evry). Les cultures cellulaires et les extractions d'ARN ont été réalisées par S. Planamente. P. Blin, étudiante en Master 1, a contribué aux analyses des populations bactériennes *in planta*. Les mutants utilisés dans ce travail étaient déjà disponible dans le laboratoire.

The structural basis of the nopaline sensor NocT which contributes to the selective advantage of *Agrobacterium tumefaciens* C58 in plant tumors

Abstract :

The opine concept postulates that in plant tumors populations of virulent *Agrobacterium tumefaciens* able to specifically assimilate the opine molecules they contributed to produce, are favored compared to other bacteria devoid of such capacity. In *A. tumefaciens* C58, the assimilation of the opine nopaline is controlled by the periplasmic nopaline-binding protein NocT. Here we demonstrated the validity of the opine concept in tomato tumors by measuring the fitness of two *A. tumefaciens* C58 strains, a control strain and a *nocT* mutant unable to uptake nopaline. Genome-wide transcriptional analysis also identified the *A. tumefaciens* C58 genes affected by the presence of nopaline. In addition we investigated the structural properties of NocT in its free form as well as in association with its ligand nopaline. Finally exploration of database showed that NocT homologues with a conserved putative nopaline-binding signature were found only in the *Agrobacterium* genus and predominantly in the *A. tumefaciens* species, comforting thereby the notion that the phytopathogen has selected original and exclusive mechanisms of nopaline assimilation among bacteria.

Introduction:

The opine concept defines opines as “small-size molecules, the presence of which in the crown gall tumor is triggered by the pathogen *A. tumefaciens* to support its multiplication and to promote the dissemination of its virulent determinants” (Dessaux et al., 1998). The genetic basis of this concept resides notably in the co-presence in virulent *A. tumefaciens* cells of opine synthesis and opine catabolic genes. The opine synthesis genes are located on the T-DNA while opine catabolic genes are found in other regions of the Ti plasmid (Dessaux

et al. 1992, Dessaux et al., 1998). Therefore opines can be produced in transformed plant cells and then imported and used as nutritive sources by virulent *A. tumefaciens*. Such system associating synthesis and assimilation of opines has been retrieved in all *A. tumefaciens* strains studied so far and appears as a genuine hallmark of the interactions between the bacteria and the plant host (Dessaux et al., 1998).

The validity of the opine concept is supported by several lines of evidence. For instance *A. tumefaciens* is able to utilize the opines they produce as sole source of carbon and nitrogen (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). Many distinct experiments also showed that in model rhizospheres of plant genetically modified to produce specific opines, populations of bacteria able to assimilate these opines outgrew kin members deprived of such capacity (Lam et al., 1991, Guyon et al., 1993, Lam and Gaffney, 1993, Savka and Farrand, 1997). More recently *in vitro* analysis demonstrated that sufficient supply of opines could confer a selective advantage to *A. tumefaciens* populations harboring the Ti plasmid with the corresponding opine catabolic genes (Platt et al., 2012a, Platt et al., 2012b). It is however noteworthy that the validity of the opine concept has never been tested in plant tumors yet.

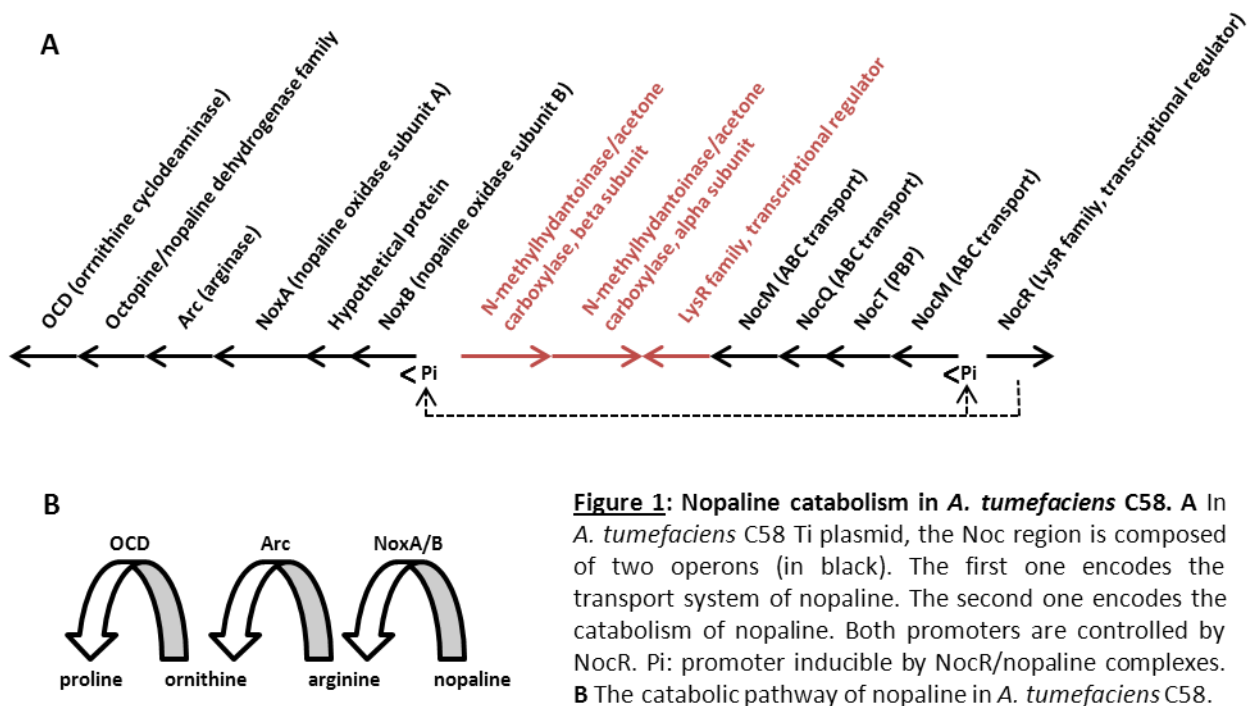


Figure 1: Nopaline catabolism in *A. tumefaciens* C58. **A** In *A. tumefaciens* C58 Ti plasmid, the Noc region is composed of two operons (in black). The first one encodes the transport system of nopaline. The second one encodes the catabolism of nopaline. Both promoters are controlled by NocR. Pi: promoter inducible by NocR/nopaline complexes. **B** The catabolic pathway of nopaline in *A. tumefaciens* C58.

The *A. tumefaciens* strain C58 promotes the production in plant tumors of two major opines: nopaline and agrocinopines (A and B) (Lippincott et al., 1973, Ryder et al., 1984). Located on the T-DNA of *A. tumefaciens* C58, the *nos* gene codes for an enzyme catalyzing the synthesis of nopaline from alpha-ketoglutarate and arginine (Depicker et al., 1982). On the other hand assimilation of nopaline is carried out by the products of the *A. tumefaciens* C58 *noc* genes (Fig. 1). These *noc* genes are arranged in two distinct operons separated by three intervening genes. The first *noc* operon includes *nocP*, *nocT*, *nocQ* and *nocM* genes which are involved in the import of nopaline into *A. tumefaciens* cytoplasm. The second operon encodes a three-step catabolic pathway converting nopaline into proline, via arginine and ornithine intermediates (Schardl and Kado, 1983, Farrand and Dessaux, 1986, Sans et al., 1987, Zanker et al., 1994). Both *noc* operons are controlled by the transcriptional regulator NocR. In presence of nopaline, NocR binds to the opine and the new dimer induces expression of the *noc* genes leading to an enhancement of nopaline assimilation (von Lintig et al., 1991, Marincs and White, 1993, von Lintig et al., 1994, Kreuzsch et al., 1995, Marincs and White, 1995).

The protein NocT belongs to the large family of periplasmic binding proteins (PBPs). In *A. tumefaciens* C58, NocT mediates nopaline recognition and translocation through a typical ABC transport machinery composed of *NocP*, *NocQ* and *NocM*. NocT is closely related to periplasmic histidine- and arginine-binding proteins from other bacterial species (Zanker et al., 1992). However, if the liganded structures of *E. coli* histidine-binding protein HisJ (PDB code 1HSL, Yao et al., 1994) and lysine-arginine-ornithine-binding protein LAO (PDB code 1laf, Oh et al., 1994) are already available, there is so far no data about structures of PBPs in complex with their opine ligand.

Here we generated an *A. tumefaciens* C58 *nocT* mutant which is unable to grow on nopaline as sole source of carbon and nitrogen. By comparing colonizing fitness in tomato tumors of *nocT* with its wild-type (wt) counterpart we established that populations able to assimilate nopaline outcompeted the mutant populations, confirming thereby the assumption of the opine concept. Transcriptomic analysis further allowed the identification of all nopaline-responsive genes in *A. tumefaciens* C58. Finally we investigated the structural and phylogenetic characteristics of NocT in order to better understand the specificities of nopaline assimilation in *A. tumefaciens*.

Results:

Characteristics of the *nocT* mutant

The mutant *nocT* was obtained by inserting a gentamycin resistance cassette into the *nocT* gene (*atu6027*). To test the *nocT* loss of function, we grew *A. tumefaciens* C58 wt and *nocT* cell cultures in a medium containing nopaline as sole source of carbon and nitrogen. As exposed in Fig. 2A, *nocT* cells, unlike C58 wt cells, could not multiply in these conditions, confirming that *nocT* strain is unable to import nopaline and use it as a nutrient.

This characteristic prompted us to investigate the amount of nopaline which accumulates in plant tumors induced by the *nocT* mutant comparatively to tumors induced by *A. tumefaciens* C58 wt. Curiously dosage by semi-quantitative method revealed that, although nopaline concentration did increase overall in tomato tumors in the course of crown gall disease development, there was not any significant difference in nopaline content between tumors induced by *nocT* or by C58 wt (Fig. 2B). This finding strongly suggests that rate of nopaline production in tomato tumors largely exceeds rate of nopaline consumption by the *A. tumefaciens* C58 cells present in these tumors.

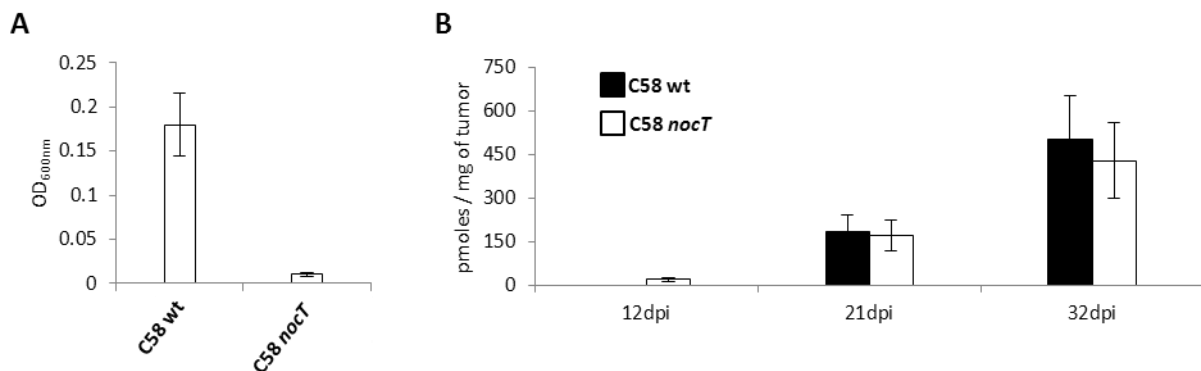
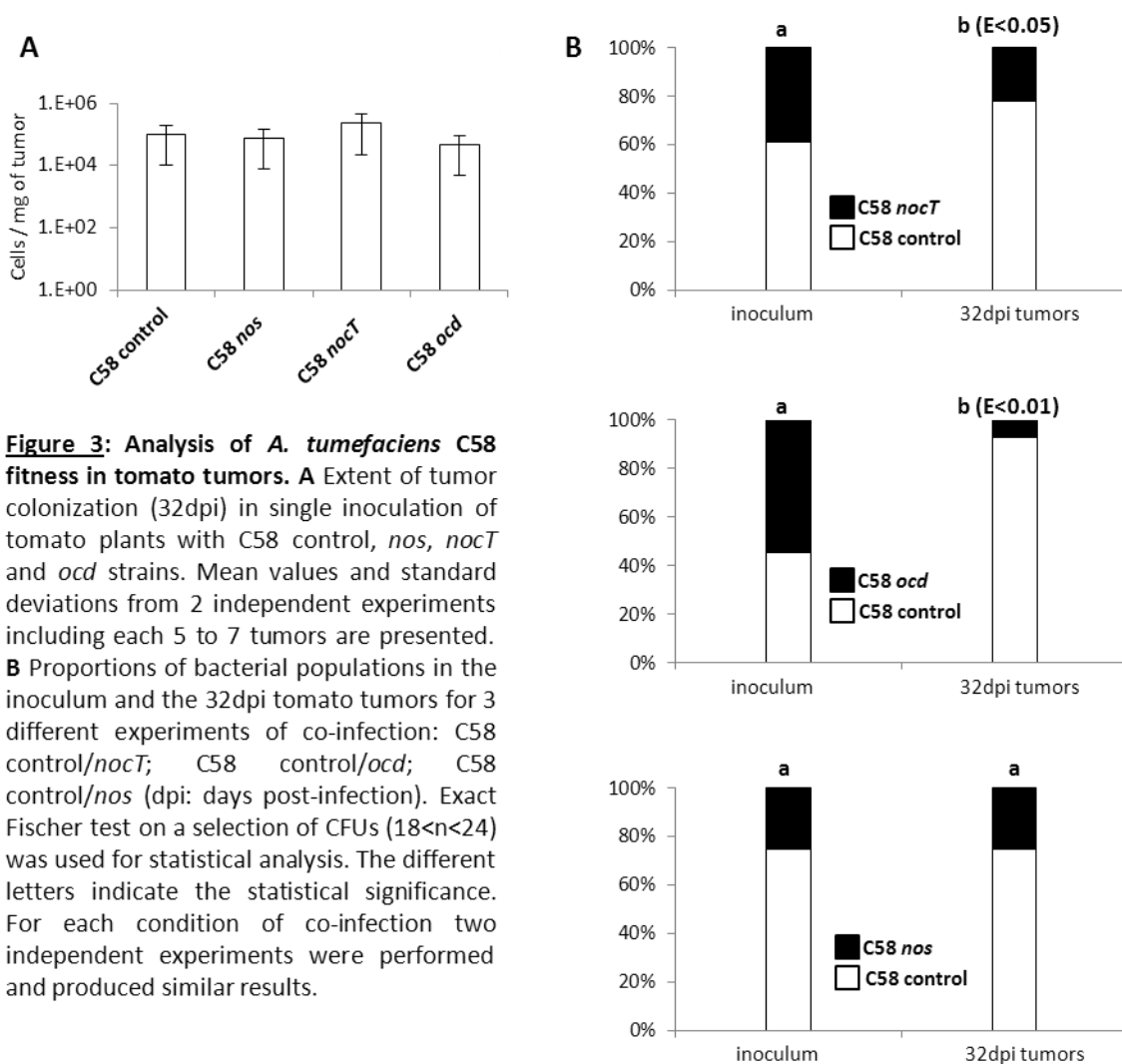


Figure 2: Characteristics of the *A. tumefaciens* C58 *nocT* strain. A OD_{600nm} of C58 wt and C58 *nocT* cell cultures grown for 16 hours with an initial OD_{600nm} of 0.01 in presence of nopaline as sole source of carbon and nitrogen. Mean values and standard deviations of two independent experiments are presented B Dosage of nopaline content in tomato tumors induced either by C58 wt or C58 *nocT* at three different time points (dpi: days post-infection). Mean values and standard deviations of two independent experiments including two replicates are presented.

Nopaline uptake and catabolism confers a selective advantage to *A. tumefaciens* C58 in tomato tumors

The selective benefit stemming from nopaline uptake was assessed by comparing the colonizing fitness of *A. tumefaciens* C58 *nocT* mutant (pTinocT::Gm) with a control strain, wt for the *nocT* allele but carrying a gentamycin resistance cassette in the Ti plasmid (pTi::Gm). Tomato tumors induced either by each single strain or by a mix of the two strains were analyzed. As controls we repeated the same experiments using two other *A. tumefaciens* C58 mutants instead of *nocT*. These ones were the *nos* mutant, unable to synthesize nopaline but able to assimilate it (pTinos::Km) and the *ocd* mutant, able to synthesize nopaline but unable to catabolize it (pTiocd::Gm). The results are presented in Fig. 3. Globally they show that the fitness gain due to nopaline uptake and catabolism is detectable



only in the competition conditions. Indeed in tumors induced either by single *nocT*, single *ocd*, single *nos* or single C58 control, the efficiencies of bacterial colonizing are not significantly different (Fig. 3A). In contrast in the competition conditions the proportion of the C58 control populations, between inoculum and mature tumors, is significantly displaced to the disadvantage of the *nocT* and *ocd* strains which are unable to assimilate nopaline (Fig. 3B). For the *nos* mutant co-inoculated with C58 control, we did not observe any significant modification of its relative abundance between inoculum and mature tumors (Fig. 3B). As *nos* mutant, like C58 control, is unaffected in its ability to assimilate nopaline, this finding is not really surprising. It indicates that the nopaline produced in tomato tumors upon transformation by the C58 control strain benefits as much to the latter as to the *nos* mutant. The finding also highlights the fact that the costs associated with nopaline production are not borne by the bacteria but by transformed plants and that consequently the *A. tumefaciens* C58 control strain is not disadvantaged compared to the *nos* mutant.

A. *tumefaciens* genes involved in the nopaline-mediated gain of fitness

In an attempt to identify all the *A. tumefaciens* C58 genes involved in the nopaline-mediated gain of fitness, we comparatively analyzed the transcriptomes of the *A. tumefaciens* C58 *accR* mutant in presence (nop+) and in absence of nopaline (nop-). The *accR* background was chosen because it mimics the condition of an exposure to agrocinopines (Beck von Bodman et al., 1992) which are the other major opines accumulating in plant tumors induced by *A. tumefaciens* C58. This approach should therefore reveal nopaline-responsive genes in a context reminiscent of plant tumor environment.

The transcriptomes of *A. tumefaciens* C58 *accR* were compared using Nimblegen microarrays. Only genes with a fold change (Fch) above 3 and a P value below 0.05 were considered in this analysis. Using these filters 32 differentially expressed genes were identified in nop+ versus nop-, 8 of them being downregulated and 24 being upregulated (Table 1). The results of the microarray were verified by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) experiments on 6 different genes (Fig. 4). As RT-qPCR and microarray approaches delivered similar results, we considered microarray data as solid and pursued our investigation.

	Linear chromosome	Circular chromosome	
			Gene
			Gene function
			Functional category
atu code	Fch	Gene	Gene function
<i>atu1467</i>	-12.49		hypothetical protein
<i>atu1468</i>	-45.97		conserved hypothetical protein
<i>atu1643</i>	10.65		conserved hypothetical protein
<i>atu1847</i>	6.55		hypothetical protein
<i>atu1996</i>	-5.91		hypothetical protein
<i>atu1997</i>	-38.93	<i>cysI</i>	sulfite reductase
<i>atu2019</i>	-3.35	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase
<i>atu2022</i>	-3.62	<i>adh</i>	NADP-dependent alcohol dehydrogenase
<i>atu2107</i>	6.40	<i>tnp</i>	IS3 family transposase
<i>atu2224</i>	-4.47	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase
<i>atu4007</i>	49.90	<i>arcA</i>	arginase
<i>atu4155</i>	3.46		ABC transporter, membrane spanning protein [aliphatic sulphonate]
<i>atu4676</i>	3.53		putative malate dehydrogenase
<i>atu4678</i>	3.27		ABC transporter, substrate binding protein [amino acid]
<i>atu4732</i>	3.16		fimbrial chaperone
<i>atu4858</i>	3.53	<i>traG</i>	<i>Agrobacterium virulence virD4-like protein</i>
<i>atu6016</i>	40.42	<i>ocd</i>	ornithine cyclodeaminase
<i>atu6017</i>	21.63	<i>odh</i>	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase
<i>atu6018</i>	38.32	<i>arc</i>	arginase
<i>atu6019</i>	20.40	<i>noxA</i>	D-nopaline dehydrogenase
<i>atu6020</i>	45.97		conserved hypothetical protein
<i>atu6021</i>	35.49	<i>noxB</i>	D-nopaline dehydrogenase
<i>atu6022</i>	46.54	<i>hyuA</i>	N-methylhydantoinase A/acetone carboxylase, beta subunit
<i>atu6023</i>	25.89	<i>hyuB</i>	N-methylhydantoinase B/acetone carboxylase, alpha subunit
<i>atu6024</i>	5.68		transcriptional regulator, LysR family
<i>atu6025</i>	21.01	<i>nocM</i>	ABC transporter, membrane spanning protein [nopaline]
<i>atu6026</i>	24.40	<i>nocQ</i>	ABC transporter, membrane spanning protein [nopaline]
<i>atu6027</i>	54.47	<i>nocT</i>	ABC transporter, substrate binding protein [nopaline]
<i>atu6028</i>	55.03	<i>nocP</i>	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [nopaline]
<i>atu6096</i>	3.15		conserved hypothetical protein
<i>atu6097</i>	3.29		cell filamentation protein
<i>atu8021</i>	-3.53	<i>fic</i>	conserved hypothetical protein

Table 1: List of differentially expressed genes in *A. tumefaciens* C58 *accR* background in presence of nopaline vs absence of nopaline. The genes were classified by their location and their functions. Fch: expression fold change. In blue are indicated the 8 downregulated genes.

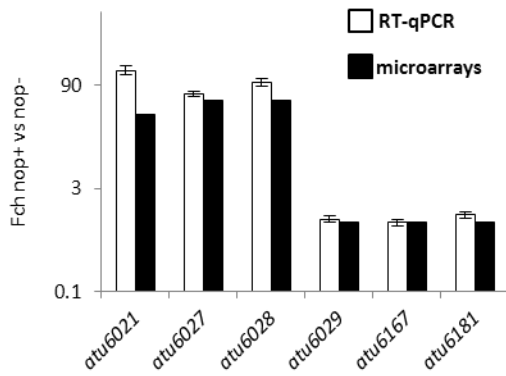


Figure 4: Comparison of the microarray and RT-qPCR results. Expression fold change (Fch) in presence of nopaline (nop+) vs absence of nopaline (nop-) for 6 *A. tumefaciens* C58 *accR* genes using quantitative RT-PCR (RT-qPCR) or microarray techniques. Mean values and SD of two independent experiments are presented.

Using the gene annotations from the *Agrobacterium* consortium (<http://agro.vbi.vt.edu/public/index.html>), we observed that the functional categories which were the most affected by nopaline exposure were related to amino acid biosynthesis and to energy metabolism (Table 1). As expected the two *noc* operons (*atu6025-28* and *atu6016-21*) involved in nopaline transport and catabolism were strongly upregulated (between 20 and 50 times). The three intervening genes between the two *noc* operons were also strongly upregulated. Besides these 13 genes only three other Ti plasmid-borne genes were differentially expressed: *atu6096* and *atu8021* coding for hypothetical proteins and *atu6097* coding for a cell filamentation protein. Interestingly in the linear chromosome an arginase-encoding gene (*arcA*) was strongly upregulated. Arginases are important enzymes in the catabolic pathway of nopaline and gene *atu6018* (*arc*) which is part of the second *noc* operon also encodes an arginase. ArcA and Arc share 61% of identity. In the circular chromosome we also found a transposase the expression of which was induced about 6 times. The five genes displaying the strongest downregulation were all located on the circular chromosome and four of them encoded hypothetical proteins. The gene *atu1997*, downregulated about 39 times, was annotated as a sulfite reductase.

Structures of NocT and NocT in complex with nopaline

The crystal of the mature free-liganded and liganded NocT at 1.89 and 1.55 Å resolution respectively contains two very similar molecules in the asymmetric unit as indicated by the overall root mean square deviations (RMSD) for all C α atoms of 0.6 Å and 0.46 Å

respectively. Another crystal of the liganded structure at 2.55 Å resolution (we call it partial complexed structure) comprises four monomers of NocT which are very similar 2 by 2: two show an unliganded form (RMSD for all C α atoms of 0.58Å) while the two others (RMSD for all C α atoms of 0.4 Å) show a disordered bound nopaline. The liganded form from the two complexed crystal structures adopt a similar closed conformation due to the presence of a bound nopaline while the unliganded form from the unliganded structure and from the partial complexed structure lead to two different open conformation. A 43° rotation around the hinge region of the C-terminal domain is observed once the N-terminal domain between the unliganded and liganded structures is superimposed leading to a movement of 16 Å for Thr168.

The mature monomeric NocT structure contains two globular domains, each consisting of a central β -sheet flanked by α -helices, both connected by two short strands forming the hinge region. This PBP of 283 residues possesses a typical fold of cluster F within the PBP structural classification (Berntsson et al., 2010). Indeed, a structural comparison of its closed form to all entries in the PDB using SSM-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/mrd-srv/ssm>) (Krissinel and Henrick, 2004) showed that the most similar overall structures are PBPs from the same class: the liganded structure of *E. coli* histidine binding protein HisJ (PDB code 1HSL, Yao et al., 1994) and the liganded structure of the lysine-arginine-ornithine binding protein LAO (PDB code 1laf, Oh et al., 1994) with RMSD values ranging from 1.47 to 1.5 Å over 226-228 C α atoms, corresponding to a sequence identity of 38 and 36% respectively.

The ligand binding site of NocT and comparison with HisJ/LAO

While the nopaline bound between the two closed lobes is very well defined in the electron density map in the 1.55 Å resolution structure, the end of the alpha-keto-glutarate part is disordered in the partial liganded structure. The electron density maps in the 1.55 Å resolution structure reveal that the nopaline is cyclized whereas it seems linear in the partial liganded structure.

