HAL
open science

Structures et spécificités de Protéines Périplasmiques de Fixation pour les mannityl-opines chez Agrobacterium tumefaciens.

Loic Marty

To cite this version:

Loic Marty. Structures et spécificités de Protéines Périplasmiques de Fixation pour les mannityl-opines chez Agrobacterium tumefaciens.. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS238 . tel-01884406

HAL Id: tel-01884406

https://theses.hal.science/tel-01884406v1

Submitted on 1 Oct 2018

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.

UNIVERSITE PARIS-SACLAY
LABORATOIRE : INSTITUT DE BIOLOGIE INTEGRATIVE DE LA CELLULE

ECOLE DOCTORALE N°569 :
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

THESE DE DOCTORAT

Biochimie et Biologie Structurale

par

LOÏC MARTY

Structures et spécificité de protéines périplasmiques de fixation (PBP) pour les mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*.

NNT : 2016SACLS238

Soutenance à Gif-sur-Yvette, le 16/09/2016

Composition du Jury :

Directrice de thèse :	Solange MORERA	Directrice de recherche (I2BC, Gif-sur-Yvette)
Co-directeur de thèse :	Denis FAURE	Directeur de recherche (I2BC, Gif-sur-Yvette)
Rapporteures :	Florence HOMMAIS	Maître de conférences (Université Lyon I)
	Claudine MAYER	Professeure (Université Paris Diderot)
Examinatrice :	Isabelle BROUTIN	Directrice de recherche (Université Paris Descartes)
Président du jury :	Herman VAN TILBEURGH	Professeur (Université Paris-Saclay)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury, Florence Hommais, Claudine Mayer, Isabelle Broutin et Herman Van Tilbeurgh, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude envers Solange Moréra et Denis Faure, pour m'avoir accepté comme doctorant, aiguillé, conseillé, supporté tout au long de ces trois années. Je suis également extrêmement reconnaissant envers Yves Dessaux pour ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et nos discussions scientifiques passionnantes et enrichissantes. Merci à vous trois de m'avoir fait découvrir ce qu'était l'expérience incroyable de mener une thèse.

Merci à l'ensemble des personnes qui sont restées ou qui ont été de passage au bâtiment 34 pour leur accueil chaleureux.

Je remercie ensuite tout particulièrement Armelle Vigouroux pour son aide, ses précieux conseils, sa patience et ses gâteaux.

Merci aussi à Abbas, « Petit Chinois », Yan, Soso, Marion, Fernando, Cécile, Morgane, Kai, Weiyi, Coco, Clémence, Gemma pour avoir mis l'ambiance au bâtiment 34, pour les pauses café, les apéros, les restos, les cinés et les parties endiablées de ping-pong. Merci à Christophe, Pascal et Patrick pour nos repas de midi animés, toujours dans la bonne humeur, saupoudrés de blagues et de discussions pas toujours scientifiques. Merci également à Stéphane pour sa gentillesse et les immenses services rendus.

Thank you, Sophie, just for existing. Knowing you has changed my whole life.

Merci à mes amies de toujours, Lauriane et Marylin, la panthère et le phénix, pour leur amitié, leur soutien, pour avoir été là quand j'ai eu besoin de vous, pour m'avoir fait rire, pour avoir partagé aussi bien mes réussites que mes craintes et mes instants de doute. Vous êtes les meilleures amies dont on puisse rêver.

Un grand merci à Athé, Laeti, Flo, François, Matthieu, Romain, pour nos instants détente toujours géniaux, pour m'avoir changé les idées et pour m'avoir fait découvrir tant de choses. Mention spéciale à Barbara, Stéph, Anto, Sabiha, Yann et Mouna qui ont vécu la même galère que moi pour la plupart durant ces trois dernières années. Merci pour votre soutien à tous !

Enfin, un énorme merci à toute ma famille, qui m'a toujours soutenu et cru en moi. Je n'en serais pas là où j'en suis sans vous. Merci pour votre amour et vos encouragements depuis toujours !

Table des matières

AVANT-PROPOS **9**

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **11**

1.1 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* : AGENT ETIOLOGIQUE DE LA GALLE DU COLLET 11
1.1.1 Le genre Agrobacterium *11*
1.1.1.1 Caractéristiques 11
1.1.1.2 Taxonomie 12
1.1.1.3 Génomes des souches C58 et B6 14
1.1.1.3.1 Agrobacterium tumefaciens C58 14
1.1.1.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* B6 16
1.1.1.4 Quorum sensing 16
1.1.2 La galle du collet *17*
1.1.2.1 Description générale 17
1.1.2.2 Cycle d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* 18
1.1.2.2.1 Reconnaissance et attachement à la plante 19
1.1.2.2.2 Transfection et intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante 20
1.1.2.2.3 Expression des gènes portés sur l'ADN-T 24
1