The ligand-binding site of NocT is defined by the side chains of Glu36, Tyr39, Tyr42, Trp77, Ala94, Ala95, Gly97, Arg102, Thr115, Met117, Gln165, Thr168, Ser169, His170, Ser207, Phe235 and Val239. In both liganded structures, the arginine moiety of the nopaline which points toward the opening of the cleft makes three identical hydrogen bonds with the side

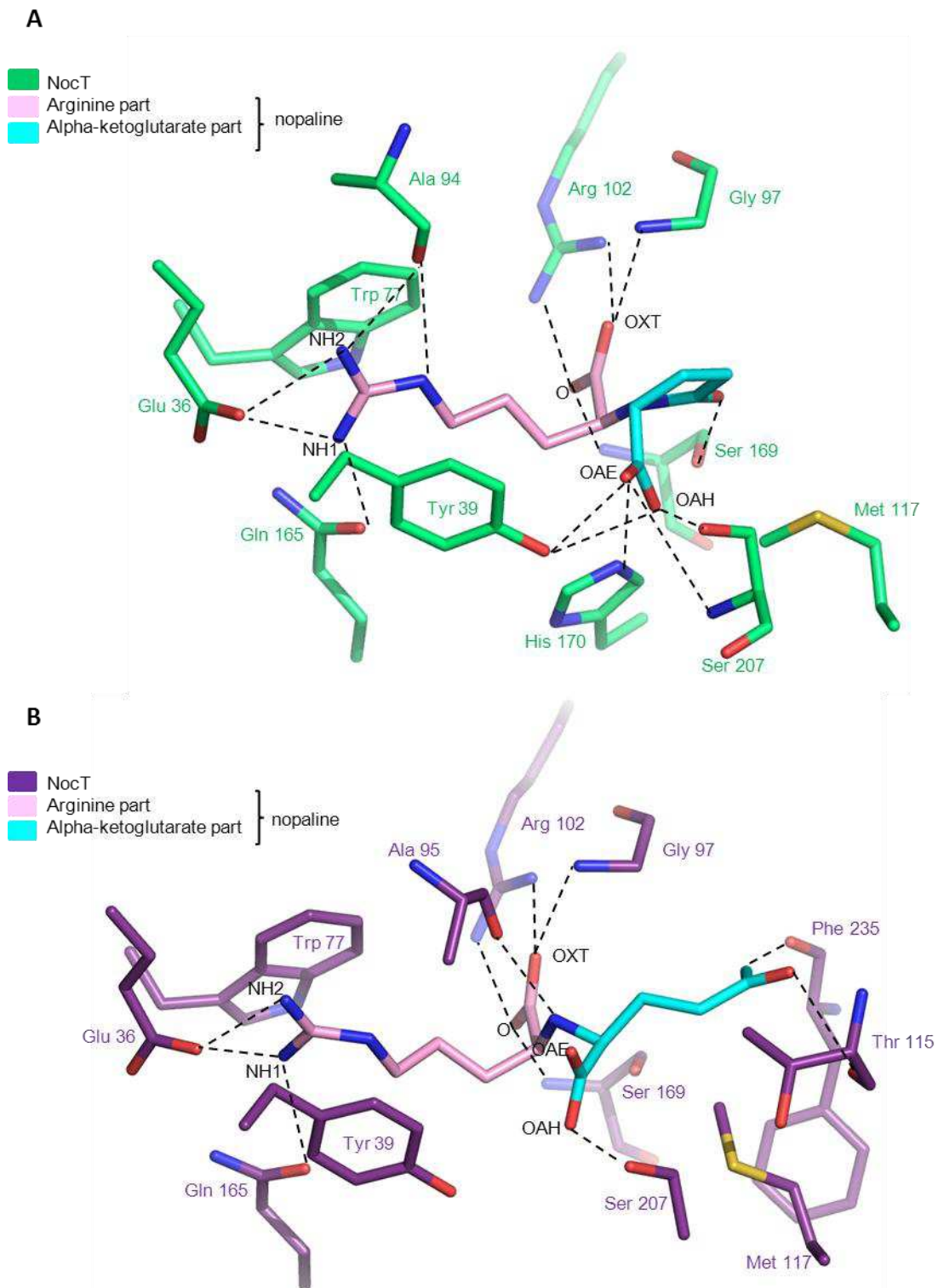


Figure 5: Structural characteristics of the nopaline-binding site of NocT. A Binding-site with cyclized nopaline **B** Binding-site with linear nopaline. The arginine and alpha-ketoglutarate parts of the nopaline molecule are detailed.

chains of Gln165 and Glu36 (Fig. 5A and 5B). In the cyclized nopaline, the guanidinium group makes an additional interaction with the hydroxyl group of Ala94 and the N atom also forms a hydrogen bond with the OH of Ala94. The arginine side chain of the nopaline is wedged between two aromatic residues: Trp77 and Tyr39. The carboxylate group of the arginine moiety in the nopaline makes a salt-bridge with the side chain of Arg102 and interacts with both NH of Gly97 and Ser169. In the cyclized conformation of the nopaline, its N atom cannot be in contact with NocT while in the linear conformation, this atom can interact with the main chain carbonyl group of Ala95 leading to a different position of the NH group. This results in the major change between the cyclized and the linear form of the nopaline. Indeed, while the first carboxylate group of the alpha-keto-glutarate part makes five hydrogen bonds with NocT involving the side chains of Tyr39, His170 and Ser207 as well as the NH of Ser207 in the cyclized nopaline, it makes only one hydrogen bond with the side chain of S207 due to a shift of 1-1.5 Å of the two oxygen atoms. In the cyclized conformation of the nopaline, the hydroxyl of the terminal carbon covalently linked to the N atom interacts with the side chain of Ser169. In the linear form of the nopaline, the terminal carboxylate group of the alpha-keto-glutarate moiety is mobile and thus not well defined in the electron density map. However this terminal carboxylate group could interact with both NH of Thr115 and Phe235. The large residue Met117 seems to restrain the binding site and to create a steric hindrance imposing the position of the linear form of the alpha-keto-glutarate moiety. Its side chain position is different according the type of nopaline. Unlike the linear form and although the cyclized form is compact, the cyclized nopaline forms more protein hydrogen bonds: 15 against 11, making this conformation preferential for NocT in terms of transport stability.

The ligand binding sites of NocT resembles that of HisJ and LAO around the arginine part as expected because HisJ and LAO have been shown to bind an arginine ligand. Two residues are conserved: Tyr39 which stacks the arginine side chain ligand and Arg102 which binds the carboxylate group of the arginine ligand. Glu36 is replaced by an equivalent Asp residue preserving the interaction with the guanidinium of the ligand. The positions of the side chain arginine ligand and its carboxylate group are similar in the three PBPs. The amino group of the arginine ligand is tightly bound in HisJ and LOA with the side chains of a serine at position 72 (corresponding to Gly97 in NocT) and an aspartate at position 161 (S207 in

Noct). These two interactions will be lost in Noct, presumably leading to a less efficient binding of an arginine ligand. The presence of S72 in HisJ and LAO seems incompatible with the nopaline binding due to steric clash.

The dissociation constants (Kd) between Noct and arginine, linear nopaline and cyclized nopaline were also measured using isothermal titration calorimetry. As expected from the above modeling, no interactions were found between Noct and arginine. In contrast the mean Kd values were 2.3 and 33.9 μM for cyclized and linear nopaline respectively.

Noct as an identifier of nopaline-binding periplasmic proteins

A search for Noct homologues in the three natural domains was performed using blastp. The closest archeal and eukaryotic relatives were predicted to be an *Archaeoglobus veneficus*

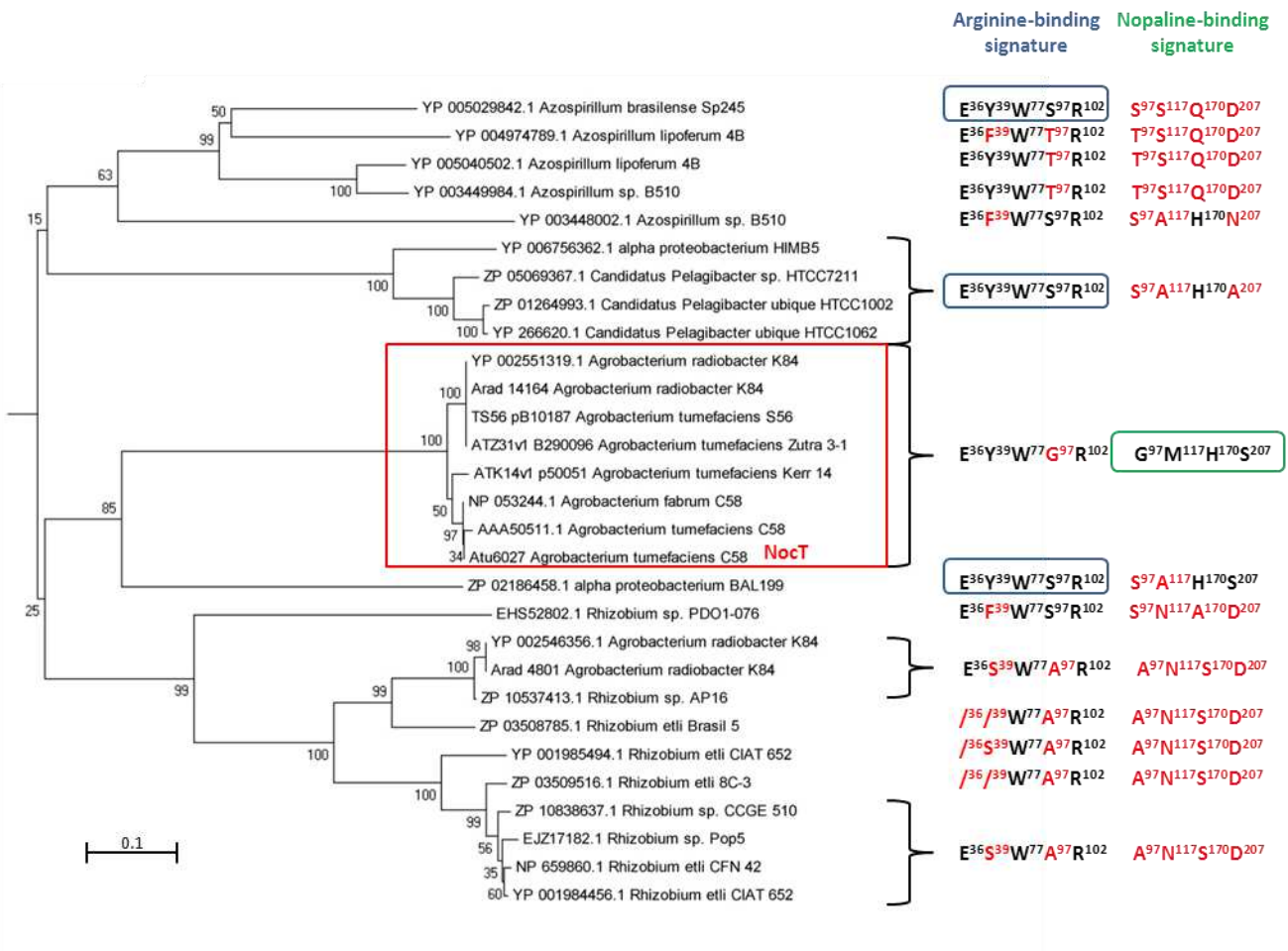


Figure 6: Noct phylogenetic subgroup (framed in red). Subtree of the relation tree of 553 Noct-related proteins collected from different bacterial species. In parallel the residues corresponding to the putative arginine- and nopaline-binding signatures are shown. Residue changes are indicated in red.

glutamine ABC transporter substrate-binding protein and a fruit fly histidine-binding periplasmic protein-like, respectively. Both proteins display less than 36% of identity with NocT. On the opposite 500 homologous sequences from bacteria with a threshold of at least 40% of identity were retrieved. To these were added 53 other homologous sequences (same criteria of identity) found in the different *Agrobacterium* genomes of the AgrobacterScope library (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/about/collabprojects.php?P_id=51). The relation tree of the total 553 proteins revealed different subgroups. The members of the NocT subgroup (after suppressing the redundancies due to the use of two different databases) belong to the strain K84 of *Agrobacterium radiobacter* and to 4 different strains of *A. tumefaciens*: C58, S56, Zutra 3-1 and Kerr 14 (Fig. 6). All proteins of the NocT subgroup contain a glycine at the corresponding position 97 of NocT, which surely makes them poor sensor of arginine. All these proteins also conserve the putative nopaline-binding signature (G⁹⁷M¹¹⁷H¹⁷⁰S²⁰⁷). Remarkably in the subgroups adjacent to NocT subgroup, this nopaline-binding signature is largely degenerated, suggesting that the ability to sense nopaline is highly specific to members of the NocT subgroup. Consistently *A. tumefaciens* S56, Zutra 3-1 and Kerr 14 harbor nopaline-type Ti plasmids and in the *A. radiobacter* K84 strain, the homologue *nocT* gene is located in a region exhibiting strong synteny with the *noc* operon of *A. tumefaciens* C58, including *nocQ* and *nocM* homologues. The capacity of *A. radiobacter* K84 to import nopaline was also confirmed by growing the strain in a medium where nopaline was the sole source of carbon and nitrogen (Fig. 7).

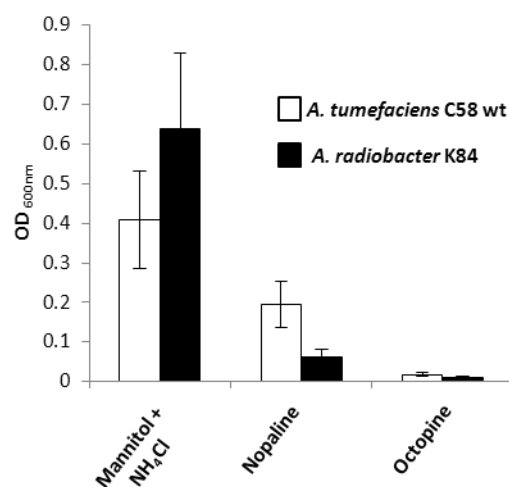


Figure 7: Comparative growth of *A. tumefaciens* C58 and *A. radiobacter* K84 with different sources of carbon and nitrogen. OD_{600nm} of *A. tumefaciens* C58 wt and *A. radiobacter* K84 cell cultures grown for 16 hours at an initial OD_{600nm} of 0.01 in presence of mannitol+NH₄Cl, nopaline or octopine as sole source of carbon and nitrogen. Mean values and standard deviation of two independent experiments are presented.

Discussion

The opine concept defines opines as key mediators of the interactions between *A. tumefaciens* and the plant host. It is notably assumed that production of opines in plant tumors contributes to the creation of an ecological niche propitious to the colonizing *A. tumefaciens* populations which are able to assimilate them (Dessaux et al., 1992, Dessaux et al., 1998). In this report we confirmed this assumption by demonstrating that in tomato tumors the fitness of *A. tumefaciens* C58 mutant cells unable to uptake and/or catabolize nopaline is diminished compared to their wt counterparts. It is however noteworthy that the fitness advantage conferred by nopaline could be detected only in harsh conditions (competition with other bacteria in relatively old tumors probably exhausted in nutritive sources). When tomato tumors were induced with single *A. tumefaciens* strains, there were not any significant differences in the efficiency of colonization between the mutants unable to assimilate nopaline and the control strain. Similarly the *nos* mutant which cannot promote production of nopaline in transformed plant cells colonized tomato tumors to the same extent as the control strain. In line with these results we also observed that the nopaline contents in tomato tumors remained globally unchanged at different time points whether these tumors were induced by *A. tumefaciens* C58 wt or by the mutant *nocT*, suggesting that nopaline is poorly consumed by virulent *A. tumefaciens* cells in plant tumors and that the benefits nopaline provides to the phytopathogen in this context is faint. As *A. tumefaciens* promotes the synthesis of more than one opine, it might be interesting in the future to assess the selective advantages of other opines comparatively to nopaline.

In this work we also investigated the genes underlying the selective advantage conferred by nopaline. Our transcriptomic analysis revealed that the expression levels of very few *A. tumefaciens* C58 genes were affected by the presence of nopaline. Of the 32 differentially expressed genes, 10 were already known to be nopaline-inducible and involved in the transport and catabolism of nopaline. These ten genes were *nocP*, *nocT*, *nocQ*, *nocM* (all 4 members of the first *noc* operon), *noxB*, *atu6020*, *noxA*, *arc*, *odh* and *ocd* (all six members of the second *noc* operon). In addition the three intervening genes between the two *noc* operons were strongly upregulated. A transcriptional leakage may account for this result. Another possibility could be that these three genes are involved in the nopaline catabolism

and the hypothesis that they contribute to the ring-opening of the cyclized nopaline is currently under investigation. An arginase-encoded gene (*arcA / atu4007*) located in the linear chromosome was also found to be upregulated about 50 times. As arginases are important for the catabolic pathway leading to the conversion of nopaline into proline, this enzyme might collaborate with the Arc protein from the *noc* operon and thence enhance efficiency of nopaline assimilation. The existence of a chromosomal arginase involved in the catabolism of nopaline has in fact already been suggested (Dessaux et al., 1986). Finally the expression of the gene *tnp (atu2107)* coding for a transposase of the IS3 family was induced about 6 times while that of *atu1997*, encoding a putative sulfite reductase, was repressed more than 38 times. The functions of these two genes upon exposure to nopaline remain unknown.

To exclusively benefit from the nopaline supply, *A. tumefaciens* C58 must have selected a specific nopaline transport system. We consequently were interested in the molecular and phylogenetic characteristics of the NocT protein which senses nopaline in the periplasms of *A. tumefaciens* C58 cells. The structures of NocT revealed that the protein is a typical PBP of the cluster F (Berntsson et al., 2010), adopting an open conformation when free-liganded and a closed conformation when bound to nopaline. The comparison between the two structures of liganded NocT also revealed that nopaline in complex with the PBP might be linear or cyclized, and that cyclized nopaline bound to NocT is more stable than the linear form. Whether these differences in nopaline structures reflect biological reality or are due to experimental artefacts has not been determined yet. Ongoing experiments to characterize the structures of the nopaline molecules produced *in vivo* shall help solve the question. On the other hand examination of the two liganded NocT structures was sufficient to identify key residues involved in the NocT / nopaline interactions and to propose a putative nopaline-binding signature composed of 4 amino acids (G⁹⁷M¹¹⁷H¹⁷⁰S²⁰⁷). In parallel comparative analysis of the NocT, HisJ and LAO structures resulted in a putative arginine-binding signature and provided an explanation why NocT has little affinity to arginine. Further confirmations of these signatures are in progress with the generation and analysis of different NocT mutants. Remarkably among the 553 proteins of this study, only those clustering with NocT exhibited an exact nopaline-binding signature. This finding stands as a serious indication that only members of the NocT subgroup are able to import and utilize

nopaline. Consistently four members of this group belong to *A. tumefaciens* strains harboring a nopaline-type Ti plasmid (data from AgrobacterScope). The strain *A. radiobacter* K84 is also known for carrying on one of its plasmid a region homologue to the *noc* region and it has been suggested that this plasmid derived from a nopaline-type Ti-plasmid (Clare et al., 1990). Additionally we proved here that *A. radiobacter* K84 could grow with nopaline as sole source of carbon and nitrogen. If our results overall sustain the notion that only *Agrobacterium* spp. can use nopaline, there are several mentions in literature of bacteria other than *Agrobacterium* which are able to assimilate nopaline, like *Pseudomonas* spp., *Afipia* sp., *Bosea* sp., *Duganella* sp., *Phyllobacterium* sp. or *Arthrobacter* sp. (Nautiyal and Dion, 1990, Oger et al., 2004). As these bacteria do not contain proteins homologue to NoCT according to our data, it is conceivable that nopaline sensing and transport is possible by different mechanisms. Characterization of these alternative nopaline transport systems and analysis of their ecological implications should be interesting for the future.

Material and Methods

Bacterial strains and culture conditions

All the *A. tumefaciens* used in this work were derivatives of *A. tumefaciens* C58. The pTiC58 derivatives pTinoCT::Gm, pTi::Gm, pTiocd::Gm and the *accR* background were obtained by inserting a gentamycin-resistance cassette into the genes *atu6027*, *atu6148*, *atu6016* and *atu6138* respectively as described previously (Haudecoeur et al., 2009). The plasmid pTinos::Km was obtained by inserting a kanamycin-resistance cassette into the gene *atu6015*. *A. tumefaciens* was cultivated at 30°C in *Agrobacterium* broth (AB) minimal medium supplemented with ammonium chloride (1g/L) and mannitol (2g/L) except when an alternative source of carbon and nitrogen is indicated, or in Luria Bertani modified medium (LBm; NaCl 5g/L instead of 10 g/L). Antibiotic concentrations were the following: gentamycin: 25µg/ml; kanamycin: 50µg/ml.

Inoculum preparation and infection of tomato plants

For single infections fresh *A. tumefaciens* cell cultures were spread on agar-LBm and grown for two days. For competition infections fresh *A. tumefaciens* cells cultures were mixed in a ratio (1:1), spread on agar-LBm and grown for two days. Before infection different samples of the inoculum were analyzed to determine the composition of the mixed populations. The tomato plants were grown in greenhouse with long day conditions and controlled temperature (24-28°C). About 1 month old plants were scalpel wounded between first and second node of the stem and inoculated with the bacteria.

Extraction and quantification of nopaline

Tomato tumors were ground in liquid nitrogen and resuspended in distilled water. Samples were then heated at 100°C, centrifuged to discard the residual plant material and concentrated in Speed Vac. Aliquots were finally spotted on high-quality chromatography paper (Whatman 3MM) and submitted to high-voltage electrophoresis in 1.1M acetic acid / 0.7M formic acid buffer. Arginine functions of the nopaline molecules were detected using phenantrenequinone (Sigma-Aldrich) reagent (typically 100ml of 0.1%phenantrenequinone in absolute ethanol + 25ml of 6N NaOH) and UV visualization. Quantification was performed with a calibration curve of pure nopaline and the Gel analysis tool of ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Numeration of bacterial populations

For each independent experiment, pools of 3 inoculum samples or 5-7 crushed tomato tumors (32dpi) were resuspended in NaCl 0.8% to recover the bacteria. Suspension dilutions were then spotted onto selective agar media to enumerate, through the colony-forming units (CFUs), the different bacterial populations. In case of competition infections where two strains harboring the same antibiotic resistance were present, discrimination of CFUs was performed by PCR.

RNA extraction and transcriptomic analysis

Overnight cultures of *A. tumefaciens* C58 *accR* cells were subcultured at an initial OD₆₀₀ of 0.1 in 50ml of AB mannitol, supplemented or not with 1mM of nopaline, in 500ml flasks. Cells were grown at 28°C for approximately 9 hours until early log phase (OD₆₀₀=0.4). Different aliquots of cells were harvested by centrifugation and stored at -80°C. RNA extraction was performed using phenol according to (Planamente et al., 2012).

RNA samples were reverse transcribed into cDNA using the WTA1 TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma). Resulting cDNA samples were purified using GenElute™ Clean-Up kit (Sigma) and labeled with Cy3 monoreactive dye. Purified Cy3-labelled cDNA were hybridized to NimbleGen 4-plex microarrays (Roche) containing probe sets for 5,355 genes that represent the entire *A. tumefaciens* C58 genome. After hybridization, microarrays were washed three times and scanned in MS200 NimbleGen scanner (Roche) at the PartnerChip platform (GénopoleEvry, France). Fluorescent signals were quantified using NimbleScan software and further processed and normalized with GeneSpring GX11 (Agilent). Normalized data of different samples were pairwise compared and P values corresponding to statistical t-test were attributed for each gene.

Cloning, expression and purification of NocT

PCR amplicons of *nocT* obtained from genomic *A. tumefaciens* C58 DNA, using GGAATTCCATATGAAGGACTACAAAAGCATT and TTTGCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGCTGCTTGGGGGAGGCGTC primers were cloned into pET-9aSN1 expression vector (a gift from S. Chéruef, IBBMC, University Paris Sud, Orsay, France). The nucleotide sequence was confirmed by DNA-sequence analysis. *Escherichia coli* Rosetta pLysS (Merck) was transformed by the recombinant plasmid. Cells were grown at 37°C in Tryptone-Yeast extracts broth supplemented with 0.5mM IPTG to induce NocT production, then centrifuged, resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, 20 mM imidazole and 500 mM NaCl and disrupted by sonication. After centrifugation at 20.000g for 30 min at 4 °C, the supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore Stericup) and loaded on a 5 ml Ni-NTA agarose column (GE Healthcare). Elution of NocT was performed with 50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. NocT containing fractions were loaded on a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with

50 mM Tris-HCl pH 8 and 150 mM NaCl. NocT was concentrated to 80 mg/ml using Vivaspinn-10kDa (Sartorius), and stored at -80 °C.

Crystallization and structure determination

Commercial crystallization solutions (QIAGEN kits) were screened in sitting-drop vapor diffusion experiments using a nanodrop Cartesian robot (Proteomic solutions) at 293 K. Crystals of NocT and NocT-nopaline in equimolar ratio were obtained in Classics Suite (2 M Ammonium Sulfate, 0.2 M K/Na Tartrate, 0.1 M tri-sodium citrate pH 5.6) and in PEG II Suite (30% (w/v) PEG 4000, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5) respectively. Crystals of NocT-nopaline in 1.2:1 molar ratio appeared in AmSO₄ Suite (2.2 M ammonium sulfate and 0.1 M ammonium tartrate). Conditions were manually optimized with home-made solutions in hanging drops composed of 1:1 volume ratio of crystallization solution and protein solution with or without the addition of nopaline. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (Al's Oil (Hampton Research) for AS conditions and the mother liquor supplemented with 20% (w/v) PEG 400 for PEG conditions) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA I beamline (synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin, France) and the ID-29 beamline (synchrotron ESRF, Grenoble, France). Intensities were integrated using XDS (Kabsch W, 1993).

The structures of NocT at 1.89 Å resolution, was solved by molecular replacement with Phaser (McCoy et al, 2007) using the coordinates of the N-terminal (residues 1-86 and 197-238) and the C-terminal (residues 93-185) of the *E.coli* histidine binding protein HisJ (1HSL; Yao et al., 1994) as two search models. The structure of the liganded NocT at 2.55 and 1.55 Å resolution were determined by molecular replacement with Phaser (McCoy et al, 2007) using the coordinates of N-terminal (residues 29-112 and 239-284) and C-terminal (residues 117-231) domains of NocT as two search models. The resulting electron density maps revealed a nopaline bound to NocT in the two subunits of the asymmetric unit of the structure at 1.55 Å resolution (equimolar ratio NocT:nopaline) while 2 molecules over 4 in the asymmetric unit bind a disordered nopaline in the structure at 2.55 Å resolution (1.2:1 molar ratio of NocT:nopaline). Refinement of each structure was performed with BUSTER-TNT (Blanc et al., 2004) and inspection of the resulting model and density maps was achieved using COOT for manual rebuilding (Emsley and Cowtan, 2004). Data collection,

processing statistics and refinement details of the three structures are given in Supplementary Table 1. Molecular graphics images were generated using PYMOL (<http://www.pymol.org>)

Bioinformatic analysis

Sequences were analyzed using blastP from NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/search/blast.php?>). Alignments of NocT and related sequences were conducted using ClustalW. Relationship tree was build using MEGA Version 5. The phylogeny was inferred using the neighbor-joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The evolutionary distances are in units of the number of amino acid substitutions per site.

Supplementary Table 1: Crystallographic data and refinement parameters

	Noct	Noct Ligand (partial)	Noct Ligand
PDB code			
Precipitant	SA	PEG 4000	PEG 4000
Space group	<i>C121</i>	<i>P4₃2₁2</i>	<i>P32</i>
Cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 118.9 <i>b</i> = 69.7 <i>c</i> = 74.4 <i>β</i> = 117.9	<i>a</i> = 124.5 <i>b</i> = 124.5 <i>c</i> = 188.4 <i>β</i> = 90	<i>a</i> = 114.5 <i>b</i> = 114.5 <i>c</i> = 37.8 <i>β</i> = 120
Resolution (Å)	1.89 -38.84 (1.89-2)	2.55-37 (2.55-2.7)	1.55-22.69 (1.55-1.64)
No. of observed reflections	259569 (41688)	500578 (78067)	446821 (66404)
No. of unique reflections	43103 (6909)	48995 (7654)	80447 (12944)
R_{sym} (%) ^a	5.3 (53.4)	13.5 (89.2)	5.5 (90.4)
Completeness (%)	99.4 (99.2)	99.7 (98.4)	99.9 (99.3)
I/σ	22.43 (3.61)	13.9 (2.3)	17.2 (2.02)
number of reflections for refinement	43021	48892	80412
R_{cryst} (%) ^b	22.58	19.7	17.8
R_{free} (%) ^c	27.31	23.4	20.1
rms bond deviation (Å)	0.01	0.01	0.01
rms angle deviation (°)	1.12	1.2	1.07
Average B (Å ²)			
protein	33.2	49.3	28.1
ligand	-	70.6	22.2
solvent	35.9	41.6	37.6

^a $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i th observed amplitude of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean amplitude for all observations i of reflection hkl .

^b $R_{cryst} = \sum ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$

^c 5 % of the data were set aside for free R-factor calculation.

Values for the highest resolution shell are in parentheses

References

- Beck Von Bodman, S., Hayman, G. T. & Farrand, S. K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 643-7.
- Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J. & Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett*, 584, 2606-17.
- Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S. M. & Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 2210-21.
- Clare, B. G., Kerr, A. & Jones, D. A. (1990) Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease. *Plasmid*, 23, 126-37.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. & Goodman, H. M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet*, 1, 561-73.
- Dessaux, Y., Petit, A., Tempe, J., Demarez, M., Legrain, C. & Wiame, J. M. (1986) Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol*, 166, 44-50.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 2126-32.
- Farrand, S. K. & Dessaux, Y. (1986) Proline biosynthesis encoded by the *noc* and *occ* loci of *Agrobacterium* Ti plasmids. *J Bacteriol*, 167, 732-4.
- Guyon, P., Petit, A., Tempé, J. and Dessaux, Y. (1993). *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 6, 92-98.
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.
- Kreusch, D., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1995) Ti plasmid-encoded octopine and nopaline catabolism in *Agrobacterium*: specificities of the LysR-type regulators OccR and NocR, and protein-induced DNA bending. *Mol Gen Genet*, 249, 102-10.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 2256-68.
- Lam, S.T., Torkewitz, N.R., Nautiyal, C.S. and Dion, P. (1991). *Phytopathology*, 81, 1163-64.
- Lam, S.T. and Gaffney, T. (1993). In *Biotechnology in plant disease control*, pp. 291-320. Wiley-Liss, New York.

- Lippincott, J. A., Beiderbeck, R. & Lippincott, B. B. (1973) Utilization of octopine and nopaline by *Agrobacterium*. *J Bacteriol*, 116, 378-83.
- Marincs, F. & White, D. W. (1993) Nopaline causes a conformational change in the NocR regulatory protein-nocR promoter complex of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiT37. *Mol Gen Genet*, 241, 65-72.
- Marincs, F. & White, D. W. (1995) Divergent transcription and a remote operator play a role in control of expression of a nopaline catabolism promoter in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biol Chem*, 270, 12339-42.
- Nautiyal, C. S. & Dion, P. (1990) Characterization of the Opine-Utilizing Microflora Associated with Samples of Soil and Plants. *Appl Environ Microbiol*, 56, 2576-2579.
- Oger, P. M., Mansouri, H., Nesme, X. & Dessaux, Y. (2004) Engineering root exudation of *Lotus* toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microb Ecol*, 47, 96-103.
- Oh, B. H., Ames, G. F. & Kim, S. H. (1994) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J Biol Chem*, 269, 26323-30.
- Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Morera, S. & Faure, D. (2012) Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 86, 1085-99.
- Platt, T. G., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2012a) A cooperative virulence plasmid imposes a high fitness cost under conditions that induce pathogenesis. *Proc Biol Sci*, 279, 1691-9.
- Platt, T. G., Fuqua, C. & Bever, J. D. (2012b) Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen. *Evolution*, 66, 1953-65.
- Ryder, M. H., Tate, M. E. & Jones, G. P. (1984) Agrocinnopine A, a tumor-inducing plasmid-coded enzyme product, is a phosphodiester of sucrose and L-arabinose. *J Biol Chem*, 259, 9704-10.
- Sans, N., Schroder, G. & Schroder, J. (1987) The Noc region of Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cyclodeaminase. *Eur J Biochem*, 167, 81-7.
- Savka, M.A. and Farrand, S.K. (1997). *Nature Biotechnology*, 15, 363-68.
- Schardl, C. L. & Kado, C. I. (1983) A functional map of the nopaline catabolism genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Gen Genet*, 191, 10-6.
- Von Lintig, J., Kreusch, D. & Schroder, J. (1994) Opine-regulated promoters and LysR-type regulators in the nopaline (noc) and octopine (occ) catabolic regions of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 176, 495-503.
- Von Lintig, J., Zanker, H. & Schroder, J. (1991) Positive regulators of opine-inducible promoters in the nopaline and octopine catabolism regions of Ti plasmids. *Mol Plant Microbe Interact*, 4, 370-8.

Yao, N., Trakhanov, S., Quijcho, F.A. (1994). Refined 1.89 Å Structure of the Histidine-Binding Protein Complexed with Histidine and Its Relationship with Many Other Active Transport/Chemosensory Proteins. *Biochem*, 33, 4769-4779.

Zanker, H., Lurz, G., Langridge, U., Langridge, P., Kreuzsch, D. & Schroder, J. (1994) Octopine and nopaline oxidases from Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular analysis, relationship, and functional characterization. *J Bacteriol*, 176, 4511-7.

Zanker, H., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1992) Opine transport genes in the octopine (occ) and nopaline (noc) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 174, 841-9.

ADDENDUM

Les caractéristiques structurales et phylogénétiques de la protéine de liaison à l'octopine OccJ contribuent à l'avantage sélectif d'*Agrobacterium tumefaciens* B6 au sein des tumeurs végétales

Introduction

Nous avons montré dans la partie précédente comment l'importation de la nopaline dans les cellules d'*A. tumefaciens* C58, rendue possible par la protéine périplasmique de liaison (PBP) NoCT, pouvait conférer un avantage sélectif à la bactérie pathogène au sein des tumeurs végétales. Dans le cadre de ce travail nous avons notamment obtenu les premières structures de PBP en complexe avec un ligand opine et suggéré qu'il serait intéressant de comparer ces données avec celles d'autres PBPs se liant à d'autres opines afin de mieux comprendre les spécificités de leur transport et les avantages sélectifs susceptibles d'en découler.

La nopaline et l'octopine sont deux opines produites dans les tumeurs végétales par des plasmides Ti de type différents. Malgré cela les deux molécules sont relativement proches au niveau structural. La nopaline est formée à partir d'arginine et d'alpha-cetoglutarate tandis que l'octopine est synthétisée à partir d'arginine et de pyruvate (Lippincott et al., 1973). Toutes deux présentent ainsi un squelette arginine (Fig. 1). De manière conséquente les

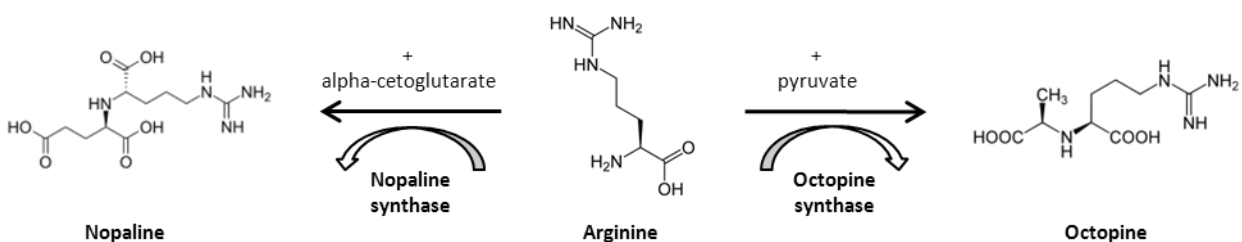


Figure 1: Comparaison des structures chimiques et des voies de synthèse de la nopaline et de l'octopine.

régions impliquées dans le transport et le catabolisme de ces opines (la région *Noc* pour les plasmides Ti de type-nopaline et la région *Occ* pour les plasmides Ti de type-octopine) sont elles aussi relativement proches (Fig. 2) (Farrand and Dessaux, 1986, Zanker et al., 1992, von Lintig et al., 1994, Kreuzsch et al., 1995). Plus précisément les PBP's NocT (d'*A. tumefaciens* C58) et OccJ (d'*A. tumefaciens* B6), responsables de la perception et de l'initiation du transport de la nopaline et de l'octopine respectivement, partagent une identité de séquence de 46% environ.

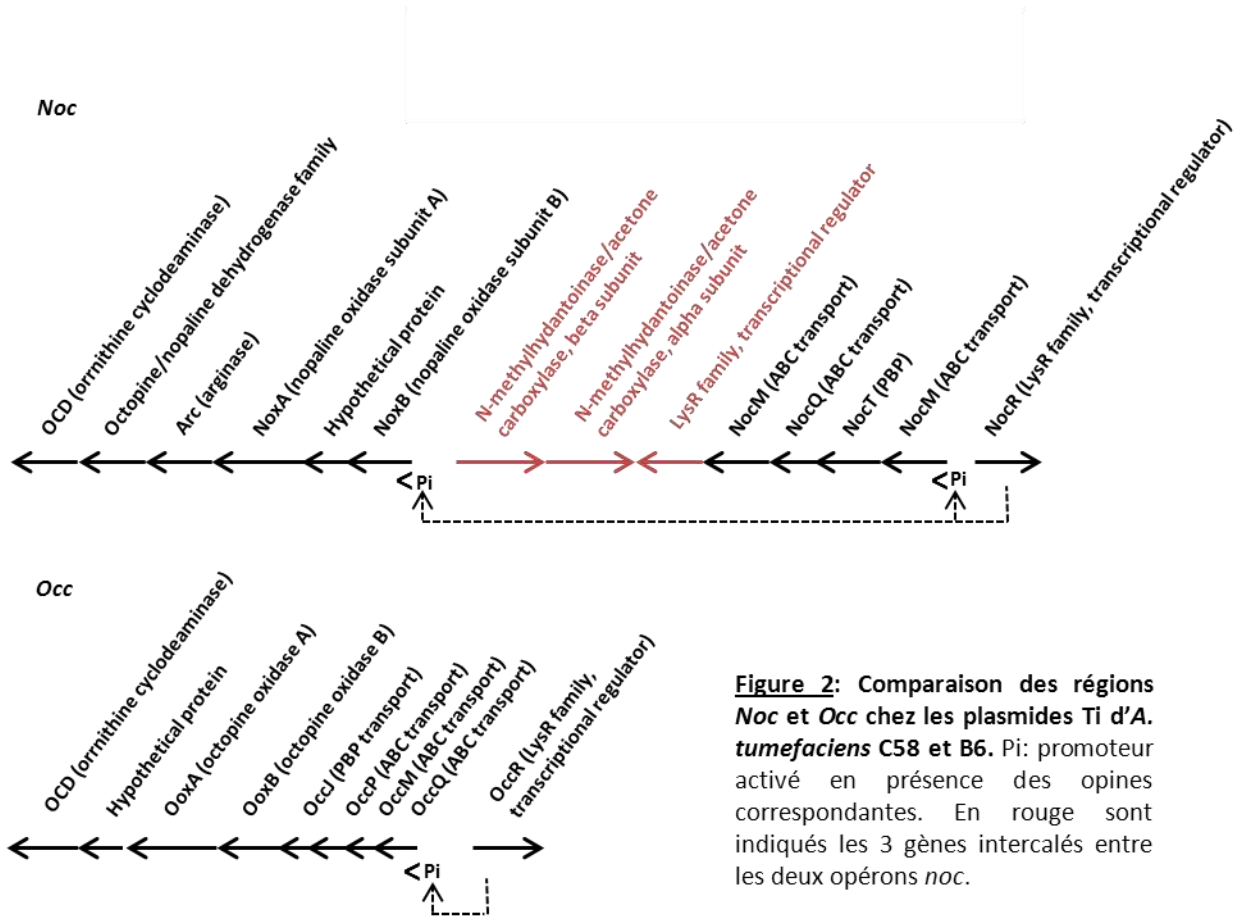


Figure 2: Comparaison des régions *Noc* et *Occ* chez les plasmides Ti d'*A. tumefaciens* C58 et B6. Pi: promoteur activé en présence des opines correspondantes. En rouge sont indiqués les 3 gènes intercalés entre les deux opérons *noc*.

Dans le travail présent nous avons reproduit la même approche que précédemment avec cette fois-ci le couple OccJ/octopine, afin de voir 1) si l'importation d'octopine dans les cellules d'*A. tumefaciens* B6 conférerait un avantage sélectif différent de celui procuré par la nopaline pour *A. tumefaciens* C58 ; 2) quelles sont les propriétés moléculaires de OccJ et de sa liaison avec l'octopine en comparaison du couple NocT/nopaline ; 3) quel est le spectre

des organismes susceptibles d'utiliser un système identique à *OccJ* pour l'assimilation d'octopine.

Ce travail est toujours en cours. Ne seront présentés ici que des résultats préliminaires.

Résultats

Caractéristiques du mutant *occJ*

Le mutant *occJ* a été obtenu par insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine dans la séquence du gène éponyme de la souche B6 d'*A. tumefaciens*. Contrairement à son pendant sauvage (B6 wt) le mutant est incapable de croître dans un milieu ne contenant que de l'octopine comme source de carbone et d'azote (Fig. 3A). Des dosages en octopine à différents temps post-infection révèlent que les tumeurs induites par la souche B6 wt contiennent moins d'octopine que celles induites par le mutant *occJ* (Fig. 3B). Ce résultat suggère que les cellules d'*A. tumefaciens* B6 consomment activement l'octopine au sein des tumeurs.

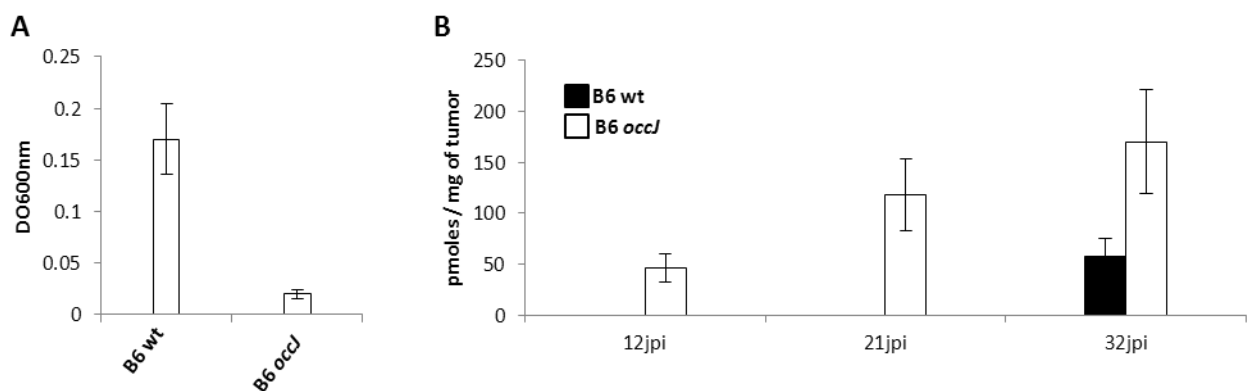
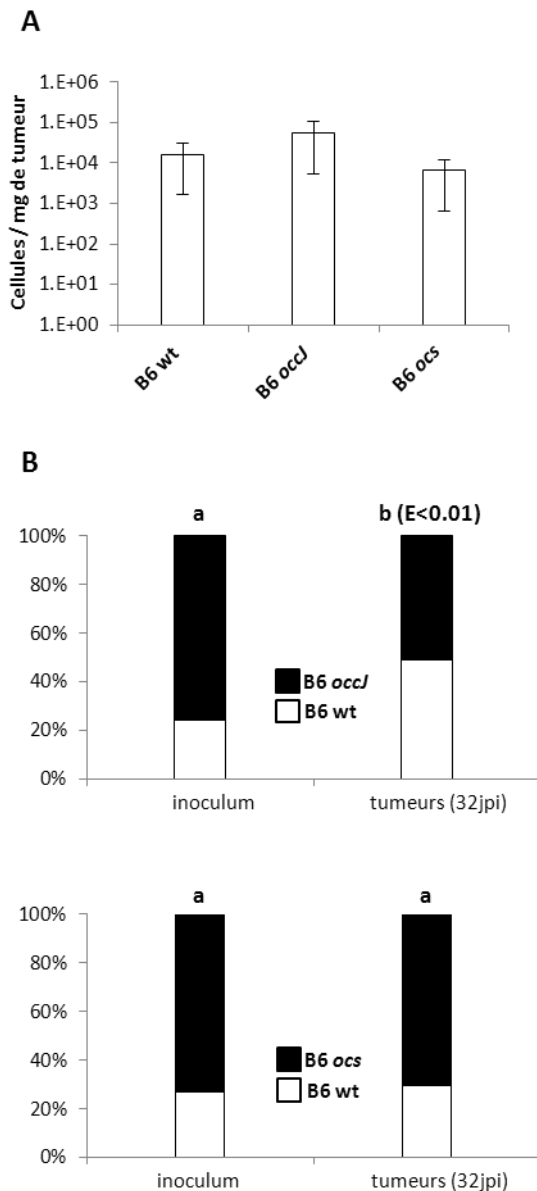


Figure 3: Caractéristiques du mutant *A. tumefaciens* B6 *occJ*. **A** DO_{600nm} de cultures cellulaires d'*A. tumefaciens* B6 wt et B6 *occJ* mises sous agitation pendant 16 heures à une DO_{600nm} initiale de 0.01, en présence d'octopine comme seule source de carbone et d'azote. Les valeurs moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes sont présentés. **B** Concentrations en octopine dans des tumeurs induites soit par B6 wt soit par B6 *occJ* à trois temps différents (jpi: jours post-infection). Les valeurs moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes incluant chacune deux réplicats sont présentés.

Caractérisation de l'avantage sélectif conféré par l'assimilation d'octopine

Pour caractériser l'avantage sélectif conféré par l'octopine, nous avons infecté des plants de tomates soit avec les souches B6 wt et B6 *occJ* seules, soit avec un mélange de ces deux souches. Comme contrôle nous avons répété la même procédure avec un autre mutant B6 : le mutant *ocs* incapable de synthétiser l'octopine mais capable de l'assimiler. Les résultats sont présentés dans la figure 4. Comme c'était le cas pour la nopaline, le gain de fitness procuré par l'assimilation de l'octopine n'est observable que dans la condition de compétition. Dans le cas des infections avec une seule souche, les colonisations par B6 wt,



occJ et *ocs* sont similaires (Fig. 4A), tandis que dans l'infection en compétition *wt/occJ*, la composition de la population bactérienne entre l'inoculum et la tumeur mature est déplacée à l'avantage de la souche wt capable d'importer l'octopine (Fig. 4B). Pour l'infection en compétition *wt/ocs*, nous ne distinguons pas de déplacement de populations. Ce résultat indique que l'octopine synthétisée dans les cellules végétales transformées par la

Figure 4: Analyse du fitness d'*A. tumefaciens* B6 dans des tumeurs de plants de tomates. A Efficacité de colonisation 32 jours après infection simple avec les souches B6 wt, B6 *occJ* et B6 *ocs*. Les valeurs moyennes et les écarts-types issus de 2 expériences indépendantes incluant chacune 5 à 7 tumeurs sont présentés. **B** Proportions des populations bactériennes dans l'inoculum et les tumeurs matures sur plants de tomates (32jpi) pour 2 expériences différentes de co-infection: B6 wt/*occJ* et B6 wt/*ocs* (jpi: jours post-infection). Le test de Fischer exact, appliqué sur une sélection d'UFCs (18<n<24) a été utilisé pour l'analyse statistique. Pour chaque condition de co-infection, 2 expériences indépendantes ont été réalisées et ont produit des résultats similaires.

souche B6 wt profite autant à cette dernière qu'à la souche mutante (Fig. 4B).

Afin de comparer l'avantage sélectif conféré par la nopaline à celui conféré par l'octopine, nous avons co-infecté des plants de tomates avec une souche de type nopaline (la souche C58 wt abritant un plasmide Ti modifié avec une cassette de résistance à la gentamycine) et une souche de type octopine (la souche B6 wt). Dans ce cas l'analyse compositionnelle des populations bactériennes entre le moment de l'infection et les tumeurs matures ne révèle pas de différence significative (Fig. 5). Ce résultat laisserait entendre que les deux souches B6 et C58 d'*A. tumefaciens* pourraient cohabiter « pacifiquement » au sein des tumeurs et que chacune serait capable de se créer à son avantage sa propre niche écologique. Pour tester la contribution de la niche octopine dans cet équilibre, nous avons reproduit la même

expérience que précédemment avec deux autres souches contenant un plasmide Ti de type octopine : les mutants *occJ* et *ocs* incapables d'assimiler l'octopine. Curieusement, même dans ces conditions, nous n'observons pas de déplacement significatif de populations entre les souches contenant un plasmide Ti de type nopaline et celles contenant un plasmide Ti de type octopine (Fig. 5). Nous en déduisons que, dans nos conditions expérimentales,

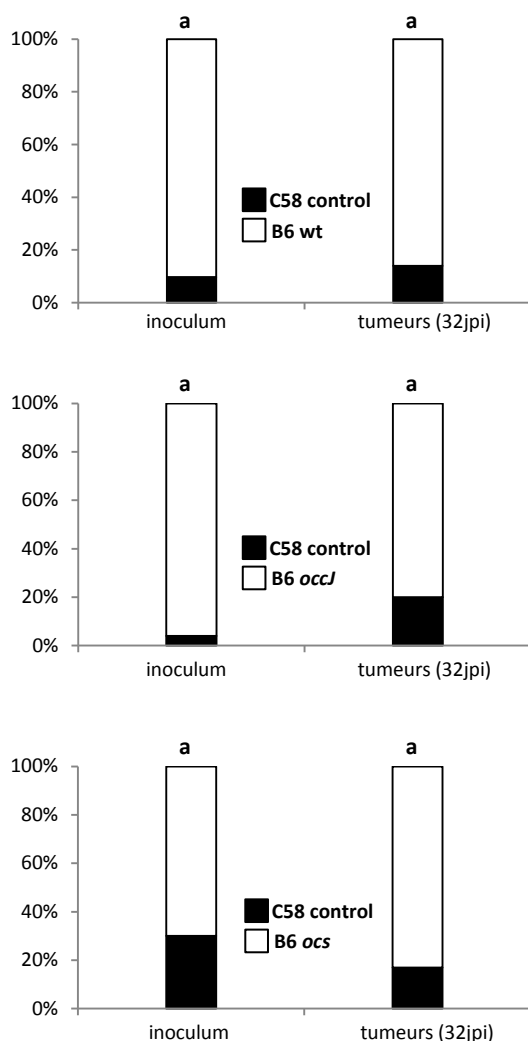


Figure 5: Proportions des populations bactériennes de l'inoculum et des tumeurs matures sur plants de tomates pour 3 expériences différentes de co-infection: C58 control/B6 wt; C58 control/B6 *occJ* et C58 control/B6 *ocs*. Le test de Fischer exact, appliqué sur une sélection d'UFCs ($18 < n < 24$) a été utilisé pour l'analyse statistique. Pour chaque condition de co-infection, 2 expériences indépendantes ont été réalisées et ont produit des résultats similaires. jpi: jours post-infection.

l'octopine ne confère pas à la souche B6 un avantage sélectif significatif par rapport à la souche C58.

Propriétés structurales et affinité du complexe OccJ/octopine. Comparaison avec le complexe NocT/nopaline

Deux structures d'OccJ ont été obtenues, une vide à 2.01 Å et une en liaison avec l'octopine à 1.94 Å. Comme NocT, OccJ est une PBP de la classe F. L'analyse de la structure ligandée d'OccJ a permis d'identifier les résidus importants pour la liaison avec l'octopine et de proposer une signature putative de liaison à l'octopine : $S^{97}N^{117}T^{169}N^{208}$ (d'après la numérotation de séquence NocT) (Fig. 6). La superposition des structures de NocT et OccJ en liaison montre une importante similarité de conformation entre les deux protéines. Cette superposition met également en évidence l'importance du résidu 117 pour les spécificités de liaison de NocT et OccJ avec leur opine respective. Une hypothèse en voie d'exploration serait que la transformation de la méthionine 117 en asparagine pourrait permettre à la protéine NocT de se lier à l'octopine.

Des expériences de microcalorimétrie ont par ailleurs été réalisées afin de déterminer les

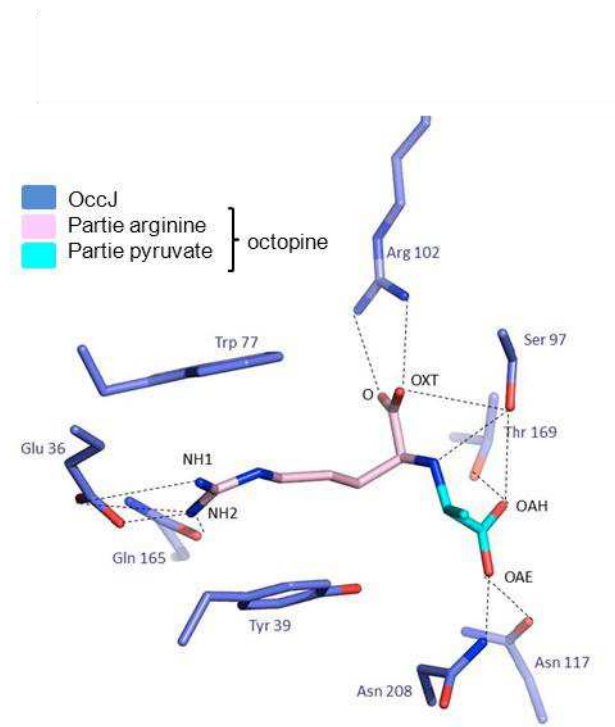


Figure 6: Caractéristiques structurales du site de liaison à l'octopine d'OccJ. Les parties arginine et pyruvate de l'octopine sont détaillées.

affinités d'OccJ envers 3 substrats différents. Les constantes de dissociation (Kd) entre OccJ et l'octopine, l'arginine et la nopaline sont ainsi respectivement de 15nM, 30µM et ND (non déterminable). Ces résultats soulignent la très grande affinité d'OccJ pour l'octopine ainsi que sa spécificité pour ce ligand comparativement à la nopaline. Ils indiquent également que, contrairement à NocT, OccJ est capable de former une liaison relativement stable avec l'arginine. De façon cohérente, nous retrouvons

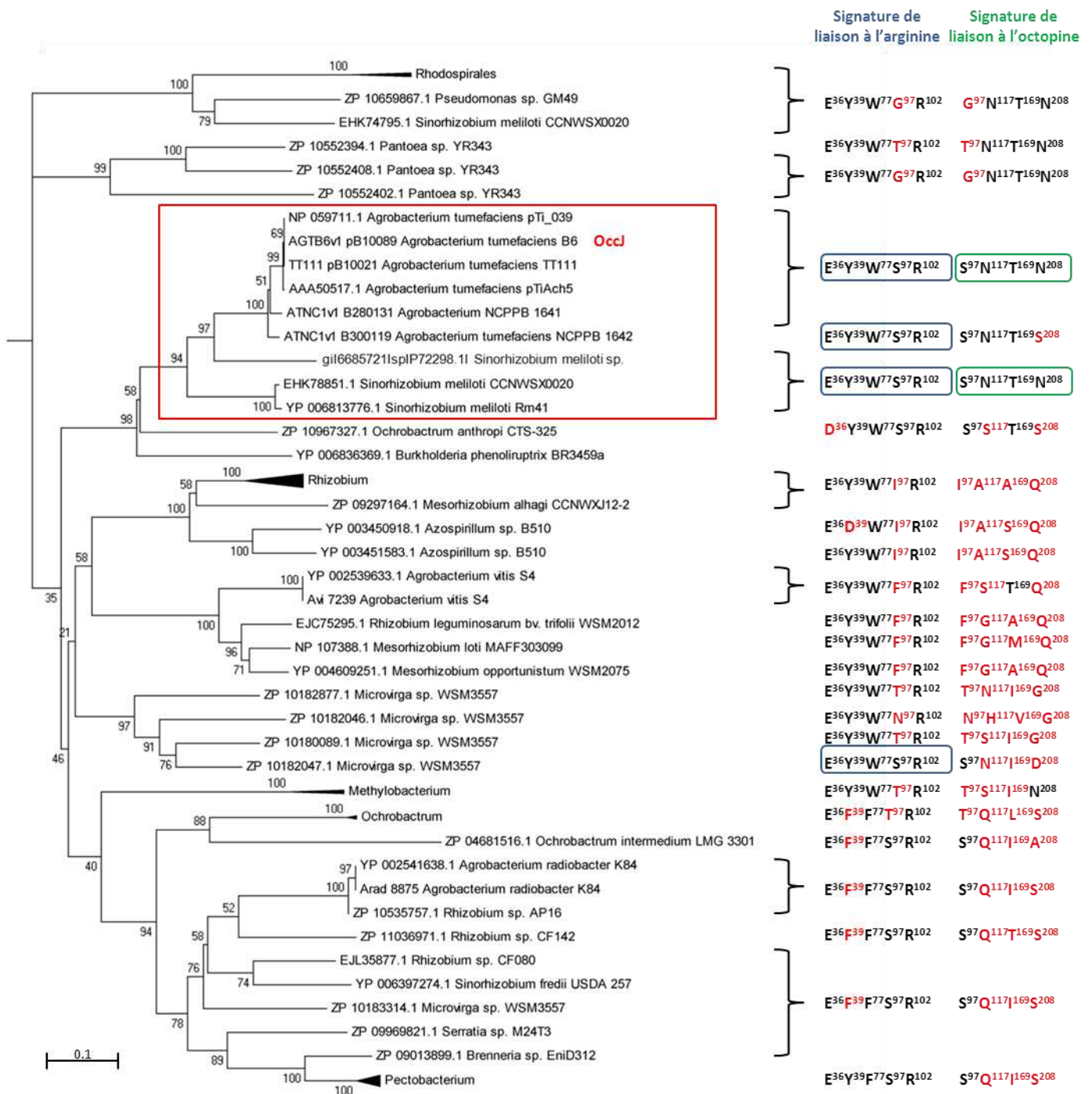


Figure 7: Groupe phylogénique d'OccJ (encadré en rouge). Sous-arbre de l'arbre phylogénique obtenu à partir de 553 protéines homologues à NocT dans différentes espèces bactériennes. En parallèle sont indiquées les signatures putatives de liaison à l'arginine et à l'octopine. Les changements dans ces signatures sont indiqués en rouge.

chez OccJ la signature putative de liaison à l'arginine (E³⁶Y³⁹W⁷⁷S⁹⁷R¹⁰²) que nous avons avancée dans notre travail précédent.

OccJ comme identificateur de protéines périplasmiques de liaison à l'octopine

OccJ fait partie des 553 protéines homologues à NocT qui ont été analysées précédemment. Dans l'arbre des relations phylogénétiques obtenu, OccJ apparaît dans un sous-groupe contenant 9 séquences (Fig. 7). Ces séquences appartiennent (après suppression des redondances dues à la consultation de 2 banques de données distinctes) à 4 souches d'*A. tumefaciens* (B6, TT111, NCPPB1641 et NCPPB1642) et 3 souches de *Sinorhizobium meliloti* (CCNWSX0020, Rm41 et sp.). De manière remarquable, tous les membres du sous-groupe OccJ présentent la signature de liaison à l'octopine (à l'exception d'une souche *S. meliloti*, peut-être en raison d'une erreur d'annotation). Dans les autres groupes, cette signature est fortement dégénérée, suggérant que, parmi les 553 protéines analysées, seuls les membres

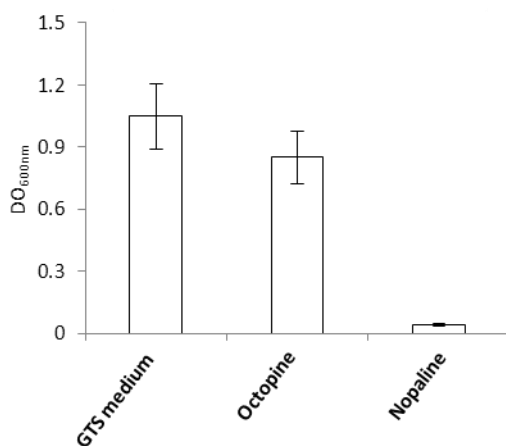


Figure 8: Test de croissance de *Sinorhizobium meliloti* Rm41 dans différents milieux de culture. DO_{600nm} de cultures cellulaires de *S. meliloti* Rm41 mises sous agitation pendant 16 heures à une DO_{600nm} initiale de 0.03, dans un milieu GTS standard et dans deux milieux GTS modifiés de telle sorte que l'octopine et la nopaline soient les seules sources de carbone et d'azote disponibles. Les valeurs moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes sont présentés

du groupe OccJ présentent la capacité de lier l'octopine. Sans surprise les 4 souches d'*A. tumefaciens* correspondantes à ce groupe sont caractérisées comme étant de type octopine (AgrobacterScope). Il existe par ailleurs, entre les souches de *S. meliloti* et d'*A. tumefaciens* étudiées ici, une forte synténie au niveau des loci *occJ*. Cette synténie inclut des gènes homologues aux gènes de transport de l'octopine. Il est donc probable que les 3 souches de *S. meliloti* présentes dans le sous-groupe OccJ sont capables d'assimiler l'octopine. Comme élément de confirmation de cette hypothèse,

nous avons démontré l'aptitude de la souche *S. meliloti* Rm41 à croître dans un milieu contenant l'octopine comme seule source de carbone et d'azote (Fig. 8). Enfin nous notons

que la signature putative de liaison à l'arginine que nous avons proposée se retrouve chez tous les membres du groupe OccJ.

Discussion

Les résultats de cette étude établissent que dans les tumeurs de tomate, l'octopine confère un avantage sélectif à la souche *A. tumefaciens* B6 wt par rapport à une souche mutante *occJ* incapable de l'assimiler. Nous obtenons ainsi un résultat similaire à celui de la nopaline avec *A. tumefaciens* C58. Cela étant les dosages en octopine de tumeurs induites par B6 wt et *occJ* suggèrent que l'octopine est activement assimilée par les souches d'*A. tumefaciens* B6, contrairement à ce que nous avons observé pour la nopaline dans des tumeurs induites par *A. tumefaciens* C58 (Article 3). Le Kd très faible du couple OccJ/octopine (de l'ordre du nM) comparativement au Kd du couple Noct/nopaline (de l'ordre du μ M) pourrait expliquer cette différence.

Nos résultats montrent également que les souches d'*A. tumefaciens* C58 (contenant un plasmide Ti de type nopaline) et B6 (contenant un plasmide Ti de type octopine) peuvent cohabiter au sein de tumeurs végétales sans que l'une prenne le pas sur l'autre. Il semble de plus que cet équilibre entre les deux souches d'*A. tumefaciens* soit indépendant de la présence d'octopine dans les tumeurs comme source nutritive potentielle. Ce dernier résultat est surprenant parce que les synthèses de nopaline et d'octopine dans les cellules végétales sont en compétition l'une avec l'autre pour le substrat arginine. On aurait donc pu croire que des modifications de la niche octopine affecteraient la niche nopaline et partant l'équilibre entre les souches C58 et B6. D'autres expériences sont ainsi nécessaires pour mieux comprendre l'influence des différentes opines dans les équilibres de population bactériennes au sein des tumeurs végétales. Signalons cependant que les souches B6 et C58 d'*A. tumefaciens* utilisées dans cette étude appartiennent à deux espèces génomiques distinctes (G4 et G8 respectivement), et qu'elles sont en conséquence munies d'« armes » relativement différentes dans leur adaptation à l'environnement tumoral (Lassalle et al., 2011). Ces différences pourraient expliquer l'impact minime de certaines niches opines dans les compétitions B6/C58.

Au niveau structural les comparaisons de NocT/nopaline avec OccJ/octopine révèlent que ces deux complexes présentent de nombreuses similarités. L'examen critique des structures a toutefois permis de discriminer les résidus clefs impliqués dans les spécificités de liaison de NocT et OccJ. Les hypothèses résultantes sont en cours de validation avec la génération de différents variants d'OccJ et de NocT. La différence la plus marquante entre OccJ et NocT, mise en évidence par les expériences de microcalorimétrie, réside en la capacité d'OccJ à former une liaison relativement stable avec la molécule d'arginine. Cette différence est consolidée par la présence de la signature de liaison à l'arginine chez OccJ et son absence chez NocT.

Pour finir, l'analyse de notre arbre de relations phylogénétiques confirme que la capacité à transporter l'octopine par un senseur de type OccJ est hautement spécifique à *A. tumefaciens*, bien que certaines souches de *S. meliloti* possèdent elles aussi un système analogue et sont capables d'assimiler l'octopine. Dans le passé une étude a rapporté l'existence de souches de *Pseudomonas* capables d'assimiler l'octopine (Bergeron et al., 1990). Dans notre arbre, nous retrouvons bien une souche *Pseudomonas* sp. GM49, mais la protéine correspondante ne possède pas la S^{97} que nous pensons importante pour la liaison à l'octopine. Pour expliquer cette inconsistance, il est possible soit que les souches de *Pseudomonas* identifiées dans la littérature comme capables d'assimiler l'octopine sont en fait différentes de *Pseudomonas* sp. GM49 et possèdent un système d'assimilation indépendant, soit que la S^{97} n'est pas nécessaire à la liaison d'OccJ avec l'octopine. Pour répondre à cette question, la capacité de *Pseudomonas* sp. GM49 à assimiler l'octopine devra être vérifiée. Enfin notons que d'après notre arbre phylogénétique, aucune espèce bactérienne ne possède la capacité de percevoir l'octopine et la nopaline simultanément.

Matériel et Méthodes

Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches dérivées d'*A. tumefaciens* C58 sont décrites dans le travail précédent. Les mutants *ocs* et *occl* ont été obtenus par insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine dans les gènes éponymes de la souche *A. tumefaciens* B6 selon la méthode de clonage standard décrite précédemment (Haudecoeur et al., 2009). Les conditions de culture sont les mêmes que dans le travail précédent. Le milieu GTS a été préparé selon (Kiss et al., 1979)

Infection des plants de tomates, Numération des populations bactériennes, Analyse bioinformatique

(Se reporter à l'Article 3)

Extraction et quantification de l'octopine

La même procédure que pour l'extraction et la quantification de la nopaline (voir Article 3) a été adoptée. En effet la méthode est basée sur la révélation chimique des résidus arginine présents aussi bien chez la nopaline que l'octopine.

Clonage, Expression et Purification d'OccJ, Cristallisation et Détermination des structures, Microcalorimétrie

Toutes ces expériences ont été réalisées par Armelle Vigouroux (LEBS, Gif-sur-Yvette). Pour les détails, se reporter à son mémoire pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études (http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ephe.sorbonne.fr%2Fimages%2Fstories%2Fscd_ephe%2Fmonographies_svt%2Fbiol_cell_mol%2Fephe_dip_vigouroux_13.pdf&ei=FoJyUZ3DENC2hAfVnIEg&usg=AFQjCNGd9bdYXVgX9qrEkHzkMZ6h6PixJQ&sig2=1THV6-LsEYmGiHn6bcF8PA&bvm=bv.49784469,d.ZG4)

Bibliographie

Bergeron, J., Macleod, R. A. & Dion, P. (1990) Specificity of octopine uptake by *Rhizobium* and *pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1453-8.

Farrand, S. K. & Dessaux, Y. (1986) Proline biosynthesis encoded by the *noc* and *occ* loci of *Agrobacterium* Ti plasmids. *J Bacteriol*, 167, 732-4.

Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.

Kiss, G. B., Vincze, Z., Kalman, T., Forrai, and A. Kondorosi. (1979). Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 113:105–118.

Kreusch, D., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1995) Ti plasmid-encoded octopine and nopaline catabolism in *Agrobacterium*: specificities of the LysR-type regulators OccR and NocR, and protein-induced DNA bending. *Mol Gen Genet*, 249, 102-10.

Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Gueguen, L., Daubin, V., Muller, D. & Nesme, X. (2011) Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol Evol*, 3, 762-81.

Lippincott, J. A., Beiderbeck, R. & Lippincott, B. B. (1973) Utilization of octopine and nopaline by *Agrobacterium*. *J Bacteriol*, 116, 378-83.

Von Lintig, J., Kreusch, D. & Schroder, J. (1994) Opine-regulated promoters and LysR-type regulators in the nopaline (*noc*) and octopine (*occ*) catabolic regions of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 176, 495-503.

Zanker, H., Von Lintig, J. & Schroder, J. (1992) Opine transport genes in the octopine (*occ*) and nopaline (*noc*) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 174, 841-9.

Chapitre IV. Régulation du QS d'*A. tumefaciens* par le GABA et la lactonase AttM

1. Contexte scientifique

Le GABA est un acide aminé non protéique multifonctionnel et présent chez les eucaryotes aussi bien que les procaryotes. Depuis plusieurs années notre équipe a développé une thématique de recherche sur le rôle du GABA dans la communication interrègne *A. tumefaciens*-plantes hôtes. Des travaux réalisés précédemment ont ainsi abouti à l'identification et la caractérisation de deux systèmes d'importation du GABA chez *A. tumefaciens*. Il a également été montré que le GABA pouvait induire l'expression du gène *attM* codant pour une lactonase capable de dégrader les molécules d'OC8HSLs. Cela étant l'influence d'AttM sur le QS d'*A. tumefaciens*, spécialement dans des conditions naturelles, reste difficile à évaluer. Une étude portant sur l'efficacité de conjugaison du plasmide Ti dans des tumeurs de tomates a notamment conclu que la protéine AttM n'avait qu'un impact modéré et transitoire sur le QS d'*A. tumefaciens in planta*.

2. Présentation des travaux

Afin d'apporter un nouvel éclairage à la question, nous avons examiné de façon critique les voies de transport et de métabolisme du GABA dans des tumeurs d'*Arabidopsis thaliana* et dans des populations infectieuses d'*A. tumefaciens*. Pour ce faire nous avons tiré avantage de données transcriptomiques globales que nous avons complétées par des analyses métabolomiques et histologiques de tumeurs matures. L'objectif était d'acquérir une meilleure compréhension de la façon dont le GABA produit par les plantes pouvait être rendu accessible aux cellules d'*A. tumefaciens* au sein des tumeurs et ainsi induire l'expression d'*attM*.

Nos résultats montrent que, si les niveaux d'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme du GABA chez *A. thaliana* variaient peu, les concentrations de GABA ainsi que

de molécules métaboliquement reliées au GABA augmentaient, elles, pour la plupart, de manière significative dans les tumeurs. Nous avons également observé que si les gènes codant pour le transport du GABA chez la plante ne sont pas induits dans les tumeurs comparativement à des tiges contrôles, leur expression est cependant active et spécifique à certains tissus tumoraux. Chez *A. tumefaciens*, en comparant une population provenant d'une tumeur mature à celle d'un site d'infection, nous avons constaté que les expressions de seulement trois gènes impliqués dans le transport ou le métabolisme du GABA étaient affectées. Parmi ceux-ci nous avons retrouvé *attM* dont l'expression était induite d'un facteur 3 environ.

En parallèle nous avons réalisé des tests de conjugaisons avec des plantes d'*A. thaliana* sauvages ou accumulant des niveaux ectopiques de GABA. Nos résultats ont ainsi clairement démontré que le niveau de GABA dans les tumeurs influençait de façon négative le QS d'*A. tumefaciens*. Des expériences supplémentaires avec des souches d'*A. tumefaciens* déficientes pour le gène *attM* ont enfin établi que cet effet négatif était largement (mais pas totalement) dépendent de l'activité lactonase d'AttM.

Nos résultats sont présentés sous forme d'article (version provisoire).

3. Contributions

Comme spécifié dans la partie « Material and Methods », les analyses transcriptomiques et métabolomiques ont été effectuées en collaboration avec des plates-formes techniques du Génopole et de l'INRA respectivement. Les mutants d'*A. tumefaciens* utilisés dans cette étude étaient déjà disponibles dans le laboratoire. Les lignées transgéniques d'*A. thaliana*, à l'exception de *pGAT1::GUS* (construite pour les besoins de cette étude) ont été généreusement fournies par les équipes qui les ont produites.

Plant GABA content and bacterial lactonase AttM contribute to quorum-quenching in populations of *Agrobacterium tumefaciens* colonizing *Arabidopsis thaliana* tumors

Abstract

In *Agrobacterium tumefaciens*, quorum-sensing (QS) controls conjugation and vegetative replication of the Ti plasmid through production and sensing of *N*-acyl homoserine lactone molecules. These QS signal molecules can be degraded by the GABA-inducible bacterial AttM lactonase. However the role of this protein in modulating QS during colonization of plant tumors is not fully understood so far. In an attempt to gain new insight into this question we examined here GABA transport and synthesis pathways in mature *Arabidopsis thaliana* tumors at both metabolomic and transcriptional levels in order to understand more precisely how the metabolite might promote AttM activity in a pathogenic context. Further conjugation assays with transgenic plant overaccumulating GABA and bacterial donor strain defective in *attM* clearly established that both GABA levels and *attM* function impacted *A. tumefaciens* QS *in planta*. At last differences between our results and a previous report were discussed.

Introduction

Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) is a ubiquitous non-protein amino acid involved in various developmental, metabolic and signaling processes. GABA acts as a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of vertebrates and invertebrates (Watanabe et al., 2002, Conti et al., 2004). In plants, functions of GABA were evidenced in pollen tube growth guidance (Palanivelu et al., 2003), adaxial-abaxial patterning of leaves (Toyokura et al., 2012), cell elongation control (Renault et al., 2011), in responses to different biotic and abiotic stresses (Bouche et al., 2003a, Miyashita and Good, 2008, Shelp et al., 2012) as well

as in pH homeostasis (Feehily and Karatzas, 2013), C-metabolism (Renault, 2013) and Red/ox balance (Bouche et al., 2003b). Other reports also pointed at the role of GABA in bacteria-plant interkingdom communication (Bouche and Fromm, 2004, Shelp et al., 2006, Park et al., 2010, Dagorn et al., 2013).

The *Agrobacterium tumefaciens* quorum-sensing (QS) system controls the vegetative replication and conjugation of the Tumor-inducing (Ti) plasmid according to the concentration in the environment of diffusible QS signal molecules, the 3-oxo-octanoylhomoserine lactones (OC8HSLs) (White and Winans, 2007). The bacterial gene *attM* (= *blcC*), located on the companion At plasmid, codes for a lactonase which confers the ability to grow on Gamma-Butyrolactone (GBL) as sole source of carbon and to degrade OC8HSLs (Zhang et al., 2002, Carlier et al., 2004, Chai et al., 2007). Finding that expression of *attM* was inducible by GABA and GABA-derived compounds such as Gamma-Hydroxy Butyric acid (GHB) or Succinic SemiAldehyde (SSA) (Chevrot et al., 2006, Wang et al., 2006) led to the hypothesis that, in the course of tumor development and *A. tumefaciens* colonization, plants could modulate bacterial QS through GABA production and AttM action. However extent of GABA import and AttM activation in colonizing populations of *A. tumefaciens* is not known (White and Finan, 2009, Haudecoeur et al., 2009b, Haudecoeur and Faure, 2010). For instance proline which accumulates in plant tumors is a potent antagonist of GABA transport in *A. tumefaciens* and might therefore interfere with the GABA effects on the bacterial QS (Haudecoeur et al., 2009a). Noticeably previous comparative conjugation assays in tomato tumors with both *A. tumefaciens* WT or *attM* mutant donor strains revealed only minor differences and authors of the study therefore concluded that AttM did not quench *A. tumefaciens* QS (Khan and Farrand, 2009).

Here we performed histological analysis and took advantage of metabolomic as well as genome-wide transcriptional data to critically examine activities of GABA metabolism in *Arabidopsis thaliana* tumors and in colonizing *A. tumefaciens* cells. Further conjugation assays in *A. thaliana* tumors also demonstrated that bacterial *attM* gene and increased levels of GABA negatively impacted *A. tumefaciens* QS. Taken together our results suggest that the quorum-quenching effect of AttM could be dependent on the metabolomic status of the plant host. In regard of this proposition the differences between our results and a previous one were discussed.

Results

Content of GABA, GABA-related metabolites and amino acids in plant tumors

The plant GABA metabolism and transport pathways are presented in Fig. 1. To assess the status of these pathways during crown gall disease, we performed metabolomic analysis of mature *A. thaliana* tumors and control tissues using gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) technique. Besides GABA and GABA-related compounds our analysis also included 22 amino acids, some of them likely to interfere with GABA transport.

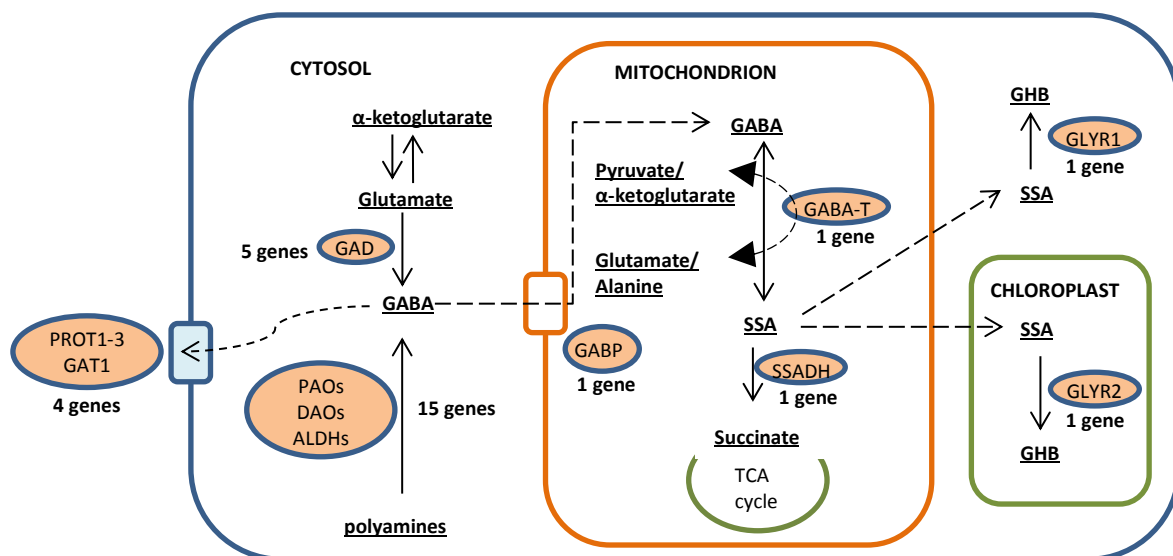


Figure 1: Representation of the metabolic GABA pathways in a plant cell. GABA can be formed either by degradation of polyamines or as a part of the GABA-shunt from glutamate. The GABA-derived metabolites are Succinic SemiAldehyde (SSA) and Gamma-Hydroxy Butyric acid (GHB). Circled in blue are the proteins involved in the enzymatic and transport processes. The number of corresponding genes in the *Arabidopsis thaliana* genome is also indicated. PROT1-3: PROLINE/GABA TRANSPORTER 1-3; GAT1: GABA TRANSPORTER 1; GAD: GLUTAMATE DECARBOXYLASE; PAO: POLYAMINE OXIDASE; DAO: DIAMINE OXIDASE; ALDH: ALDEHYDE DEHYDROGENASE; GABA-T: GABA TRANSAMINASE; GABP: GABA PERMEASE; SSADH: SUCCINIC SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE; GLYR: GLYOXYLATE/SUCCINIC SEMIALDEHYDE REDUCTASE; TCA: Tricarboxylic Acid.

As a result three distinct categories of compounds were defined according to their absolute concentrations in the tumors (Fig. 2A). In the first one we found alanine, asparagine, aspartate, glutamine, serine, glutamate and threonine which were present at more than 1nmole/mg of fresh weight. The second one comprised succinate, arginine, histidine, proline, valine, ethanolamine and GABA with a concentration range between 0.1 and 1nmole/mg of fresh weight. The last class encompassed GHB, SSA, putrescine, spermidine,

pyruvate, beta-alanine, methionine, glycine, leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, tyrosine, tryptophane and cysteine all present at less than 0.1nmole/mg of fresh weight.

In parallel we considered the variations in concentrations of these compounds between mature tumors and control tissues (Fig. 2B). If pyruvate, succinate and GHB levels remained comparable in the two conditions, all the other compounds were drastically more abundant

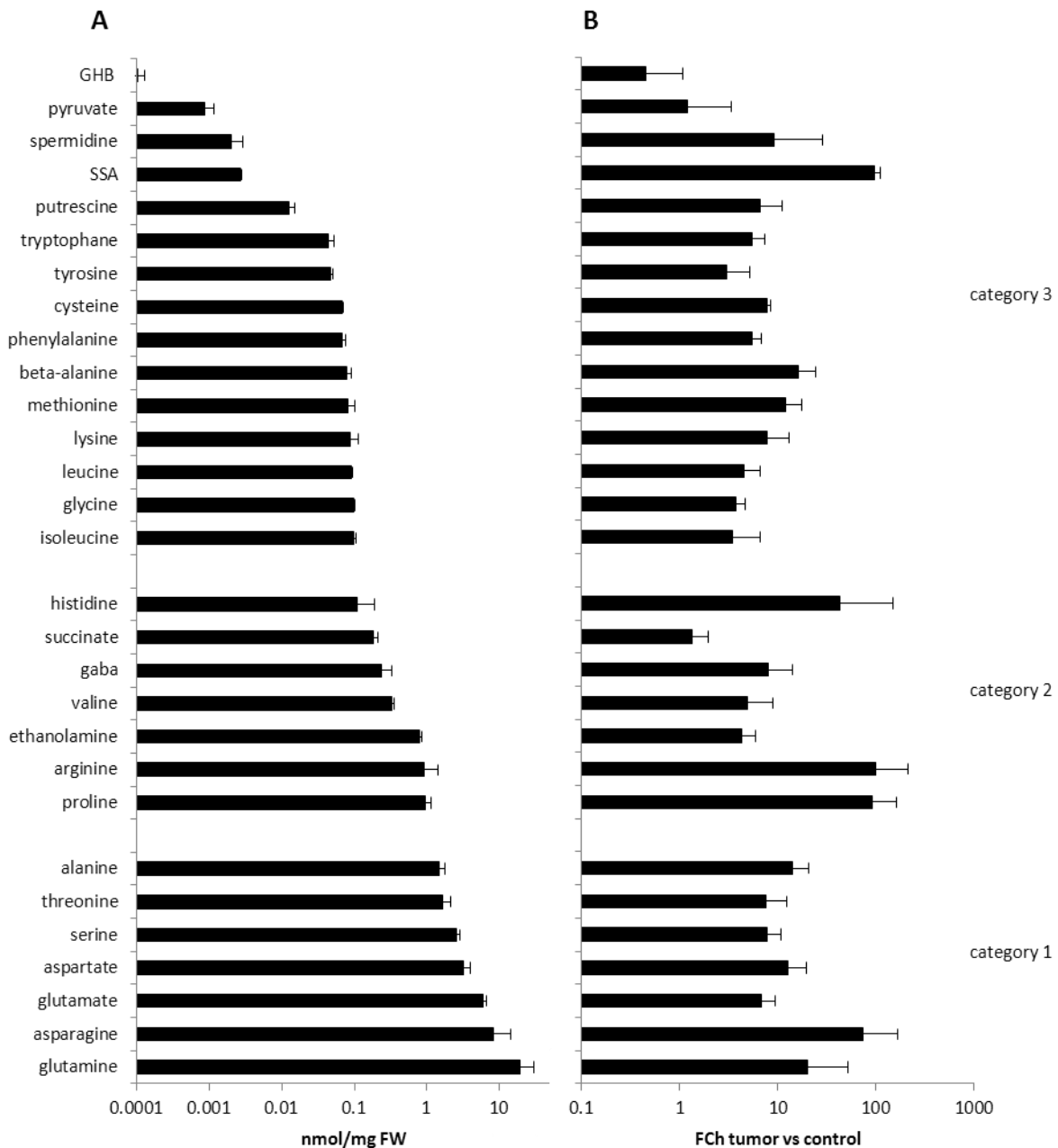


Figure 2: Dosage of GABA-derived metabolites and amino acids in *A. thaliana* mature tumors. **A** Metabolite and amino acid concentrations in mature tumors. Three categories were defined. **B** Fold change (FCh) in concentrations between tumor and control tissues. Mean values and SD of three independent experiments are presented.

in tumors than in control tissues. Tryptophan, cysteine, glycine, leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, serine, threonine, tyrosine, valine, ethanolamine, spermidine, putrescine, GABA and glutamate were between three and ten times more present in tumors than in control tissues while alanine, asparagine, aspartate, glutamine, methionine, histidine and beta-alanine were at least 10 times more abundant in tumors than in control. The most important variations were observed for SSA, proline and arginine with an increase of about one hundredfold. Interestingly, based on these data, we noticed that the ratio GABA:proline shifted from 3:1 in control tissues to 1:4 in tumors while the ratio GABA:alanine went from 1:3 to 1:6. As proline and alanine antagonize GABA transport in plants as well as in *A. tumefaciens* (Grallath et al., 2005, Haudecoeur et al., 2009a), this result suggests that in the tumor compartment the two amino acids can efficiently interfere with GABA metabolism.

Transcriptional characterization of GABA metabolism and transport genes in plant tumors

Twenty-nine *A. thaliana* genes were selected from the literature as being involved in plant GABA metabolism and transport (Fig. 1) (Bouche et al., 2004, Grallath et al., 2005, Meyer et al., 2006, Michaeli et al., 2011, Shelp et al., 2012). The expression profiles of these genes were then investigated using genome-wide transcriptional data obtained through CATMA technology by comparing RNA content of mature *A. thaliana* tumors versus control tissues (Table 1). Among the 29 genes, 15 coded for enzymes responsible for degradation of polyamines into GABA including 5 polyamine oxidases (PAO1-5), 8 diamine oxidases (DAO1-

GABA-shunt			GABA transport			Polyamine catabolism		
AGI code	Name	FCh	AGI code	Name	FCh	AGI code	Name	FCh
AT5G17330	GAD1	2.17	AT2G39890	PROT1	1.03	AT5G13700	PAO1	1.04
AT1G65960	GAD2	0.88	AT3G55740	PROT2	1.01	AT2G43020	PAO2	0.96
AT2G02000	GAD3	1.08	AT2G36590	PROT3	1.43	AT3G59050	PAO3	0.79
AT2G02010	GAD4	0.91	AT1G08230	GAT1	1.12	AT1G65840	PAO4	1.23
AT3G17760	GAD5	0.97	AT2G01170	GABP	0.88	AT4G29720	PAO5	0.56
AT3G22200	GABA-T	1.09				AT1G62810	DAO1/CuAO1	1.01
AT1G79440	SSADH	1.81				AT3G43670	DAO2	0.99
AT3G25530	GLYR1	1.06				AT4G12290	DAO3	0.89
AT1G17650	GLYR2	0.95				AT1G31670	DAO4	0.96
						AT1G31690	DAO5	0.90
						AT1G31710	DAO6	0.72
						AT4G14940	DAO7/AO1	0.94
						AT2G42490	DAO8	0.86
						AT1G74920	ALDH10A8	1.18
						AT3G48170	ALDH10A9	1.34

Table 1: Gene expression fold change (FCh) in *A. thaliana* tumor versus control tissues. Expression of twenty-nine genes involved in GABA-shunt, GABA transport and polyamine catabolism were examined. Significant FChs are indicated in bold.

8) and 2 aldehyde dehydrogenases (ALDH10A8-9). With the exception of *PAO5* exhibiting a downregulation of 0.56, the expression of none of these genes was affected in the tumors.

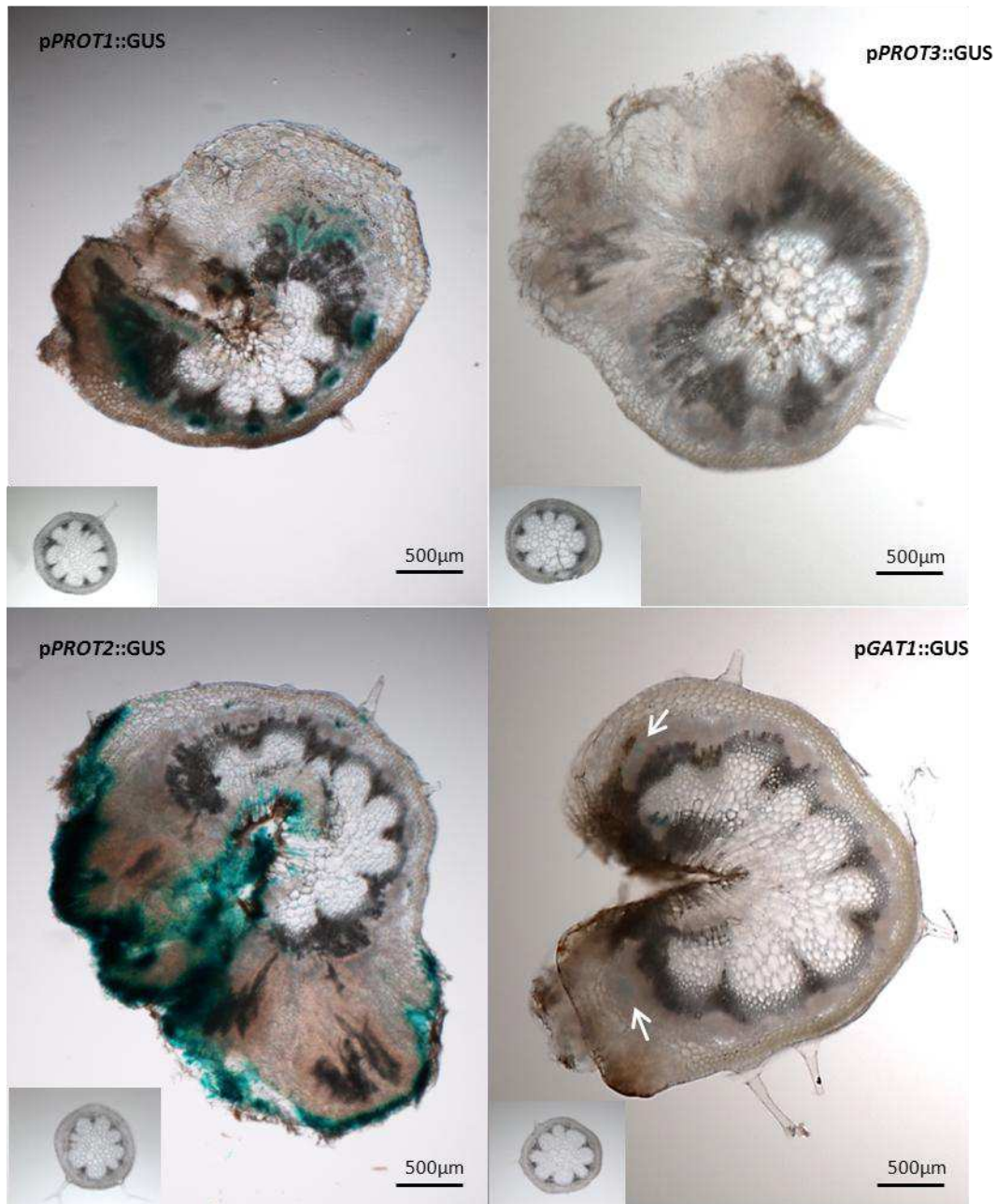


Figure 3: Expression pattern of plant GABA transporters in *A. thaliana* tumors. Four transgenic *A. thaliana* lines harboring the promoter of *PROT1*, *PROT2*, *PROT3* and *GAT1* fused to the reporter gene *GUS* (p*PROT1-3*::*GUS* and p*GAT1*::*GUS*) were analyzed. Approximately 100µm thick cross-sections of 18dpi tumors were submitted to GUS staining. In each picture the inset corresponds to GUS control on healthy (non-wounded; non-infected) stems. Indicative scale bars are presented. When needed arrows point towards GUS signal.

On the other hand, of the 9 identified genes participating in the GABA-shunt pathway, only *GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE 1 (GAD1)* and *SUCCINIC SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (SSADH)* were mildly upregulated by 2.17 and 1.81 respectively. The expression of the four other *GAD* homologues (*GAD2-5*), of the *GABA-TRANSAMINASE* as well as the two *GLYOXYLATE/SUCCINIC SEMIALDEHYDE REDUCTASES (GLYR1-2)* remained unchanged according to the transcriptomic data. At last neither the three *PROLINE/GABA-TRANSPORTER (PROT1-3)* genes nor the *GABA-TRANSPORTER (GAT1)* gene nor the mitochondrial *GABA PERMEASE (GABP)* gene exhibited significant variation of expression in mature tumors. Overall these results tend to indicate that GABA metabolism and transport in *A. thaliana* tumors are poorly activated at the transcriptional level.

This last finding prompted us to look further at the expression characteristics of the GABA genes, and especially of the GABA transporter genes. Histological examination of tumors induced on the stems of four different *A. thaliana* transgenic lines harboring the promoters of respectively *PROT1*, *PROT2*, *PROT3* and *GAT1* fused to the marker gene *GUS* revealed four distinct patterns of expression (Fig. 3). The gene *PROT1* appeared to be expressed uniformly in the phloem cells directly adjacent to the newly formed xylem elements while transcription of *PROT2* seemed more extensive, occurring in the whole periphery of the emerging tumor as well as in the central part of the neoplastic organ where the wound had been inflicted. On the opposite, no signal could be detected for *PROT3* suggesting that this gene is not expressed in tumors. At last transcription of *GAT1* appeared to be weak, compared notably to that of *PROT1* or *PROT2*, and restricted to very precise regions of the phloem tissues.

Localization of colonizing *A. tumefaciens* populations and transcriptional characterization of their GABA genes

To determine the localization of the *A. tumefaciens* cells in the tumor compartment, we infected plants with transgenic bacteria constitutively expressing LacZ or GFP. In both cases observations of mature tumors showed that *A. tumefaciens* cells remained predominantly on the surface of the plants, forming large aggregates on the external part of the tumors or along the cavities caused by the wounding. We could also distinguish sometimes bacterial

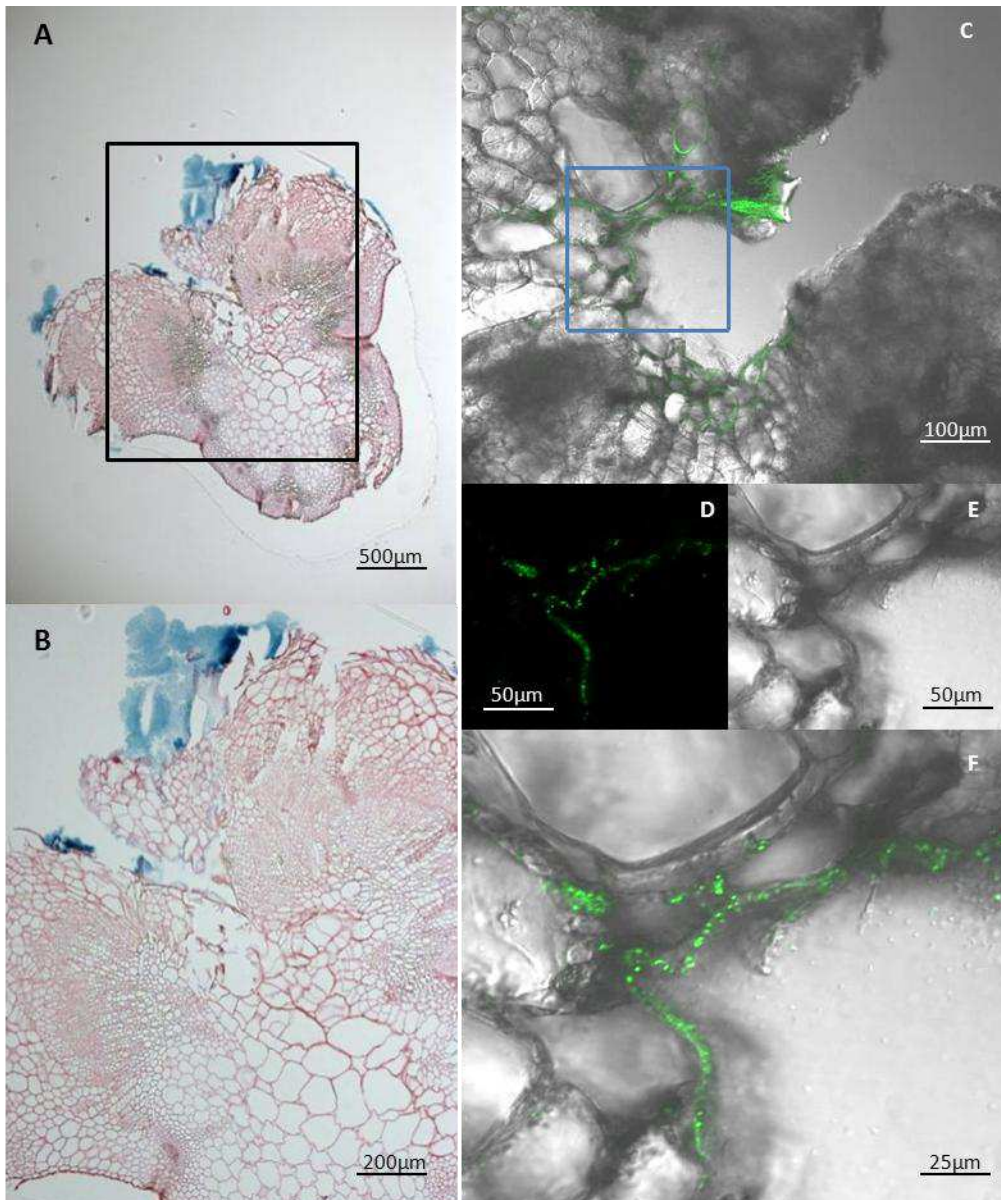


Figure 4: Localization of *A. tumefaciens* cells in plant tumors. A-B Approximately 20µm thick cross-sections of 18dpi *A. thaliana* tumors induced with an *A. tumefaciens* strain harboring the pMIR123 plasmid constitutively expressing LacZ were stained and observed with bright-field microscopy. B is a close-up of A. C-F Approximately 100µm thick cross-sections of 18dpi *A. thaliana* tumors induced with an *A. tumefaciens* strain harboring the pVO185 plasmid constitutively expressing GFP were directly observed under fluorescent confocal microscopy. D, E and F are close-up of C. Indicative scale bars are presented.

colonization occurring in the intercellular spaces of the tumors, but then only in the first layers of plant cells and never in deeper tissues (Fig. 4).

In an attempt to gain a more comprehensive understanding of the *A. tumefaciens* adaption to tumor lifestyle, we compared genome-wide transcriptional profiles of two different bacterial populations coming either from a site of infection or from a mature tumor. In the large amount of data collected, we concentrated here on the class of GABA genes including

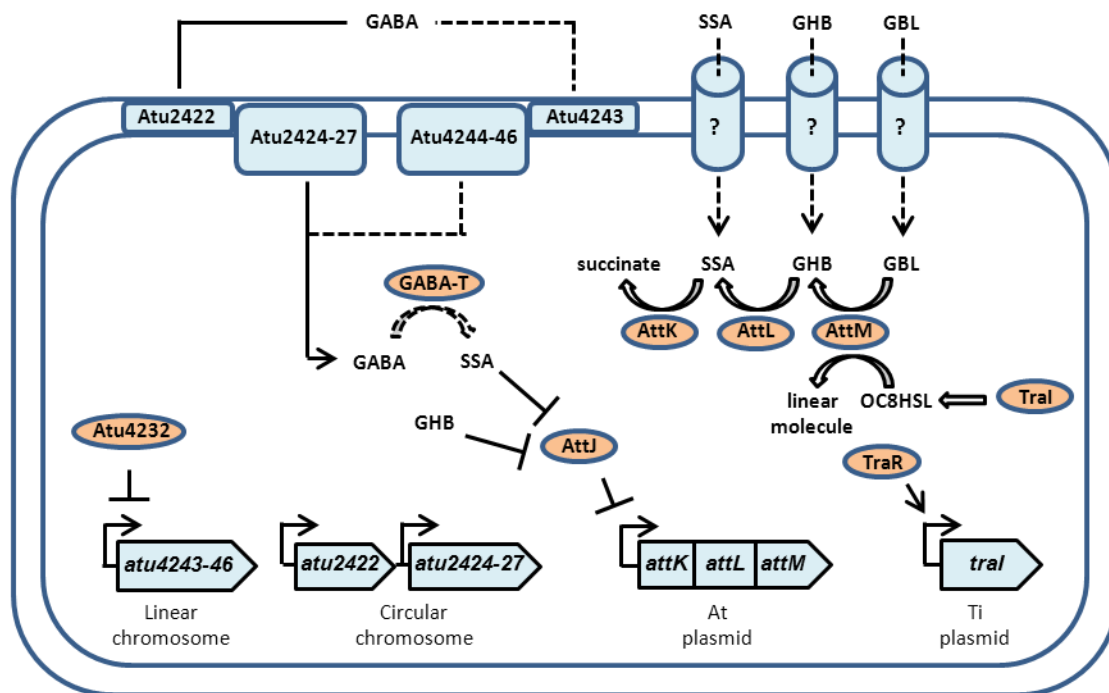


Figure 5: GABA genes in *A. tumefaciens* C58. The genes *atu2422* and *atu2423* code for unspecific and specific periplasmic GABA-sensor proteins respectively while genes *atu2424-27* and *atu2444-46* encode two ABC transport systems involved in GABA uptake. *Atu2423* completely represses expression of *atu2424-46* genes and import of GABA through the *Atu2423-46* system has been evidenced only in a mutant *A. tumefaciens* strain defective for *Atu4232*. In bacterial cells GABA is thought to be converted into Succinic SemiAldehyde (SSA) through an unidentified GABA-transaminase (GABA-T). SSA and gamma-hydroxy butyric acid (GHB) can release transcriptional repression exerted by *AttJ*, thence inducing expression of the *attKLM* operon. This one codes for a metabolic pathway converting gamma-butyrolactone (GBL) into succinate through production of GHB and SSA intermediates. Putative transporters of SSA, GHB and GBL are indicated. The *AttM* lactonase activity can also cleave the lactone rings of the QS signals 3-oxo-octanoylhomoserine lactones (OC8HSL). This QS signal is synthesized through the enzymatic activity of the QS-regulated (*TraR*/*OC8HSL*-regulated) *TraI* protein. Remarkably this scheme highlights the involvement of the 4 *A. tumefaciens* replicons in the functions encoded by GABA genes.

GABA-transporter genes and GABA-inducible *attKLM* operon (Fig. 5) (Carrier et al., 2004, Chai et al., 2007, Planamente et al., 2010, Planamente et al., 2012). The results concerning these genes are presented in Table 2. Strikingly we observed that only three genes were differentially expressed. The gene *atu2422* coding for a periplasmic GABA-binding protein associated with an ABC transport system was downregulated four times. This finding might indicate that GABA import by *A. tumefaciens* is restrained in mature tumors. In addition genes *attM* and *attK* were upregulated approximately three times, strongly suggesting that *in planta*, during tumor development, the *A. tumefaciens attKLM* operon is induced.

Gene	Function	FCh
atu2422	GABA-sensor	-4
atu2424	GABA transport	1.20
atu2425	GABA transport	-1.04
atu2426	GABA transport	1.04
atu2427	GABA transport	-1.12
atu4232	transcriptional repressor	1.29
atu4243	GABA transport	1.14
atu4244	GABA transport	1.56
atu4245	GABA transport	1.33
atu4246	GABA transport	1.02
atu5136 (<i>attI</i>)	transcriptional repressor	1.32
atu5137 (<i>attK</i>)	SSA dehydrogenase	2.26
atu5138 (<i>attL</i>)	GHB dehydrogenase	1.03
atu5139 (<i>attM</i>)	lactonase (GBL, OC8HSL)	2.53

Table 2: Gene expression fold change (FCh) for *A. tumefaciens* GABA genes in the condition tumor versus infection site.

Significant fold changes are indicated in bold

Levels of GABA produced in tumors and bacterial *attM* gene have impact on *A. tumefaciens* QS

To evaluate the influence of GABA on *A. tumefaciens* QS, we carried out *in planta* conjugation assays using two different *A. thaliana* host lines, a GABA-overaccumulating her1 line (Mirabella et al., 2008) and a WT. We infected these plants with two different *A. tumefaciens* C58 donor strains, an *attM* defective mutant (*attMpTi::Km*) and a control strain (*pTi::Km*). Prior to the assays, differences between tumors in *A. thaliana* her1 and WT lines were analyzed at the metabolomic level by GC coupled with MS. Among 147 identified compounds, only 4 exhibited unambiguously significant changes including GABA (~10 times more abundant in her1 tumors) and proline (~ half less abundant in her1 tumors). As a consequence the ratio GABA:proline which was 1:4 in WT tumors became 5:1 in her1 tumors, suggesting that GABA uptake by *A. tumefaciens* cells would be exacerbated in her1 tumors. With the exceptions mentioned above, the GABA-related metabolites like GHB, SSA, putrescine or spermidine and the amino acids like alanine or glutamate were found in comparable concentrations regardless of the genetic backgrounds in which the tumors were induced (Fig. 6A). The her1 plants also grew more slowly than WT and produced smaller tumors (Fig. 6B). However the colonizing abilities of each tested *A. tumefaciens* donor strain were identical in the two plant backgrounds although *attM* mutant cells did not grow as well as the control cells (Fig. 6C). This last observation confirmed a previous result showing that

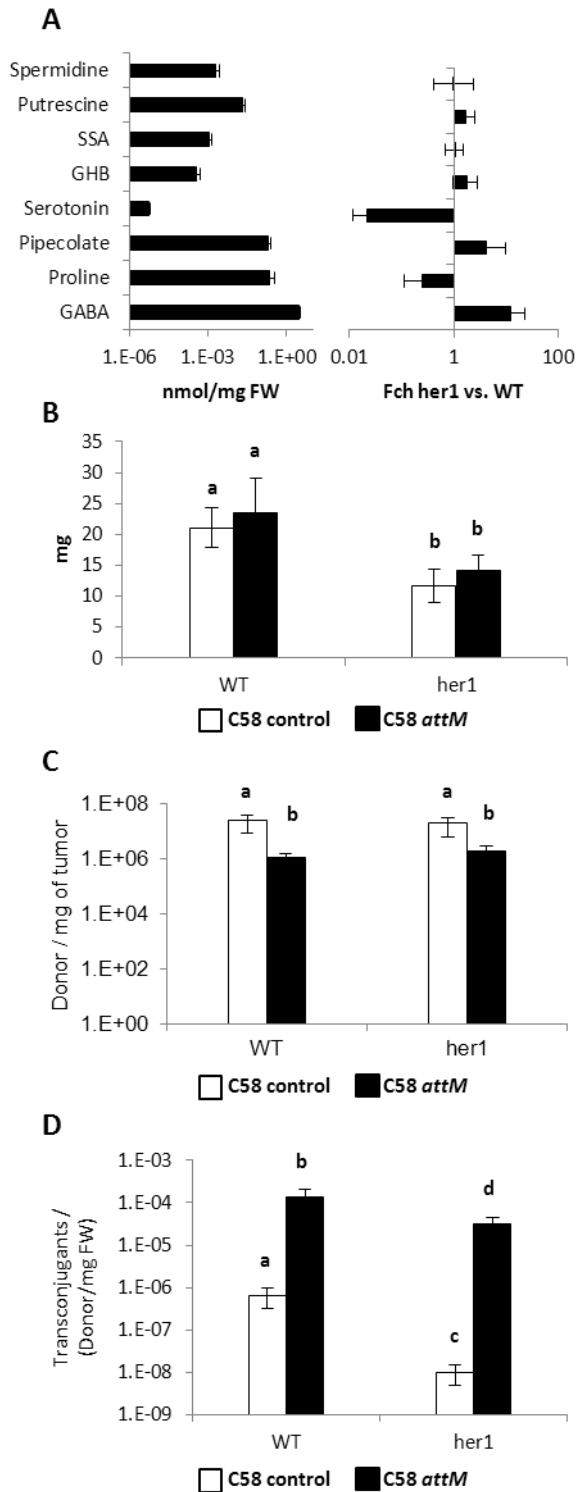


Figure 6: Characteristics of *A. thaliana* her1 line as a plant host. **A** Dosage of different metabolites in her1 tumors (left). Concentration variations of these metabolites between her1 and WT tumors (right). The tumors were induced with *A. tumefaciens* C58 strain. Fch: fold change. **B** Mass of 18dpi tumors induced with C58 control or *attM* donor strains. **C** Colonization efficiency by control and *attM* strains in 18dpi WT and her1 tumors. **D** Conjugation frequency of control and *attM* donor strains in 18dpi WT and her1 tumors. For **B-D** Mean values and SD of two independent experiments are presented. Non-parametric Kruskal-Wallis and post-hoc Tuckey tests ($6 < n < 12$; $p < 0.01$) were used and different letters indicate statistical significance.

functional *attM* conferred a selective advantage to colonizing *A. tumefaciens* cells within the tumor compartment (Haudecoeur et al., 2009b).

Remarkably, in the conjugation assays, the *A. tumefaciens* control strain yielded significantly less transconjugants in her1 than in WT, strongly suggesting that GABA produced in plant tumors could affect *A. tumefaciens* QS (Fig. 6D). When testing next the *attM* donor strain, two interesting observations were made. First the conjugation efficiency of *attM* was higher than that of the control donor strain in WT plants, demonstrating thereby that even with wild-type condition of GABA

production in *A. thaliana*, the bacterial *attM* gene could negatively control QS process. Second in her1 tumors, with ectopic accumulation of GABA, *attM* donor strains led to a conjugation efficiency drastically higher than the control donor strain albeit still lightly

inferior to what was obtained in WT tumors (Fig. 6D). This last observation confirmed that the effect of the *her1* background on *A. tumefaciens* QS in tumors was predominantly mediated by *attM*. It also indicated that this effect might be partly *attM*-independent.

Discussion

The first objective of this study was to gain a broader understanding of the GABA metabolomic pathways in plant tumors as well as in *A. tumefaciens* colonizing cells. Metabolite dosage revealed that most of the GABA and GABA-related compounds accumulated in *A. thaliana* tumors comparatively to control tissues. The foldchange for GABA, GHB and SSA, which can all induce expression of *A. tumefaciens attKLM* genes, were estimated at 8, 0.5 and 100 respectively, although, when considering the absolute concentration of these three molecules in tumors it appeared that the most abundant was GABA (~230pmol/mg of fresh weight), then SSA (~2.5pmol/mg of fresh weight) and finally GHB (~0.1pmol/mg of fresh weight). As bacterial biomass is quite inferior in tumors to plant biomass (Deeken et al., 2006) it is very likely that the differences in quantities originated predominantly from plant metabolism. Moreover since metabolite accumulation was not really correlated with an increase in transcriptional levels of plant enzymes, one could hypothesize that GABA metabolic pathways are post-transcriptionally regulated in tumors. For instance it is known that *GAD1* is calcium/calmodulin regulated (Bouche et al., 2004). Another possibility is that the metabolites are translocated from other part of the plant into the newly vascularized neoplastic organ. Consistently GABA was already found able to travel through the phloem system (Sulieman, 2011). In addition, the histological expression pattern of four characterized *A. thaliana* GABA transporter genes suggested that GABA could be efficiently transferred within stem tumors from central tissues to the peripheral region where colonizing *A. tumefaciens* cells aggregate. This proposition must nonetheless be moderated by the fact that PROT1, 2 and 3 are unspecific GABA transporter showing higher affinities towards proline or betaine (Grallath et al., 2005), and we observed in our experiments that proline concentration in tumors increased more than that of GABA (approximately 100 times versus 10 times). Despite this reservation our findings collectively

support the notion that in plant tumors GABA and GABA-derived molecules able to induce *attKLM* expression are made accessible in large amount to the colonizing *A. tumefaciens* cells.

In line with these results we did observe that *attM* gene was upregulated in *A. tumefaciens* populations coming from WT *A. thaliana* tumors comparatively to infection sites. However the mechanisms of *attM* induction in these WT tumors are not clear. Indeed, although change in expression levels does not necessarily reflect change in function activity, the downregulation of *atu2422* in our transcriptomic data could indicate that GABA uptake by agrobacteria diminished during maturation of WT *A. thaliana* tumors. The concentrations of proline and alanine which can antagonize GABA transport through *Atu2422* also increased more in WT tumors than that of GABA, further questioning the ability of *Atu2422* to mediate enhanced GABA import in the WT tumor compartment. On the other hand evidence of no modification in gene expression for the GABA transport system encoded by *atu4243-46* genes suggested that this one was not involved in GABA import in mature tumor and that no plant metabolite could induce it. Given all these elements it is plausible that *attM* upregulation in *A. tumefaciens* population coming from WT *A. thaliana* tumors is due to other molecules than GABA, like SSA. Salicylic acid, previously shown to be able to induce *attKLM* expression (Yuan et al., 2008) and the concentration of which increases in tumors (Lee et al., 2009), may also play a role in this process.

In addition to the above findings, our *in planta* conjugation assays demonstrated that *AttM* activity had a negative impact on QS in WT *A. thaliana* tumors since the *A. tumefaciens attM* mutant yielded significantly more Ti plasmid transconjugants than the control strain in this condition. Moreover repetitions of the conjugation assays in the *A. thaliana her1* background showed that ectopic accumulation of GABA in tumors (and resulting increase of GABA:proline ratios) led to a drastic decrease of Ti plasmid transfers comparatively to what happened in WT tumors, thereby confirming the key role of plant GABA concentration in the negative control of bacterial QS. Our results also indicated that this GABA effect was mostly, but not completely, dependent on *AttM* activity. Possibility of an *AttM*-independent QS control in *her1* could be accounted for by the reduced growth of the plant line which would limit the energetic supply available for the bacteria to implement conjugation. An *AttM*-

independent anti-QS role for the metabolites differentially accumulating in her1 (i.e. GABA, proline, pipecolate and serotonin) is also possible but not supported so far by any evidence. Oddly our results seem to be at variance with previous report in which the impact of AttM on *A. tumefaciens* QS was judged negligible in tomato tumors (Khan and Farrand, 2009). However in this previous report the impacts of different GABA levels and different GABA:proline ratios were not tested. It is also noteworthy that even though the authors concluded that AttM did not quench QS, they did notice an early and transient effect of *attM* mutations on QS *in planta*. As we analyzed *in planta* QS at only one time point, the observations made in the two studies might eventually not be irreconcilable. More generally we propose that the role of AttM in regulating QS is dependent on the metabolomic status of the plant host. In this regard it would be interesting in the future to determine the differences in contents of GABA, proline and GABA-related metabolites between tomato and *A. thaliana* tumors.

In conclusion this work provided original information about GABA metabolism and transport in mature plant tumors. It also confirmed the *in planta* role of GABA in negatively controlling *A. tumefaciens* QS through the AttM lactonase activity.

Material and Methods

Bacterial strain, plant lines, culture and inoculation conditions.

The *Agrobacterium tumefaciens* strains used in this work were derivatives of *A. tumefaciens* C58. The mutant pTi::Km (control strain) was obtained by inserting a Kanamycin-resistance cassette into *atu6148* gene (Haudecoeur et al., 2009b). The mutant attMpTi::Km (*attM*) was generated by inserting a Gentamycin-resistance cassette into *atu5139* gene in the pTi::Km background. Recipient strains C00 was derived from WT *A. tumefaciens* C58 cured of both At and Ti plasmids. The pVO185 plasmid harboring the *GFP* gene (Laporte et al., 2010) and the pMIR123 plasmid harboring the *lacZ* gene were introduced in *A. tumefaciens* C58 by electroporation. *A. tumefaciens* cells were cultivated at 30°C in Luria Bertani modified medium (LBm). Antibiotic concentrations were the following: Gentamycin: 25µg/ml; Kanamycin: 50µg/ml; Rifampycin: 100µg/ml.

All *Arabidopsis thaliana* plants in this work were from the Columbia ecotype. *pPROT1-3::GUS* lines were kindly provided by Doris Rentsch (Grallath et al., 2005). For *pGAT1::GUS*, a PCR amplicon of the 600bp sequence upstream of the *GAT1* start codon was generated from *A. thaliana* genomic DNA and cloned into Invitrogen Gateway® binary vector pHGWS7. Sequence identity of the PCR fragment was verified by sequencing. The vector was then introduced into EHA105 *A. tumefaciens* strain and used to transform *A. thaliana* Col-0 plants by floral dip. A homozygous *pGAT1::GUS* line was selected and analyzed. The line her1 was a kind gift of Nicolas Bouché. Plants were grown in controlled environment chamber at 22°C with an 8 hours photoperiod and 65% of hygrometry.

When first inflorescence emerged, plants were wounded at the base of the stem with a needle. Some fresh *A. tumefaciens* cells grown on agar LBm were collected with a tip and applied directly on the wound to induce tumor formation.

Plant RNA extraction and transcriptome studies

RNAs were extracted from pools of 18dpi tumors and control tissues in three independent biological replicates each, using the Qiagen RNeasy kit according to the supplier's instructions. The control tissues were wounded but not infected stem sections of *A. thaliana* plants. RNA integrity, cDNA synthesis, hybridization, array scanning and statistical analyses were carried out at the Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France) according to standard procedure (Lurin et al., 2004). For each replicate RNAs of tumor and control tissues were reverse transcribed in the presence of cy3-dCTP and cy5-dCTP respectively (NEN, Boston, U.S.A.) and comparatively hybridized on Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArrays V5 (CATMA), containing 24576 gene-specific tags. A dye swap was also performed to limit dye bias. The logarithms base 2 of the ratio of transcript abundance were processed through paired t-tests and the raw p-values were adjusted with the Bonferroni method. We considered as being differentially expressed the genes with a Bonferroni p-value ≤ 0.05 (Gagnot et al., 2008). Data from this study were deposited at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: RS11-03_Agro) according to the "Minimum Information About a Microarray Experiment" standards.

Plant metabolome studies

Pools of 14 dpi tumors and control tissues (wounded but not infected) were collected in three independent biological replicates and submitted to GC-TOF/MS analysis at the Plateforme de Chimie du Végétal (https://www7.versailles-grignon.inra.fr/green_chemistry_platform/presentation, Versailles, France). 147 metabolites were thus identified. Mean concentration values and SDs were calculated from the three replicates for each metabolite and aberrant results were discarded. To compare different experimental conditions, maximum and minimum fold change (FChmax and FChmin) values were obtained based on the previous data and only metabolites exhibiting a FChmin superior to 2 or a FChmax comprised between 0 and 0.5 were considered as differentially present.

Histological experiments and microscopy

For GUS revelation, 18dpi *A. thaliana* tumors induced by *A. tumefaciens* C58 WT or control stems (not wounded, not infected) were embedded in 6% agarose and cut using Vibratome Leica VT 1200S. Cross-sections were incubated in standard staining buffer (50mM phosphate buffer pH=7 supplemented with 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.2mM potassium ferrocyanide, 0.2mM potassium ferricyanide, 2mM X-Gluc) at 37°C, washed and observed with a microscope Nikon AZ 100. For LacZ revelation, 18dpi *A. thaliana* tumors induced by *A. tumefaciens* C58 harboring a pMIR123 plasmid were incubated in standard staining buffer (100mM phosphate buffer pH=7.3 supplemented with 2mM MgCl₂, 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide) at 37°C, fixed in 5% glutaraldehyde and embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Germany). Cross-sections were made using a microtome Leica RM 2155, dipped in 0.05% Ruthenium Red and observed with a bright field Videomicroscope Leica DMI6000B.

For the analysis of *A. tumefaciens* cells harboring the pVO185 plasmid constitutively expressing GFP, cross-sections of 18dpi *A. thaliana* tumors made with the vibratome were directly observed using a Leica SP2 confocal microscope, with an excitation at 488 nm and detection specifically at 499 to 512 nm.

Bacterial isolation, RNA extraction and transcriptome studies

To recover *A. tumefaciens* cells from mature tumors (18dpi) or from infection sites (36hpi), pools of infected stem sections were crushed in 20% Qiagen RNA protect™ Bacteria Reagent and 80% phosphate buffer (50mM). Tissues were filtered (10µm) twice and separated on a Gentodenz (Gentaur, France) gel gradient. Bacteria were stored at -80°C. RNA extraction from isolated bacteria was performed using phenol method according to Planamente et al., 2012. RNA integrity, cDNA synthesis, hybridization with NimbleGen 4-plex microarrays (Roche), array scanning and statistical analyses were carried out at the PartnerChip platform (Génopole Evry, France) as described previously (Planamente et al 2012). Only genes with a p-value < 0.05 and a fold change > 2 were considered as differentially expressed.

***In planta* conjugation assays**

Overnight cultures in LBm of recipient (C00) and donor (attMpTi::Km or pTi::Km) *A. tumefaciens* cells were mixed in a ratio 1:0.4 and plated on LBm-agar. These cultures were then used to inoculate *A. thaliana* plants (Col-0 or her1). 18dpi tumors were collected, crushed in NaCl 0.8% and suspension dilutions were spotted onto differently selective agar media (supplemented with Rifampicin or Kanamycin or Rifampicin + Kanamycin) in order to enumerate the different bacterial populations (recipient, donor, transconjugant) .

References

- Bouche, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S. G. & Fromm, H. (2003a) Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6843-8.
- Bouche, N., Fait, A., Zik, M. & Fromm, H. (2004) The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 55, 315-25.
- Bouche, N. & Fromm, H. (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci*, 9, 110-5.
- Bouche, N., Lacombe, B. & Fromm, H. (2003b) GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol*, 13, 607-10.
- Carrier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y. & Faure, D. (2004) The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 951-7.
- Chai, Y., Tsai, C. S., Cho, H. & Winans, S. C. (2007) Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL, and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 189, 3674-9.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E. & Faure, D. (2006) GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7460-4.
- Conti, F., Minelli, A. & Melone, M. (2004) GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev*, 45, 196-212.
- Dagorn, A., Hillion, M., Chapalain, A., Lesouhaitier, O., Duclairoir Poc, C., Vieillard, J., Chevalier, S., Taupin, L., Le Derf, F. & Feuilloley, M. G. (2013) Gamma-aminobutyric acid acts as a specific virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 159, 339-51.
- Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Muller, T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T. & Hedrich, R. (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell*, 18, 3617-34.
- Feehily, C. & Karatzas, K. A. (2013) Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J Appl Microbiol*, 114, 11-24.

- Gagnot, S., Tamby, J. P., Martin-Magniette, M. L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J. P., Lecharny, A. & Brunaud, V. (2008) CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res*, 36, 16.
- Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gumy, C., Suter-Grotemeyer, M., Neuhaus, J. M. & Rentsch, D. (2005) The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiol*, 137, 117-26.
- Haudecoeur, E. & Faure, D. (2010) A fine control of quorum-sensing communication in *Agrobacterium tumefaciens*. *Commun Integr Biol*, 3, 84-8.
- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B. J., Morera, S. & Faure, D. (2009a) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14587-92.
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009b) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.
- Khan, S. R. & Farrand, S. K. (2009) The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol*, 191, 1320-9.
- Laporte, P., Satiat-Jeunemaître, B., Velasco, I., Csorba, T., Van De Velde, W., Campalans, A., Burgyan, J., Arevalo-Rodriguez, M. & Crespi, M. (2010) A novel RNA-binding peptide regulates the establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* nitrogen-fixing symbiosis. *The Plant Journal*, 62, 24-38.
- Lee, C. W., Efetova, M., Engelmann, J. C., Kramell, R., Wasternack, C., Ludwig-Muller, J., Hedrich, R. & Deeken, R. (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21, 2948-62.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M. L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J. P., Szurek, B., Taconnat, L. & Small, I. (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 16, 2089-103.
- Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S. & Rentsch, D. (2006) AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 281, 7197-204.
- Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., Nunes-Nesi, A., Grillich, N., Yellin, A., Bar, D., Khan, M., Fernie, A. R., Turano, F. J. & Fromm, H. (2011) A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *Plant J*, 67, 485-98.

- Mirabella, R., Rauwerda, H., Struys, E. A., Jakobs, C., Triantaphylides, C., Haring, M. A. & Schuurink, R. C. (2008) The Arabidopsis her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. *Plant J*, 53, 197-213.
- Miyashita, Y. & Good, A. G. (2008) Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 49, 92-102.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F. & Preuss, D. (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell*, 114, 47-59.
- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., Collmer, A. & Schuurink, R. C. (2010) Mutations in gamma-aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or Pseudomonas syringae reduce bacterial virulence. *Plant J*, 64, 318-30.
- Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Morera, S. & Faure, D. (2012) Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 86, 1085-99.
- Planamente, S., Vigouroux, A., Mondy, S., Nicaise, M., Faure, D. & Morera, S. (2010) A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by structure-function analysis of the periplasmic binding protein Atu2422 in Agrobacterium tumefaciens. *J Biol Chem*, 285, 30294-303.
- Renault, H. (2013) Fiat lux!: Phylogeny and Bioinformatics shed light on GABA functions in plants. *Plant Signal Behav*, 8.
- Renault, H., El Amrani, A., Palanivelu, R., Updegraff, E. P., Yu, A., Renou, J. P., Preuss, D., Bouchereau, A. & Deleu, C. (2011) GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 52, 894-908.
- Shelp, B. J., Bown, A. W. & Faure, D. (2006) Extracellular gamma-aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms. *Plant Physiol*, 142, 1350-2.
- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Trobacher, C. P., Zarei, A., Deyman, K. L. & Brikis, C. J. (2012) Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci*, 194, 130-5.
- Suliman, S. (2011) Does GABA increase the efficiency of symbiotic N₂ fixation in legumes? *Plant Signal Behav*, 6, 32-6.
- Toyokura, K., Hayashi, M., Nishimura, M. & Okada, K. (2012) Adaxial-abaxial patterning: a novel function of the GABA shunt. *Plant Signal Behav*, 7, 705-7.

- Wang, C., Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2006) Succinic semialdehyde couples stress response to quorum-sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, 62, 45-56.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. & Hayasaki, H. (2002) GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*, 213, 1-47.
- White, C. E. & Finan, T. M. (2009) Quorum quenching in *Agrobacterium tumefaciens*: chance or necessity? *J Bacteriol*, 191, 1123-5.
- White, C. E. & Winans, S. C. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362, 1135-48.
- Yuan, Z. C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K. F. & Nester, E. W. (2008) Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*--plant co-evolution. *Cell Microbiol*, 10, 2339-54.
- Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4638-43.

Chapitre V. Discussion générale et futures recherches

S'il est connu depuis une quarantaine d'années maintenant que les opines sont importantes pour les interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte, l'ensemble des travaux présentés ici a permis d'affiner encore davantage notre compréhension des mécanismes dans lesquels ces petites molécules organiques étaient impliquées. Combinant différentes approches expérimentales, nous avons décrit l'intrication des signalisations opines avec les signalisations QS et GABA. Nous avons en particulier souligné le rôle des opines non seulement comme sources nutritives spécifiques pour le phytopathogène *A. tumefaciens* mais également comme régulateurs clefs des transferts horizontaux des plasmides Ti et At de la bactérie.

Nous basant sur des comparaisons transcriptomiques nous avons caractérisé en détail le régulon AccR d'*A. tumefaciens* C58, contrôlé par les agrocinopines. Ce régulon inclut ainsi des fonctions associées (i) à l'assimilation des agrocinopines, (ii) à l'assimilation de la nopaline, (iii) au système QS et à la conjugaison du plasmide Ti, (iv) à la conjugaison du plasmide At.

A la suite d'analyses fonctionnelles, structurales et phylogénétiques, nous avons (i) démontré que les assimilations de nopaline et d'octopine pouvaient conférer un avantage sélectif à *A. tumefaciens* au sein des tumeurs végétales et (ii) dégagé les bases moléculaires sous-jacentes à cet avantage sélectif, notamment en ce qui concerne la machinerie d'importation des opines dans le cytoplasme bactérien.

Enfin, mettant en parallèle des résultats métabolomiques et d'expression génique avec des tests de conjugaison *in planta*, nous avons établi que le transfert conjugatif du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* C58, régulé par les agrocinopines et le QS, pouvait également être modulé (i) par la lactonase bactérienne AttM et (ii) par les niveaux de GABA produit au sein des tumeurs végétales.

Nous allons maintenant proposer une discussion globale de ces différents résultats en les synthétisant sous trois thématiques distinctes : (i) la signalisation opine dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes, (ii) les signalisations GABA et QS dans les interactions *A.*

tumefaciens-plantes hôtes, (iii) rôles du plasmide Ti et du plasmide At dans l'adaptation d'*A. tumefaciens* à l'environnement tumoral.

Pour finir nous présenterons un travail préliminaire visant à une description originale et élargie des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte, au-delà des seuls aspects impliquant les opines.

1. Intrication des signalisations opine, QS et GABA dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

1.1. La signalisation opine dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

Selon le concept éponyme, les opines produites dans les cellules tumorales de la plante, par détournement du métabolisme végétal à la suite de la transformation par l'ADN-T, confèrent un avantage sélectif aux populations infectieuses d'*A. tumefaciens* capables de les assimiler. Cela étant ce modèle met en jeu des mécanismes moléculaires complexes et peut en conséquence être modulé par différents facteurs. Nous allons discuter plus précisément trois de ces facteurs au regard des résultats que nous avons obtenus : i) la création des niches d'opines au sein des tumeurs, ii) la capacité d'*A. tumefaciens* à reconnaître et importer ces opines, iii) les fonctions remplies par ces opines dans la cellule bactérienne. La figure 1 illustre ces différentes étapes en ce qui concerne la souche C58 d'*A. tumefaciens*.

1.1.1. Création des niches d'opines au sein des tumeurs

L'accumulation des opines dans les cellules de la tumeur végétale dépend essentiellement du taux de transcription/traduction des gènes de synthèse d'opines ainsi que de la disponibilité des différents substrats impliqués dans ces synthèses. Les promoteurs des gènes de synthèse d'opines sont très communément utilisés en transgénèse végétale car ils sont considérés comme constitutivement actifs dans les cellules de plantes (Roa-Rodriguez, 2003). Il est ainsi fort vraisemblable qu'il n'existe pas au sein des tumeurs de différences dans les taux d'expression des gènes de synthèse d'opines. Au niveau des

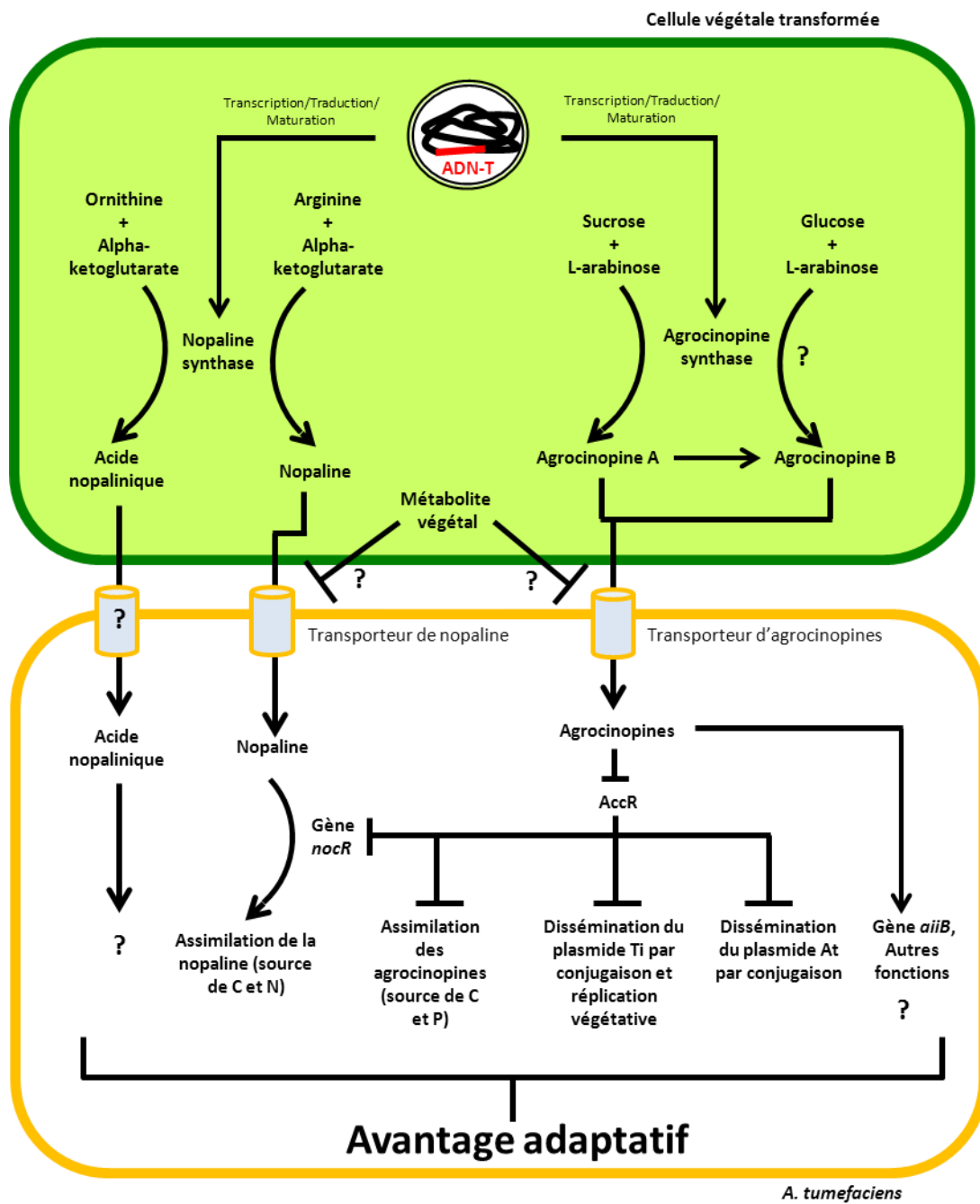


Figure 1: Création et utilisation des niches d'opines chez *A. tumefaciens* C58. La figure retrace les différentes étapes menant de la synthèse des opines au sein des cellules végétales transformées par *A. tumefaciens* C58 jusqu'aux avantages adaptatifs que ces opines confèrent aux bactéries colonisatrices de la tumeur. Pour plus de détails, se reporter au corps du texte. Les points d'interrogations signalent les réactions, mécanismes de transport et fonctions qui n'ont pas été démontrés expérimentalement.

régulations post-transcriptionnelle et post-traductionnelle, peu d'information est disponible

concernant les gènes de synthèse d'opines. Si l'activité d'ARN interférent ciblant l'ensemble des gènes de l'ADN-T a bien été mise en évidence (Dunoyer et al., 2006), nous ne savons pas si des gènes de synthèse d'opines peuvent être différentiellement régulés par des mécanismes post-transcriptionnels ou post-traductionnelles. Enfin concernant la disponibilité des différents substrats d'opines, il semblerait, d'après différentes données métabolomiques (Deeken et al., 2006, nos données), que ceux-ci soient tous en excès dans les tumeurs. Aussi la nature des opines produites dépendrait avant tout de l'affinité plus ou moins grande des enzymes de synthèse pour leurs différents substrats.

Si l'on se réfère aux dosages en nopaline et octopine que nous avons réalisés à trois temps distincts après infection (Article 3, Fig. 2 ; Addendum, Fig. 3), nous aurions tendance à avancer que le taux de synthèse des opines dans les tumeurs végétales est supérieur à son taux de dégradation et que par conséquent les opines s'accumulent de manière linéaire dans les tissus de la plante au cours du développement tumoral. Cela étant il ne s'agissait dans ces expériences du dosage que d'une seule opine pour chaque souche C58 et B6 qui sont capables par ailleurs d'en produire plusieurs autres. Nous n'avons notamment pas dosé les agrocinopines produites par C58. Compte tenu des différences de formule et de fonction entre la nopaline et les agrocinopines cette information serait particulièrement intéressante. Elle le serait d'autant plus que nos résultats ont montré qu'une dépression d'AccR, normalement accomplie par les agrocinopines, conduisait à une potentialisation de l'assimilation de nopaline (Article 2, Fig. 3). Il est ainsi probable que les cinétiques d'accumulation dans les tumeurs végétales des différentes opines produites par une même souche d'*A. tumefaciens* soient non similaires bien qu'interdépendantes.

1.1.2. Capacité d'*A. tumefaciens* à importer les opines

Le transport des opines au sein du cytoplasme bactérien est assuré par des protéines périplasmiques de liaison spécifiques. Dans ce travail, nous avons mis en évidence certaines propriétés biochimiques des PBPs NocT et OccJ impliquées dans la reconnaissance de la nopaline et de l'octopine respectivement. OccJ présente par exemple une grande affinité pour l'octopine (Kd de l'ordre du nM) (Addendum). Ce résultat suggère que l'octopine pourrait être assimilée très efficacement par *A. tumefaciens* B6, ce que nos dosages en

opines de tumeurs végétales semblent confirmer (Addendum, Fig. 3). Cela étant OccJ est capable d'engager une liaison relativement stable avec l'arginine (Kd de l'ordre du μM) (Addendum). Il pourrait ainsi être intéressant de tester dans quelle mesure cet acide aminé qui s'accumule dans les tumeurs végétales est susceptible d'inhiber l'importation d'octopine par les bactéries B6. L'analyse des structures de NocT et OccJ a également permis d'avancer une liste de résidus clefs pour les liaisons à la nopaline et à l'octopine. La validité de ces signatures est en cours de confirmation avec la génération et l'étude de plusieurs mutants ponctuels de NocT et OccJ. Ce travail devrait permettre de mieux cerner les différences évolutives entre des PBPs spécifiques à l'arginine, la nopaline ou l'octopine. Comme prolongement, l'analyse de PBPs se liant à d'autres opines que la nopaline et l'octopine pourrait également apporter un éclairage instructif. Par exemple la PBP AccA reconnaît et facilite le transport des agrocinopines qui sont, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, des opines structurellement et fonctionnellement distinctes de la nopaline. De plus AccA est impliquée dans l'importation de l'agrocine K84 qui est un composé toxique pour *A. tumefaciens* (Kim and Farrand, 1997). Les caractéristiques moléculaires d'AccA permettraient ainsi de mieux comprendre comment la niche agrocinopines est utilisée par le phytopathogène mais aussi comment l'agent antibactérien agrocine K84 agit.

Notre approche phylogénétique a enfin montré que les systèmes de transport de la nopaline et l'octopine contrôlés par NocT et OccJ respectivement étaient hautement spécifiques à *A. tumefaciens* (Article 3, Fig. 6 ; Addendum Fig. 7). Néanmoins certaines bactéries sont apparemment capables d'assimiler la nopaline et l'octopine sans posséder de système d'importation homologue à celui d'*A. tumefaciens* (Bergeron et al., 1990, Nautiyal and Dion, 1990, Oger et al., 2004). L'identification et la caractérisation de ces systèmes alternatifs seraient fort intéressantes afin de mieux comprendre les avantages spécifiques qui peuvent être obtenus par *A. tumefaciens* des différentes niches d'opines produites dans les tumeurs végétales.

1.1.3. Fonctions des opines dans la cellule bactérienne

Nos analyses transcriptionnelles d'*A. tumefaciens* en présence de nopaline et d'agrocinopines (mutant *accR*) ont parfaitement illustré les différences de fonction qui

pouvaient exister entre deux niches d'opines. La nopaline est ainsi utilisée uniquement comme une source énergétique (carbone et azote) par *A. tumefaciens*, via l'induction des gènes *noc* (Article 3, Table 1) alors que les agrocinopines, en plus d'être une source de carbone et de phosphore, jouent un rôle de signalisation important avec l'initiation des processus de conjugaisons plasmidiques (Article 2, Fig. 5). Il s'avère donc que la nature des avantages adaptatifs fournis par les niches d'opines au sein des tumeurs végétales est diverse et inclut une gamme importante de processus biologiques.

1.2. Les signalisations GABA et QS dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

1.2.1. Fonctions du QS

Le système QS d'*A. tumefaciens* a été l'objet de nombreuses études au cours des années passées. Il est ainsi admis que les fonctions régulées par le QS chez ce phytopathogène sont associées au transfert conjugatif du plasmide Ti, via l'expression des opérons *tra*, à la réplication végétative du même plasmide Ti, via l'expression de l'opéron *repABC*, et enfin à l'auto régulation du système QS via les expressions de *traI* et *traM* (Cho and Winans, 2007). Globalement l'approche transcriptomique que nous avons développée confirme cette vue, avec toutefois deux nuances notables : les expressions des gènes *repABC* et *traM* ne sont pas induites dans notre mutant *accR* (Article 2, Table S1). Ce résultat laisserait entendre que la régulation de ces gènes n'est pas seulement dépendant du QS mais impliquerait d'autres facteurs. La manière dont l'induction de *repABC* par le QS pouvait être contrebalancée par un phénomène d'auto-répression a déjà été discutée dans l'introduction (Article 1). Quant à TraM, son rôle d'anti-activateur impose que son expression soit finement régulée, sans quoi le système QS risquerait d'être inopérant. Il n'est donc pas nécessairement surprenant de n'observer aucune induction de *traM*, spécialement dans nos conditions expérimentales avec un mutant *accR* qui mime une activité QS à plein régime durant laquelle la fonction de TraM est dispensable. Notons également que d'après nos résultats les gènes *atu6096* et *atu6097* sont très certainement régulés par le QS ; toutefois les fonctions encodées par ces gènes demeurent inconnues (Article 2, Tables S1 et S2).

D'un point de vue général les fonctions régulées par le QS chez *A. tumefaciens* sont originales comparativement à d'autres phytopathogènes. Chez ces derniers le QS contrôle la plupart du temps des fonctions de virulence cruciales pour la mise en place de la pathologie. Par exemple, chez *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (pathogène vasculaire qui cause la brûlure des feuilles de maïs), *Ralstonia solanacearum* (pathogène vasculaire qui peut causer le dépérissement de plusieurs centaines d'espèces végétales) et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (pathogène vasculaire qui cause la pourriture noire chez différentes plantes crucifères), le QS régule la production d'exopolysaccharides qui sont des molécules nécessaires au pouvoir infectieux de ces bactéries (Von Bodman et al., 2003). Chez *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, le QS contrôle l'expression de toute une batterie de facteurs de virulence extracellulaires qui sont responsables des symptômes de pourriture môle que ces bactéries peuvent causer chez les plantes (Von Bodman et al., 2003, Crepin et al., 2012). Etant donné ces éléments, le QS est souvent considéré comme crucial chez les phytopathogènes en ce sens qu'il n'autoriserait les processus infectieux qu'au moment critique où la concentration en pathogènes est élevée et où par conséquent les chances d'une invasion réussie sont grandes. A l'opposé chez *A. tumefaciens* le système QS semble contribuer moins à l'activation qu'à la régénération du pouvoir de virulence de la bactérie en assurant la dissémination du plasmide Ti dans des populations qui en sont dépourvues.

1.2.2. Régulation du QS par le GABA

En ce qui concerne la régulation du QS d'*A. tumefaciens*, là aussi de nombreuses études ont permis d'acquérir une compréhension étendue des mécanismes mis en jeu. Le rôle des opines conjugatives est ainsi largement documenté (Piper et al., 1999). Les existences d'antiactivateurs (par exemple TrIR) (Chai et al., 2001) et de lactonases (AiiB et AttM) (Haudecoeur et al., 2009) ont également été reportées bien que leurs impacts réels dans des conditions d'interactions *in vivo* soient mal cernés. Nos travaux portant sur le rôle d'AttM dans des populations d'*A. tumefaciens* colonisant des tumeurs végétales nous permettent maintenant de proposer un modèle plus précis de la régulation par cette lactonase du QS d'*A. tumefaciens* C58 (Fig. 2).

Dans ce modèle, les niveaux, dans les tumeurs végétales, de GHB, SSA, GABA (tous trois inducteurs de l'expression d'*attM*) et de proline (antagoniste de l'import du GABA dans les cellules d'*A. tumefaciens*) déterminent le niveau d'expression de la lactonase AttM et partant son impact sur le QS bactérien. Dans des tumeurs sauvages d'*A. thaliana*, nous avons ainsi démontré que l'impact d'AttM sur le QS d'*A. tumefaciens* était significatif (Article 4, Fig. 6). En effet non seulement l'expression d'*attM* est induite dans les populations d'*A. tumefaciens* colonisant ces tumeurs, mais encore des infections faites avec un mutant *attM* entraînent une augmentation significative de l'efficacité de conjugaison du plasmide Ti. Il faut néanmoins noter que dans ce cas, l'induction d'*attM* est sûrement davantage la conséquence de l'augmentation de la concentration en SSA qu'en GABA. En effet dans les tumeurs sauvages d'*A. thaliana* le ratio GABA:proline est environ 10 fois plus faible que dans les tissus contrôles (Article 4, Fig. 2), ce qui suggère que l'importation de GABA dans le cytoplasme bactérien est, dans la condition tumorale, fortement inhibée. De plus dans les

populations d'*A. tumefaciens* colonisant ces tumeurs sauvages d'*A. thaliana* les niveaux d'expression d'*atu2422* qui code pour la PBP du GABA

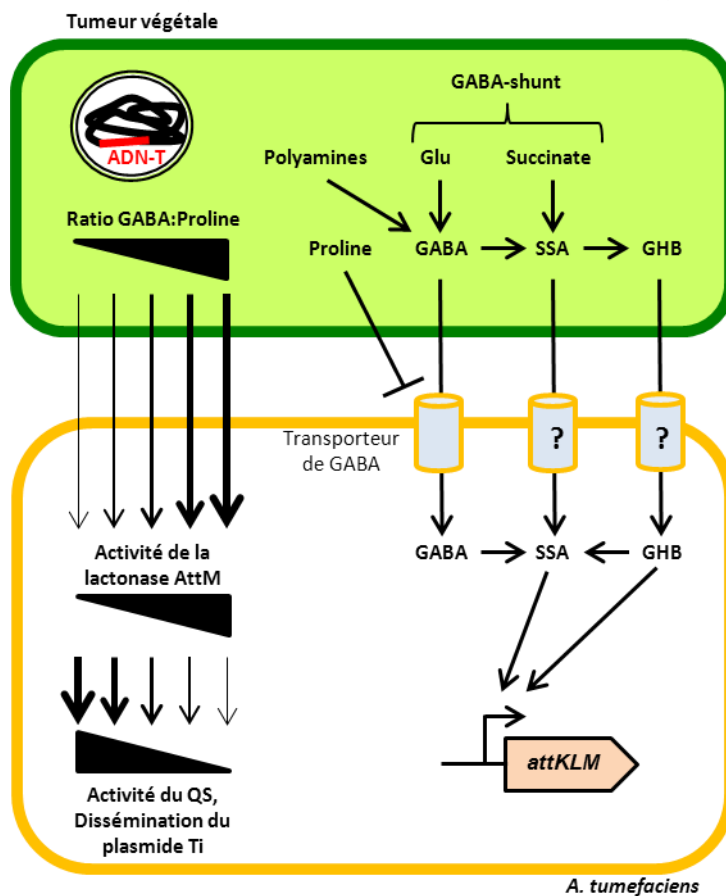


Figure 2: Modèle de la régulation du QS d'*A. tumefaciens* C58 par la lactonase AttM. Cette figure illustre la manière dont le GABA, la proline, le GHB et le SSA qui s'accumulent de façon hôte-spécifique dans les tumeurs végétales affectent l'activité de la lactonase AttM et partant le système QS de la bactérie pathogène. Pour plus de détails, se reporter au corps du texte. Les points d'interrogations indiquent que les systèmes de transport du GHB et du SSA au sein du cytoplasme bactérien ne sont pas caractérisés. Glu: Glutamate.

diminuent (Article 4, Table 2), ce qui pourrait indiquer que l'activité d'importation du GABA est également moindre dans cette condition. Comme il a été montré récemment que l'expression d'*atu2422* pouvait être contrôlée par le petit ARN non-codant AbcR1 (Wilms et al., 2011), il serait intéressant de vérifier dans le futur si la diminution d'expression que nous observons pour *atu2422* au sein des tumeurs est bien due à AbcR1.

Nos expériences avec la lignée mutante d'*A. thaliana* *her1* ont par ailleurs établi que des variations des niveaux de GABA et/ou de proline causant une variation du ratio GABA:proline au sein des tumeurs de plantes avaient un effet significatif sur l'activité QS d'*A. tumefaciens* et que cet impact était très majoritairement lié à l'activité d'AttM (Article 4, Fig. 6). Il apparaît de la sorte que le rôle de la lactonase AttM d'*A. tumefaciens* dans la régulation du système QS dépendrait dans une certaine mesure du statut métabolique de la plante hôte et des niveaux relatifs de GABA et de proline que celle-ci accumule dans ses tumeurs. Il y aurait ainsi des plantes hôtes plus favorables que d'autres à la dissémination des plasmides Ti. A ce titre une comparaison des métabolomes de différentes plantes hôtes d'*A. tumefaciens* pourrait être très instructive.

Pour finir cette discussion, précisons que le modèle que nous présentons ne comporte aucune information sur les mécanismes de transport du GHB et du SSA au sein des cellules bactériennes. Il se pourrait donc tout à fait que les actions de ces deux composés sur l'expression d'*attM* soient elles aussi modulées, d'une manière similaire à celle du GABA, par leur dynamique d'importation.

1.3. Rôle des plasmides At et Ti dans l'adaptation d'*A. tumefaciens* à l'environnement tumoral

Le résultat sans doute le plus marquant que nous avons obtenu lors de nos recherches réside en la co-régulation par AccR des transferts conjugatifs du plasmide Ti et du plasmide At d'*A. tumefaciens* C58 (Article 2, Fig. 4). Ce résultat dont la conséquence la plus immédiate est la promotion du co-transfert des deux plasmides dans l'environnement tumoral soulève d'intéressantes questions concernant i) les fonctions plasmidiques impliquées dans les interactions entre le phytopathogène et sa plante hôte, ii) les différences subsistantes dans la régulation des conjuguaisons des plasmides At et Ti, iii) la compréhension globale que nous

pouvons avoir du comportement des plasmides et de la manière dont certaines niches écologiques sélectionnent ces éléments génétiques originaux.

1.3.1. Fonctions encodées par les plasmides Ti et At

Les plasmides Ti d'*A. tumefaciens* sont de petits plasmides d'environ 0,2 Mb de nature mosaïque. Ils peuvent en conséquence présenter entre eux de fortes variations d'homologie sur certaines séquences. Pour autant les fonctions conservées des plasmides Ti d'*A. tumefaciens* sont relativement bien connues et peuvent se classer en quatre blocs complémentaires. Il y a d'abord l'ADN-T qui permet la transformation des cellules végétales. Il y a ensuite les gènes de virulence qui sont responsables de la mobilisation et du transfert de l'ADN-T. Le troisième bloc fonctionnel est constitué du système QS et de la machinerie de conjugaison/réplication végétative du plasmide. Enfin nous avons les régions du catabolisme des opines. Au final l'articulation de ces quatre blocs fonctionnels au cours des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte conduit à deux effets interdépendants: (i) un avantage sélectif conféré au phytopathogène du à l'assimilation d'opines, (ii) la dissémination du fond génétique constitué par le plasmide Ti.

Les plasmides At d'*A. tumefaciens* sont environ deux fois plus grands (environ 0,5Mb) et contiennent environ deux fois plus de gènes (environ 550 contre environ 200) que les plasmides Ti. Comme les plasmides Ti, les plasmides At présentent des topologies fortement mosaïquées. Une comparaison entre deux souches différentes d'*A. tumefaciens* a par exemple montré qu'il pouvait exister d'importantes différences entre deux plasmides At (Wibberg et al., 2011). A l'opposé il existe de nombreuses similarités de séquences entre le plasmide At d'*A. tumefaciens* C58 et certains mégaplasmides de la famille des *Rhizobiaceae*, notamment le pSymA de *S. meliloti* (Goodner et al., 2001, Wood et al., 2001). D'après les données de séquençage de la souche C58 d'*A. tumefaciens*, le plasmide At apparaît également enrichi en séquences d'insertion et contient une région de 24 kb particulièrement riche en nucléotides AT qui suggèrerait une acquisition récente (Goodner et al., 2001, Wood et al., 2001). Enfin, tout récemment, une large délétion de plus de 100kb du plasmide At a été mise en évidence dans une souche C58 de laboratoire et cette délétion a été associée avec un gain de fitness dans des conditions de cultures cellulaires (Morton et al., 2013). Du

point de vue fonctionnel, le plasmide At d'*A. tumefaciens* C58 code pour de nombreux transporteurs de type ABC (Goodner et al., 2001, Wood et al., 2001). Bien que la nature des substrats associés à ces transporteurs soit encore mal définie, il est probable que ces systèmes permettent l'importation dans les bactéries de sources énergétiques variées, certaines étant possiblement spécifiques aux tumeurs végétales. Plusieurs voies métaboliques encodées par le plasmide At ont également été caractérisées. Outre l'opéron *attKLM* qui permet un gain de fitness pour les bactéries au sein des tumeurs (Haudecoeur et al., 2009), le plasmide At abrite des gènes impliqués dans l'assimilation de composés issus de la famille des Amadori qui sont non seulement très abondants dans le sol et la rhizosphère mais également présents dans les tumeurs végétales (Baek et al., 2005).

Bien qu'elles nécessitent encore d'être précisées, les données ci-dessus soutiennent collectivement la notion selon laquelle le plasmide At joue un rôle important pour l'adaptation d'*A. tumefaciens* C58 à l'environnement tumoral. En complément de ces informations il est également possible que le plasmide At contribue au pouvoir pathogénique de la bactérie, via différents gènes de la région *att* (Matthysse et al., 2008) ou par l'action de certains facteurs de virulence de type autotransportés (Goodner et al., 2001). La présence d'un système toxine-antitoxine codé par le plasmide At (Morton et al., 2013) pourrait également expliquer l'importance de maintenir un pool suffisamment important de plasmides At au sein d'une population d'*A. tumefaciens* C58, et notamment une population colonisatrice de tumeurs végétales.

1.3.2. Différences dans la signalisation de conjugaison des plasmides Ti et At

De manière intéressante les voies de signalisation menant aux conjugaisons des plasmides Ti et At, bien que toutes deux contrôlées en amont par AccR, sont différentes. La conjugaison (et la répllication végétative) du plasmide Ti est placée sous la dépendance stricte du système QS. Ainsi en l'absence d'agrocinopines et de dérégulation d'AccR, la conjugaison du plasmide Ti est impossible. A l'opposé la conjugaison du plasmide At est constitutive ; l'inhibition de la fonction d'AccR n'est pas requise pour la conjugaison du plasmide At mais entraîne une augmentation de sa fréquence (Article 2, Fig. 4). D'après nos données (Article 2) la régulation de la conjugaison du plasmide At impliquerait sûrement le

facteur de transcription RctB, selon un mécanisme similaire à ce qui a été décrit pour le plasmide symbiotique de certaines *Rhizobium* spp. (Nogales et al., 2013). Afin de vérifier cette hypothèse, il serait bon de savoir dans le futur si AccR contrôle directement l'expression de *rctB* et en ce sens une analyse du promoteur de *rctB* serait nécessaire.

La conséquence principale des différences de régulation décrites ci-dessus réside en une fréquence de conjugaison du plasmide At généralement plus grande que celle du plasmide Ti (Article 2, Fig. 4). Comme discuté dans ce travail, le contrôle strict de la conjugaison du plasmide Ti par AccR et QS pourrait permettre de limiter les coûts énergétiques liés à la maintenance du réplicon dans une population bactérienne en ne les autorisant que lorsque les conditions sont optimales (Article 1). En ce qui concerne le plasmide At, la présence d'un système toxine-antitoxine encodé par ce dernier (Morton et al., 2013) pourrait exercer une pression de sélection importante sur les mécanismes de conjugaison et pourrait de la sorte expliquer l'adoption d'une régulation moins rigoureuse que celle du plasmide Ti. Il est également probable que certaines fonctions encodées par le plasmide At puissent conférer un avantage à *A. tumefaciens* dans des contextes différents de celui de la tumeur végétale, d'où un système de transfert plus souple.

1.3.3. Relations entre plasmide Ti, plasmide At, hôte bactérien et hôte végétal

Jusqu'à présent nous n'avons considéré les plasmides Ti et At que dans la mesure où ils étaient susceptibles de conférer un avantage adaptatif aux cellules d'*A. tumefaciens* qui les abritent. Ce faisant nous avons repris à notre compte une comparaison commune parmi les microbiologistes, selon laquelle *grosso modo* les génomes bactériens constitueraient les disques durs des machines cellulaires tandis que les plasmides constitueraient des applications subordonnées et activables uniquement aux moments utiles. Cela étant une autre conception, tout aussi commune chez les microbiologistes, se réfère aux plasmides comme à des éléments génétiques à part entière, de nature « égoïstes », comparables par certains côtés à des virus, et qui se servent des bactéries hôtes pour assurer leur perpétuation (Kado, 1998). En ce sens les plasmides Ti et At détourneraient la nature commensale des *A. tumefaciens* à leur avantage en la transformant en phytopathogène, afin de disséminer leurs fonds génétiques dans les meilleures conditions. Nous pouvons d'ailleurs

noter que les circonstances dans lesquelles les avantages adaptatifs conférés par les deux plasmides aux cellules d'agrobactéries sont les plus importants coïncident avec les conditions où la dissémination de ces mêmes plasmides est la plus élevée (Fig. 3). Sous cet angle, l'association entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte s'avère en fait un réseau quadripartite incluant le plasmide Ti, le plasmide At, la cellule hôte *A. tumefaciens* qui héberge ces plasmides et enfin la cellule végétale hôte du pathogène bactérien. Différentes caractéristiques de ce réseau quadripartite seront maintenant discutées.

Il est généralement admis que deux plasmides partageant un même système de réplication sont incompatibles entre eux et ne peuvent pas se maintenir dans une même cellule bactérienne (Bouet et al., 2007). Curieusement les plasmides Ti et At (ainsi que le chromosome circulaire) d'*A. tumefaciens* possèdent des systèmes de réplication de type repABC similaires (Pinto et al., 2012) mais sont malgré cela capables de co-exister dans les cellules d'*A. tumefaciens*. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent et autorisent une telle coexistence sont encore mal définis. Signalons également, pour être tout à fait précis, que dans nos expériences de conjugaison, nous ne nous sommes pas intéressés à la maintenance des plasmides transconjugants et co-transconjugants que nous avons pu détecter.

Par ailleurs nous savons que dans des conditions de QS le nombre de copies par cellule du plasmide Ti augmente. Notre analyse des couvertures de séquençage du mutant *accR* indiquent, par exemple, 3 exemplaires de plasmide Ti par cellule (Article 2, Fig. 1), ce qui est en accord avec des résultats précédents qui estimaient le nombre de plasmides Ti par cellule d'*A. tumefaciens* en situation de QS entre 6 et 8 (Li and Farrand, 2000, Pappas and Winans, 2003). En revanche nous ne savons pas s'il est possible pour le plasmide At de se répliquer comme le plasmide Ti de manière végétative au sein d'une cellule d'*A. tumefaciens* et cette question mériterait d'être étudiée.

Un des éléments de réponse à cette dernière question réside en la manière dont les cellules d'*A. tumefaciens* tolèrent les plasmides Ti et At en leur sein. Or très peu de choses est connu à ce sujet. Le plus souvent la gamme d'hôtes pour un plasmide donné (ou inversement la gamme de plasmides possibles pour une cellule bactérienne donnée) demeure descriptive et ne s'appuie pas sur une compréhension précise des mécanismes mis en jeu. Si, en laboratoire, il a été par exemple possible de transformer *A. tumefaciens* avec un plasmide

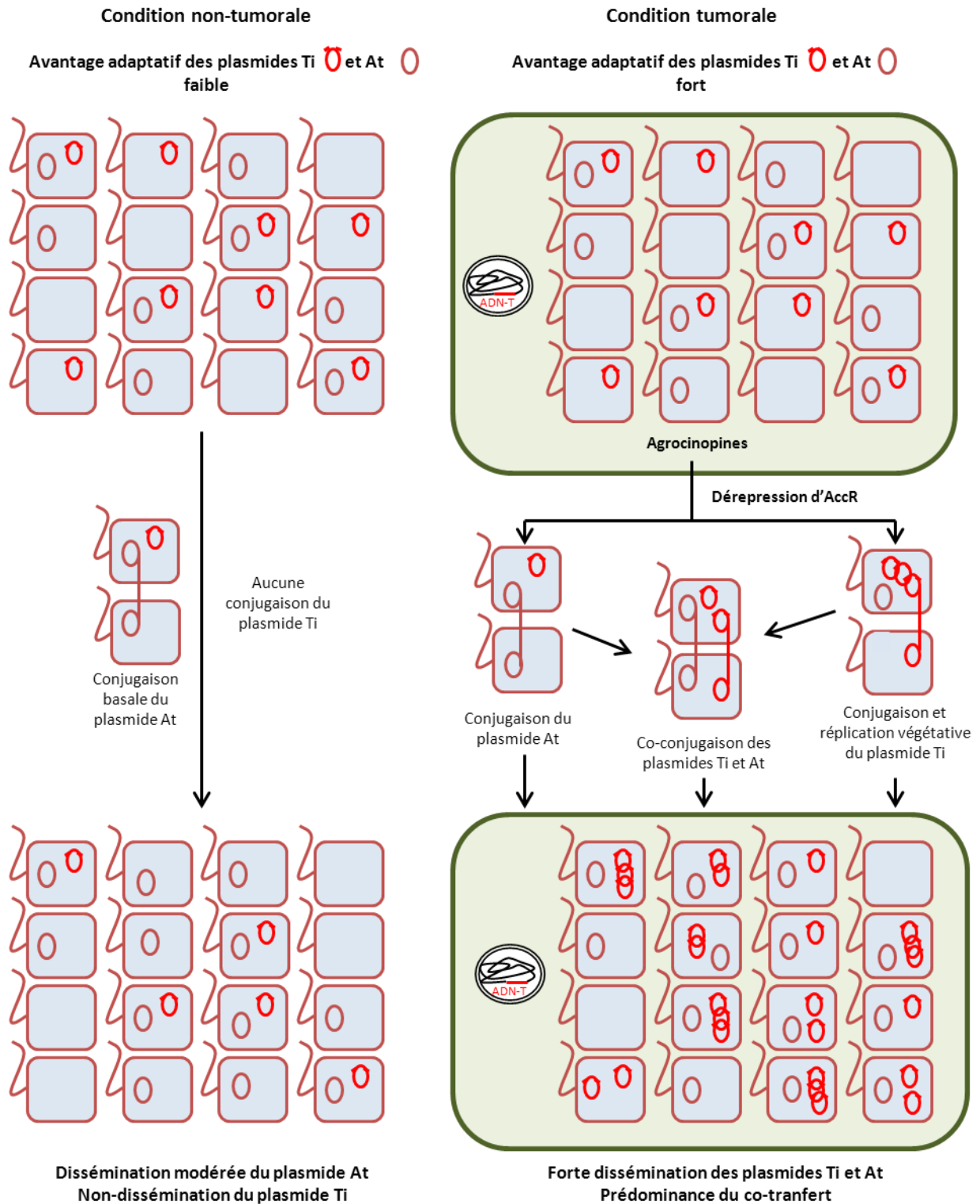


Figure 3: Comparaison des comportements des plasmides Ti et At d'*A. tumefaciens* C58 dans des conditions non-tumorales et tumorales. Cette figure résume une partie de nos données en montrant comment dans le compartiment de la tumeur végétale, le gain adaptatif conféré aux bactéries pathogènes par les plasmides compagnons Ti et At va de pair avec une dissémination conjointe et interdépendante de ces deux fonds génétiques. Pour plus de détails, se reporter au corps du texte.

symbiotique (Abe et al., 1998), ou réciproquement d'introduire dans des *Rhizobium* spp. un plasmide Ti (Teyssier-Cuvelle et al., 2004) - et si ces deux combinaisons présentaient bien les capacités d'induire respectivement sur plante hôte des nodules et des tumeurs -, les raisons pour lesquelles de pareilles combinaisons ne sont pas plus fréquentes dans la nature demeurent obscures. Ce qui est par contre plus clair, c'est le fait que d'abriter un ou plusieurs plasmides peut, dans certaines circonstances, causer chez la bactérie hôte une perte de fitness (Watve et al., 2010). Des couts associés à la maintenance des plasmides Ti et At chez *A. tumefaciens* ont ainsi été mis en évidence expérimentalement (Platt et al., 2012a, Platt et al., 2012b, Morton et al., 2013). D'après cette perspective, dans des conditions où les avantages conférés par les plasmides Ti et At ne se font pas suffisamment sentir, les cellules d'*A. tumefaciens* dépourvues de ces deux réplicons seront favorisées et finiront par prédominer. Il est donc crucial pour les plasmides Ti et At de posséder et de développer en contrepoint un mécanisme leur permettant de se re-disséminer efficacement dans les populations bactériennes réceptrices.

Récemment plusieurs études se sont attelées à la tâche de caractériser le plasmidome (composition en plasmides) de différents environnements (Brown Kav et al., 2012, Walker, 2012). Ces études ont notamment montré que si les plasmides identifiés dans un environnement donné correspondaient bien aux espèces bactériennes présentes dans ce même environnement, leurs proportions respectives différaient significativement. Ainsi le plasmidome ne se superpose pas nécessairement au microbiome. Une des hypothèses avancée pour expliquer cette différence serait qu'il existe dans une niche écologique donnée des facteurs spécifiques qui sélectionnent certains plasmides plus ou moins indépendamment des cellules bactériennes qui les hébergent. Or nos résultats sur la co-régulation des conjugaisons des plasmides Ti et At fournissent une illustration originale de cette vue. Ils montrent en effet comment un facteur environnemental (les opines des tumeurs végétales) peut stimuler la co-sélection de deux plasmides (Ti et At), renforçant par là-même leur collaboration ainsi que la conservation, au sein des cellules hôtes bactériennes, des fonctions mutuellement bénéfiques qu'ils encodent. La découverte et la caractérisation d'autres mécanismes contrôlant la co-dissémination de plasmides permettrait dans le futur de mieux comprendre les natures des différents plasmidomes.

2. Analyse de nouveaux aspects des interactions entre *A. tumefaciens* et plantes hôtes

2.1. Présentation de la démarche expérimentale

Afin d'explorer de nouveaux aspects des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte, nous avons entamé l'analyse en parallèle de profils transcriptomiques de bactéries et de tissus tumoraux. Dans le détail, utilisant *A. thaliana* comme plante hôte, nous avons réalisé une comparaison entre des tissus tumoraux de 18 jours et des tissus contrôles (blessés mais non infectés) au moyen de la technologie CATMA. Pour l'analyse transcriptionnelle d'*A. tumefaciens*, un protocole d'isolement des bactéries du sein des tumeurs a été développé ; les profils transcriptionnels par puces Nimblegene de trois populations différentes de souche C58 (une culture cellulaire en début de phase exponentielle, une population provenant d'un site infectieux et une population colonisatrice de tumeurs de 18 jours) ont ensuite été analysés. A notre connaissance, il s'agit là des premiers co-transcriptomes permettant l'étude des 2 partenaires de l'interaction *A. tumefaciens*-plante hôte au sein des tumeurs. Le traitement des données issues de ces travaux est toujours en cours. Ne seront ainsi présentés que quelques résultats préliminaires. Nous préciserons également pour finir trois pistes que nous comptons explorer davantage dans le futur.

Les données CATMA sur les tumeurs d'*A. thaliana* indiquent qu'environ 1200 gènes sont différentiellement exprimés dans les tumeurs comparativement aux tissus contrôles (environ 500 induits et 700 réprimés). Pour faire le tri dans ces gènes nous avons utilisé différents outils d'analyse en accès libre comme Mapman (http://mapman.gabipd.org/web/guest;jsessionid=6733701EF4C95B04D02D004C2F0433FF.a.jp13_mmapma_gabipd_org) ou Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>). Nous avons également comparé nos résultats avec des données transcriptomiques préalablement

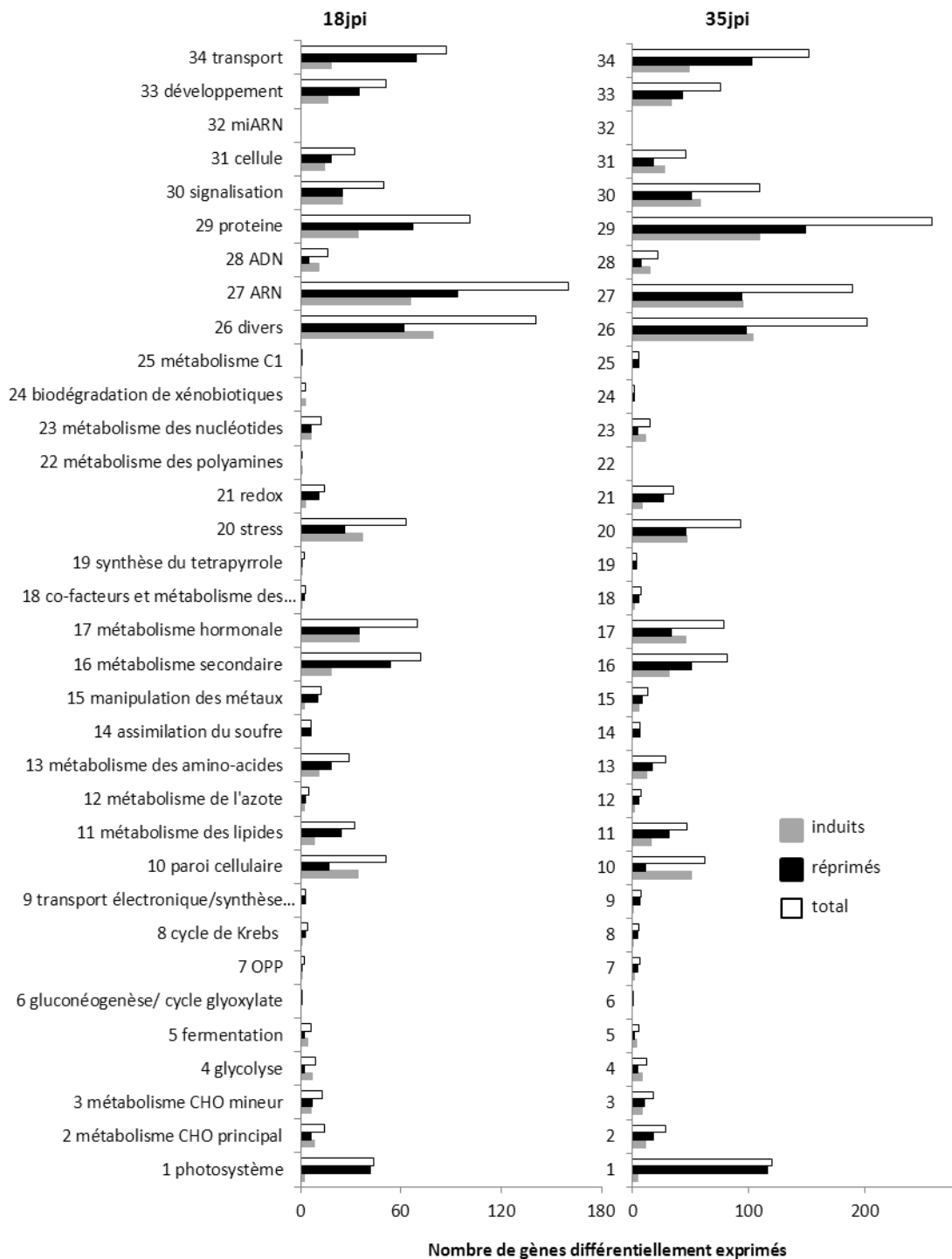


Figure 4: Répartition par classes fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs d'*A. thaliana*. Nos résultats (18jpi) et ceux d'une étude précédente (35jpi, Lee et al., 2009) sont présentés. Les classes fonctionnelles sont celles de Mapman. jpi: jours post-infection.

obtenues à partir de tumeurs d'*A. thaliana* plus âgées (35 jours post-infection au lieu de 18) et en utilisant une technique différente (puces Affymetrix versus technologie CATMA).

Le classement des gènes différemment exprimés par classes fonctionnelles montrent que les profils entre des tumeurs de 18 jours et 35 jours sont similaires (Fig. 4). Cette ressemblance est renforcée par le fait que chacune des classes fonctionnelles contient majoritairement les mêmes gènes dans les cas 18 jours post-infection et 35 jours post-infection ainsi que par le fait que le sens de régulation (induit ou réprimé) de ces gènes reste identique. Nous basant sur des tests statistiques nous avons identifié différentes classes fonctionnelles et familles géniques affectées dans les tumeurs végétales par rapport aux tissus contrôles (Fig. 5). Ces classes fonctionnelles et familles géniques sont impliquées à la fois dans des processus de défense et de développement. Examinant plus en détail ces résultats, et après consultation de ce qui était déjà connu dans la littérature, nous avons décidé de nous concentrer sur le rôle de trois catégories de composés dans les interactions *A. tumefaciens*-plante hôte : les glucosinolates, les défensines et les homologues de nodulines.

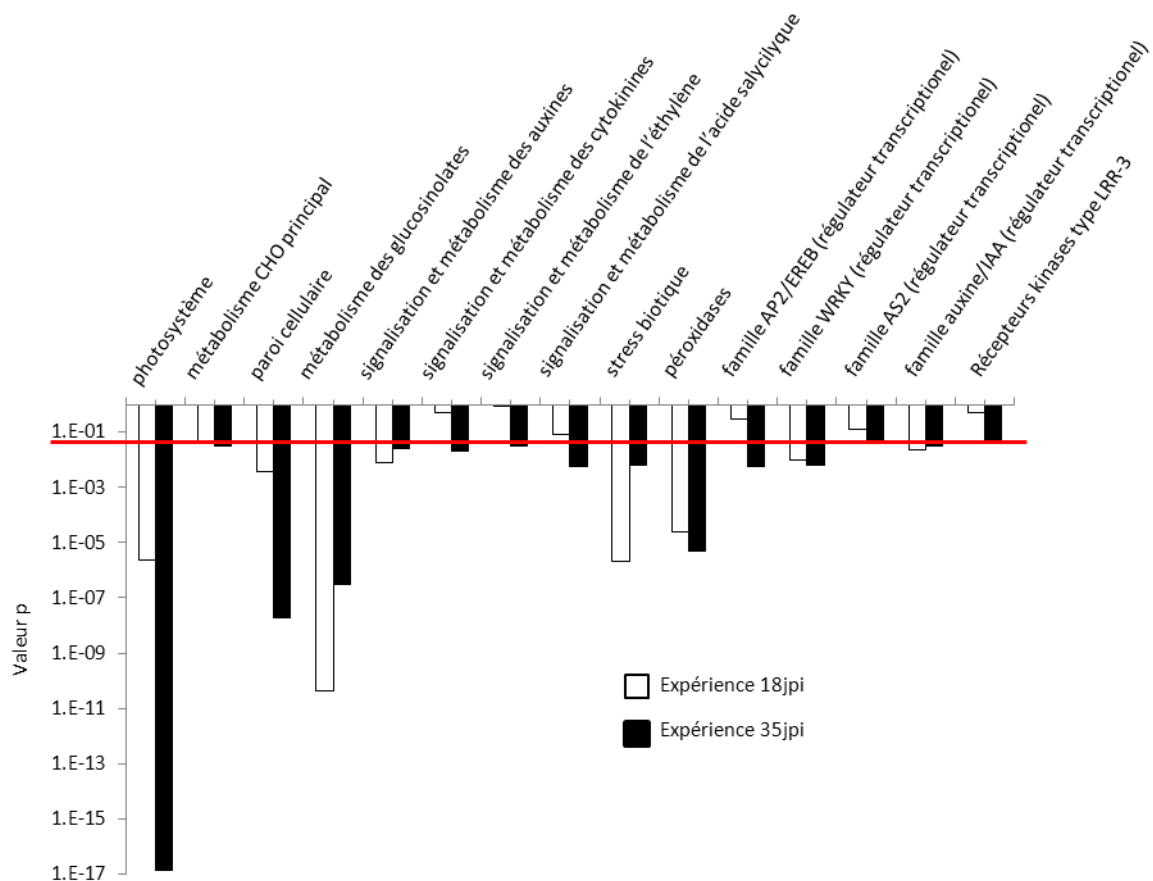


Figure 5: Test de somme des rangs de Wilcoxon sur classes fonctionnelles et familles géniques différemment exprimées dans les tumeurs d'*A. thaliana*. Le test a été réalisé au moyen de Mapman. Nos données et celles de Lee et al. (2009) sont comparées. Un seuil de signification à $p < 0.05$ est indiqué par la ligne rouge.

En ce qui concerne les transcriptomes bactériens, l'analyse systématique des données, fondée sur l'identification de classes fonctionnelles et d'opérons différentiellement exprimés, n'est pas achevée. Dans la comparaison culture cellulaire *versus* tumeur mature, nous trouvons environ 1500 gènes différentiellement exprimés (environ 750 induits et 750 réprimés), soit à peu-près le tiers du génome d'*A. tumefaciens*. Dans ces conditions l'interprétation des résultats est particulièrement ardue car nous avons affaire à deux situations physiologiques totalement dissemblables. Un examen rapide des données indiquent toutefois que la majorité des gènes réprimés sont localisés sur les chromosomes circulaire et linéaire et que ces gènes sont principalement impliqués dans le métabolisme énergétique, les processus de transcription et de traduction ainsi que dans la mobilité des cellules bactériennes. A l'opposé la majorité des gènes induits sont présents sur les plasmides Ti et At et ces gènes sont plutôt impliqués dans la virulence, le métabolisme de l'ADN ainsi que dans des fonctions liées aux éléments mobiles du génome (transposase, séquences de phage...). Dans leur ensemble ces observations suggèrent que les cellules d'*A. tumefaciens* se retrouvent dans un état de « latence » au sein des tumeurs végétales avec une activité énergétique considérablement réduite. Elles soulignent également encore une fois le rôle prépondérant que jouent les deux plasmides du pathogène pour l'adaptation à l'environnement tumoral. Enfin ces observations renforcent la notion selon laquelle les tumeurs végétales seraient pour *A. tumefaciens* des sortes d'« usines » dans lesquelles s'opérerait un large brassage de leur matériel génétique.

Dans la comparaison tumeur mature *versus* site d'infection, nous trouvons 700 gènes différentiellement exprimés (environ 300 induits et 400 réprimés). De façon remarquable les changements d'expression pour la grande majorité de ces gènes restent compris entre 2 et 5. Un examen rapide révèle cependant que les gènes *vir* ou encore les gènes *acc* impliqués dans l'assimilation des agrocinopines sont bien induits dans ces conditions. Nous considérons donc ces données comme une base solide pour l'analyse des fonctions bactériennes différentiellement exprimées au cours de l'interaction *A. tumefaciens*-plantes hôtes. Les comportements des gènes associés au GABA et présentés dans le chapitre IV sont notamment issus de ces données.

2.2. Les glucosinolates dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

Les glucosinolates forment une famille de métabolites secondaires connue pour jouer un rôle important dans les réponses de défense de la plante à divers stress biotiques (Mikkelsen et al., 2003, Brader et al., 2006, Shroff et al., 2008). L'action défensive des glucosinolates s'opère par leur dégradation en composés antimicrobiens du type thiocyanate, isothiocyanate et nitriles. A notre connaissance aucune étude ne s'est pour l'instant intéressée à l'impact des glucosinolates sur les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes.

Nos données transcriptionnelles CATMA indiquent que les expressions d'un nombre important de gènes d'*A. thaliana* impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates sont réprimées dans les tumeurs comparativement aux tissus contrôles (Fig. 6). Par ailleurs des analyses métabolomiques réalisées dans notre laboratoire révèlent que des tumeurs de tomates accumulent certains composés nitrilés comme le 5'-(methylthio)pentanenitrile ou le beta-indole-3acetonitrile. Pris ensemble ces deux informations suggèrent que si dans les tumeurs végétales le stock de glucosinolates est bien activé pour la production de composés antimicrobiens, la recomposition de ce stock est en revanche inhibée. Du côté d'*A. tumefaciens*, une nitrilase encodée sur le plasmide At a été identifiée par annotation automatique (Atu5536). Comme d'autres nitrilases présentes chez d'autres espèces bactériennes, Atu5536 pourrait être impliquée dans le processus de détoxification des composés nitrilés produits par la plante. L'expression de *atu5536* est induite environ 12 fois dans la comparaison tumeur mature *versus* culture cellulaire ; elle n'est par contre pas affectée dans la comparaison tumeur mature *versus* site d'infection.

Afin de mieux évaluer la contribution des glucosinolates dans l'interaction *A. tumefaciens*-plantes hôtes au sein des tumeurs, nous envisageons d'obtenir différents mutants d'*A. thaliana* affectés dans la synthèse ou la dégradation de ces métabolites secondaires et de les soumettre à des tests phénotypiques. Le choix des mutants sera dicté par un examen critique de nos gènes différentiellement exprimés ainsi que par ce qui est connu dans la littérature. Le test phénotypique sera un test d'infection par *A. tumefaciens* permettant de quantifier le développement tumoral ainsi que l'ampleur de la colonisation bactérienne. En parallèle il est prévu de construire un mutant *atu5536* et d'analyser les réponses de ce



Figure 6: Analyse PAGE (Parametric Analysis of Gene set Enrichment) des données transcriptomiques CATMA pour des tumeurs de 18 jours. L'analyse a été réalisée par l'interface Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>). Ne sont présentées que les termes GO (Gene Ontology) liés au métabolisme des glucosinolates. Les flèches en traits fins relient 2 termes GO non affectés, celles en traits épais relient un terme GO non affecté à un terme GO affecté. Les flèches pleines relient deux termes GO affectés.

mutant, soit à une exposition à divers composés nitrilés *in vitro* soit dans des tumeurs de plantes.

2.3. Les défensines dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

Les défensines de plantes sont des petites protéines (environ 100 acides aminés) riches en cystéines et connues pour leurs propriétés antimicrobiennes (Thomma et al., 2002). L'espèce modèle *A. thaliana* abrite une famille de 14 défensines réparties en 3 sous-classes (PDF1, 2 et 3). De façon remarquable, chez la légumineuse *Medicago truncatula* une large famille de protéines apparentées aux défensines, nommées NCR (*nodule cystein rich proteins*), joue un rôle important dans le processus de nodulation et pour l'équilibre des interactions entre la plante et son symbionte bactérien, *Sinorhizobium meliloti* (Mergaert et al., 2003). Le transporteur BacA qui permet l'importation de peptides NCR au sein du cytoplasme de *S. meliloti* est également un élément clef de ce mécanisme (Haag et al., 2011). Il existe parmi les protéobactéries de nombreux homologues de BacA, notamment chez *A. tumefaciens*. La capacité de la protéine BacA (Atu2304 / AtBacA) d'*A. tumefaciens* C58 à importer *in vitro* différents peptides toxiques a été démontrée dans un travail préliminaire de notre équipe.

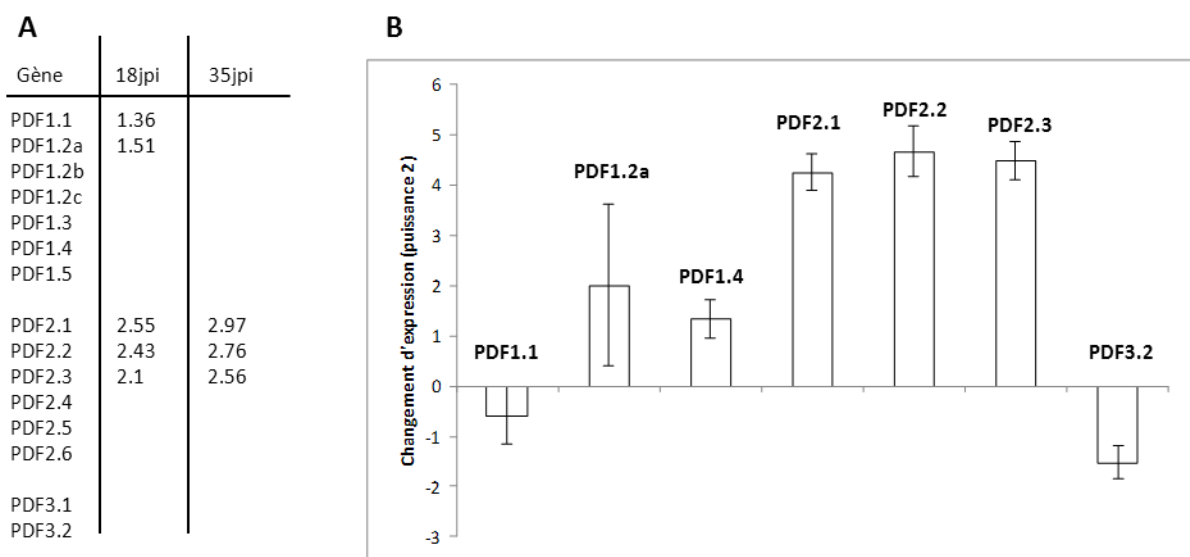


Figure 7: Défensines différemment exprimées dans les tumeurs d'*A. thaliana*. **A** Liste des défensines d'*A. thaliana* et valeurs (en puissance 2) des changements d'expression observés dans des tumeurs 18 jours post-infection (jpi) (nos données CATMA) et 35 jpi (Lee et al., 2009). Seules les valeurs correspondant à une variation significative sont indiquées. **B** Valeurs des changements d'expression observés dans des tumeurs de 18jpi par RT-qPCR pour une sélection de gènes de défensines. Les ARNs de tumeurs et de tissus contrôles utilisés pour cette expérience sont les mêmes que ceux analysés par CATMA. Les valeurs moyennes et les écarts-types de deux expériences indépendantes sont présentés. Celles-ci ont été réalisées par B. De Coninck (Centre of Microbial and Plant Genetics, Louvain).

Toutefois l'implication de *AtBacA* au cours des interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte demeure incertaine.

Nos données transcriptomiques CATMA révèlent que l'expression de 5 défensines d'*A. thaliana* des classes 1 et 2 (PDF1.1, 1.2a, 2.1, 2.2 et 2.3) est fortement augmentée dans les tumeurs comparativement aux tissus contrôles (Fig. 7). Chez *A. tumefaciens* l'expression de *bacA* (*atu2304*) est induite 4 fois dans la comparaison tumeur mature *versus* site d'infection et ne change pas dans la comparaison tumeur mature *versus* culture cellulaire.

Notre objectif sera de mieux comprendre les rôles des défensines de plante et du transporteur *BacA* au cours des interactions entre *A. tumefaciens* et *A. thaliana*. Reproduisant la même approche que pour l'étude des glucosinolates, nous envisageons de soumettre des lignées transgéniques de plantes surexprimant ou déficientes pour certaines PDFs à des tests d'infection avec des souches d'*A. tumefaciens* sauvages ou *bacA* mutantes.

Matériellement, le mutant *bacA* a déjà été construit dans le laboratoire ; les lignées végétales nous seront, elles, gracieusement fournies dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Barbara De Coninck (Centre of Microbial and Plant Genetics, Louvain).

Ce travail devrait alimenter une réflexion intéressante sur le rôle des peptides antimicrobiens dans les interactions entre plantes et bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*, soit pathogènes comme *A. tumefaciens*, soit symbiotiques comme *S. meliloti*.

2.4. Les homologues de nodulines dans les interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes

Chez les plantes symbiotiques, la formation de nodules s'accompagne de l'expression de gènes spécifiques appelés nodulines. Selon le moment de leur expression, il est possible de distinguer les gènes nodulines précoces et les gènes nodulines tardifs. Plusieurs lignes d'évidences indiquent que les protéines encodées par ces gènes jouent des rôles métaboliques et structuraux importants pour la formation des nodules. Cela étant les fonctions précises des nodulines demeurent souvent inconnues en raison de redondances fonctionnelles (Verma et al., 1986, Nap and Bisseling, 1990). De façon intéressante certaines plantes non symbiotiques abritent aussi dans leur génome des gènes similaires aux nodulines. Des analyses *in silico* ont par exemple permis d'identifier une famille de 64 gènes homologues aux nodulines chez *A. thaliana*

Classe	Gène	18jpi	35jpi
I 42 membres au total	At1g01070	-0.73	-1.89
	At3g28050	-0.86	-1.11
	At3g28080		-0.85
	At2g37460	-1.44	-1.08
	At4g08290		-0.79
	At4g08300	-0.77	-2.46
	At1g11460	-0.97	
	At3g56620		-1.36
	At1g70260	-1.1	
	At2g40900		-1.78
	At4g01440	-1.08	-1.41
	At4g01450	-1.48	
II 16 membres au total	At2g16660		1.83
III 5 membres au total	At1g76800	-1.08	-1.30
	At1g21140	-0.87	
	At3g43630	-0.73	

Table 1: Gènes de nodulines différenciellement exprimés dans les tumeurs d'*A. thaliana*. Valeurs (en puissance 2) des changements d'expression observés dans des tumeurs 18 jours post-infection (jpi) (nos données CATMA) et 35 jpi (Lee et al., 2009). Seuls les gènes différenciellement exprimés de manière significative sont indiqués. A gauche le nombre total de gènes appartenant à la même classe est précisé.

(<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/Nodulin.jsp>). Ces gènes codent pour des protéines membranaires, mais aucune fonction n'a pu jusqu'à présent leur être associée. Une famille de 22 gènes homologues à des nodulines précoces a également été caractérisée chez *A. thaliana*. Les protéines correspondantes sont majoritairement des arabinogalactane protéines chimériques liées à la famille des phytocyanines (Mashiguchi et al., 2009). Certaines études rapportent l'implication de nodulines précoces d'*A. thaliana* dans la différenciation des cellules du phloème ou encore dans les processus homéostatiques du fer (Khan et al., 2007, Gollhofer et al., 2011). Récemment il a été montré que les expressions de certaines nodulines

précoces d'*A. thaliana* pouvaient être induites dans les racines en présence de *S. meliloti*, suggérant un rôle pour ces gènes dans les interactions avec les bactéries (Peleg-Grossman et al., 2009).

Dans nos données transcriptomiques CATMA nous observons que de nombreux gènes nodulines d'*A. thaliana* sont différenciellement exprimés dans les tumeurs comparativement à des tissus contrôles. Parmi la famille de 64 gènes mentionnée précédemment nous constatons que près de 25% des gènes de la classe 1 sont réprimés dans des tumeurs de 18 jours et de 35 jours (bien qu'il ne s'agisse pas toujours des mêmes gènes dans les deux conditions) (Table 1). Trois membres de la classe 3 apparaissent eux également réprimés dans des tumeurs de 18 jours (Table 1). En ce qui concerne les gènes de nodulines précoces,

3 sur 22 sont induits à la fois dans des tumeurs de 18 et 35 jours. Dans les tumeurs de 35 jours 3 gènes supplémentaires sont différentiellement exprimés (soit 6/22 au total).

Afin d'explorer le rôle des gènes homologues aux nodulines dans les interactions entre *A. tumefaciens* et sa plante hôte, nous prévoyons d'analyser le phénotype tumoral de différentes lignées mutantes d'*A. thaliana* affectées dans l'expression de ces gènes de nodulines. Compte tenu de la forte homologie entre les gènes de ces familles de nodulines et des possibles redondances fonctionnelles qui en découlent, le risque d'échec de ce projet n'est pas négligeable. D'un autre côté la perspective de jeter une lumière nouvelle sur le rôle des nodulines dans un contexte d'interaction plante-bactérie non plus symbiotique mais pathogénique est particulièrement excitant. Ce travail pourrait ainsi, en plus de celui amorcé avec les défensines, introduire une thématique de recherche élargie sur les similitudes des processus symbiotiques et pathogéniques initiés par des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*.

3. Bibliographie

Abe, M., Kawamura, R., Higashi, S., Mori, S., Shibata, M. & Uchiumi, T. (1998) Transfer of the symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to *Agrobacterium tumefaciens*. *J Gen Appl Microbiol*, 44, 65-74.

Baek, C. H., Farrand, S. K., Park, D. K., Lee, K. E., Hwang, W. & Kim, K. S. (2005) Genes for utilization of deoxyfructosyl glutamine (DFG), an amadori compound, are widely dispersed in the family Rhizobiaceae. *FEMS Microbiol Ecol*, 53, 221-33.

Bergeron, J., Macleod, R. A. & Dion, P. (1990) Specificity of octopine uptake by *Rhizobium* and *pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1453-8.

Bouet, J. Y., Nordstrom, K. & Lane, D. (2007) Plasmid partition and incompatibility--the focus shifts. *Mol Microbiol*, 65, 1405-14.

Brader, G., Mikkelsen, M. D., Halkier, B. A. & Tapio Palva, E. (2006) Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *Plant J*, 46, 758-67.

Brown Kav, A., Sasson, G., Jami, E., Doron-Faigenboim, A., Benhar, I. & Mizrahi, I. (2012) Insights into the bovine rumen plasmidome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5452-7.

Chai, Y., Zhu, J. & Winans, S. C. (2001) TrIR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrIR:TraR dimers. *Mol Microbiol*, 40, 414-21.

Chen, L., Chen, Y., Wood, D. W. & Nester, E. W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 184, 4838-45.

Cho, H. & Winans, S. C. (2007) TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol*, 63, 1769-82.

Crepin, A., Barbey, C., Beury-Cirou, A., Helias, V., Taupin, L., Reverchon, S., Nasser, W., Faure, D., Dufour, A., Orange, N., Feuilloley, M., Heurlier, K., Burini, J. F. & Latour, X. (2012) Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS One*, 7, 23.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Muller, T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T. & Hedrich, R. (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell*, 18, 3617-34.

- Dunoyer, P., Humber, C. & Voinnet, O. (2006) Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet*, 38, 258-63.
- Gollhofer, J., Schlawicke, C., Jungnick, N., Schmidt, W. & Buckhout, T. J. (2011) Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 49, 557-64.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. & Slater, S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2323-8.
- Haag, A. F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Herouart, D., Dall'angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P. & Ferguson, G. P. (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol*, 9, 4.
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2009) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 529-37.
- Kado, C. I. (1998) Origin and evolution of plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 117-26.
- Khan, J. A., Wang, Q., Sjolund, R. D., Schulz, A. & Thompson, G. A. (2007) An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143, 1576-89.
- Kim, H. & Farrand, S. K. (1997) Characterization of the *acc* operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84. *J Bacteriol*, 179, 7559-72.
- Lee, C. W., Efetova, M., Engelmann, J. C., Kramell, R., Wasternack, C., Ludwig-Muller, J., Hedrich, R. & Deeken, R. (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21, 2948-62.
- Li, P. L. & Farrand, S. K. (2000) The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the repABC family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J Bacteriol*, 182, 179-88.
- Mashiguchi, K., Asami, T. & Suzuki, Y. (2009) Genome-wide identification, structure and expression studies, and mutant collection of 22 early nodulin-like protein genes in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73, 2452-9.

Matthysse, A. G., Jaeckel, P. & Jeter, C. (2008) attG and attC mutations of *Agrobacterium tumefaciens* are dominant negative mutations that block attachment and virulence. *Can J Microbiol*, 54, 241-7.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol*, 132, 161-73.

Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Glawischnig, E., Jensen, A. B., Andreasson, E. & Halkier, B. A. (2003) Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiol*, 131, 298-308.

Morton, E. R., Merritt, P. M., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2013) Large Deletions in the pAtC58 Megaplasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Can Confer Reduced Carriage Cost and Increased Expression of Virulence Genes. *Genome Biol Evol*, 5, 1353-64.

Nap, J.-P. & Bisseling, T. (1990) The roots of nodulins. *Physiologia Plantarum*, 79, 407-414.

Nautiyal, C. S. & Dion, P. (1990) Characterization of the Opine-Utilizing Microflora Associated with Samples of Soil and Plants. *Appl Environ Microbiol*, 56, 2576-2579.

Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Olivares, J. & Sanjuan, J. (2013) Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environ Microbiol*, 15, 811-21.

Oger, P. M., Mansouri, H., Nesme, X. & Dessaux, Y. (2004) Engineering root exudation of *Lotus* toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microb Ecol*, 47, 96-103.

Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2003) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol*, 48, 1059-73.

Peleg-Grossman, S., Golani, Y., Kaye, Y., Melamed-Book, N. & Levine, A. (2009) NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS One*, 4, 0008399.

Pinto, U. M., Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2012) The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat Rev Microbiol*, 10, 755-65.

Piper, K. R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I. & Farrand, S. K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 32, 1077-89.

Platt, T. G., Bever, J. D. & Fuqua, C. (2012a) A cooperative virulence plasmid imposes a high fitness cost under conditions that induce pathogenesis. *Proc Biol Sci*, 279, 1691-9.

Platt, T. G., Fuqua, C. & Bever, J. D. (2012b) Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen. *Evolution*, 66, 1953-65.

Roa-Rodriguez, C. (2003) Promoters used to regulate gene expression. Cambia, http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDwQFjAC&url=http%3A%2F%2Fcougarlaw.com%2Flinked_files%2Fpromoters_for_gene_regulation.pdf&ei=qygzUjr7IYLStQbs-IGADQ&usg=AFQjCNHoP5EvIks_dU1k84Z-eeY9fXdXdg&sig2=93dGktxBIWAh9C5YnmorNw&bvm=bv.52164340,d.Yms

Shroff, R., Vergara, F., Muck, A., Svatos, A. & Gershenzon, J. (2008) Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6196-201.

Teyssier-Cuvelle, S., Oger, P., Mougel, C., Groud, K., Farrand, S. K. & Nesme, X. (2004) A highly selectable and highly transferable Ti plasmid to study conjugal host range and Ti plasmid dissemination in complex ecosystems. *Microb Ecol*, 48, 10-8.

Thomma, B. P., Cammue, B. P. & Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta*, 216, 193-202.

Verma, D. P. S., Fortin, M. G., Stanley, J., Mauro, V. P., Purohit, S. & Morrison, N. (1986) Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Molecular Biology*, 7, 51-61.

Von Bodman, S. B., Bauer, W. D. & Coplin, D. L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 41, 455-82.

Walker, A. (2012) Welcome to the plasmidome, *Nat Rev Microbiol*. 2012 May 14;10(6):379. doi: 10.1038/nrmicro2804.

Watve, M. M., Dahanukar, N. & Watve, M. G. (2010) Sociobiological control of plasmid copy number in bacteria. *PLoS One*, 5, 0009328.

Wibberg, D., Blom, J., Jaenicke, S., Kollin, F., Rupp, O., Scharf, B., Schneiker-Bekel, S., Sczcepanowski, R., Goesmann, A., Setubal, J. C., Schmitt, R., Puhler, A. & Schluter, A. (2011) Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupini* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. *J Biotechnol*, 155, 50-62.

Wilms, I., Voss, B., Hess, W. R., Leichert, L. I. & Narberhaus, F. (2011) Small RNA-mediated control of the *Agrobacterium tumefaciens* GABA binding protein. *Mol Microbiol*, 80, 492-506.

Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutjavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V. & Nester, E. W. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-23.

Intrication des signalisations opine, quorum-sensing et GABA chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* : conséquences sur la colonisation de l'hôte et la dissémination des gènes plasmidiques

Les opines sont des molécules produites dans les cellules végétales transformées par l'ADN-T d'*A. tumefaciens*. Ces opines peuvent être utilisées comme nutriments par le phytopathogène et certaines d'entre elles agissent comme signaux moléculaires contrôlant la dissémination du plasmide de virulence Ti via la signalisation quorum-sensing. Le présent travail vise à une compréhension élargie du rôle des opines au cours des interactions *A. tumefaciens*-plantes hôtes. En se basant d'abord sur des analyses transcriptomiques, le régulon AccR d'*A. tumefaciens* C58, contrôlé par les opines agrocinopines, a été défini : celui-ci inclut des fonctions associées (i) à l'assimilation des agrocinopines, (ii) à l'assimilation de la nopaline, (iii) à la signalisation quorum-sensing et la conjugaison du plasmide Ti, (iv) à la conjugaison du plasmide At. La corrélation entre la co-régulation des conjugaisons des plasmides Ti et At et le co-transfert des deux réplicons a en outre été mise en évidence. Dans un second temps, associant des approches de génétique fonctionnelle à des travaux collaboratifs en biologie structurale, l'avantage sélectif conféré par les opines nopaline et octopine à *A. tumefaciens* au sein des tumeurs végétales a été quantifié. Les bases moléculaires sous-jacentes à cet avantage sélectif, notamment celles associées à la perception et l'importation des deux opines dans le cytoplasme bactérien, ont été décrites. Enfin, en combinant des approches de métabolomique et de génétique inverse avec des tests de conjugaison *in planta*, les effets opposés de la signalisation GABA d'une part et des signalisations opine et quorum-sensing d'autre part sur la dissémination du plasmide Ti ont été démontrés. En conclusion, nos résultats révèlent l'intrication des signalisations opine, quorum-sensing et GABA au cours de l'interaction *A. tumefaciens*-plantes hôtes. Ils soulignent en particulier les impacts de cette intrication sur la colonisation de l'hôte ainsi que sur la dissémination des gènes de virulence et d'adaptation à l'environnement tumeur portés par les plasmides Ti et At.

Interlink between opine, quorum-sensing and GABA signaling in the phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens*: Impact on host colonization and dissemination of plasmids

Opines are produced in plant cells transformed with the *A. tumefaciens* T-DNA. These opines can be used as nutrients by the phytopathogen and some of them act as signaling molecules controlling Ti plasmid dissemination through quorum-sensing. The present study aims at an enlarged understanding of the roles of opines during *A. tumefaciens*/plant host interactions. First, based on transcriptomic investigations, the agrocinopine-controlled AccR regulon from *A. tumefaciens* C58 was thoroughly characterized. This one includes functions associated with (i) agrocinopines assimilation, (ii) nopaline assimilation, (iii) quorum-sensing and Ti plasmid conjugation, (iv) At plasmid conjugation. Moreover our analysis showed that co-regulation of Ti and At plasmid conjugations correlated with the co-transfer of the two replicons. In a second step using functional genetic and structural biology we quantified the selective advantage conferred to colonizing *A. tumefaciens* populations by the assimilation of the opines nopaline and octopine. The molecular basis which underlies this selective advantage, especially regarding the sensing and import of the two opines within the bacterial cytoplasm, were also described. Finally combining metabolomics and reverse genetic with *in planta* conjugation assays we demonstrated the opposite effects of GABA and opine/quorum-sensing signaling on the dissemination of Ti plasmids. In conclusion our results reveal the interlink between opine, quorum-sensing and GABA signaling during *A. tumefaciens*/plant host interactions. They noticeably highlight the impact of this interlink on host colonization and the dissemination of Ti and At plasmid genes which are critical for the virulence and the adaption of the bacteria to the tumor lifestyle.

Mots clefs (Key words): *Agrobacterium tumefaciens*, quorum-sensing, opines, plasmide (plasmid), PBP

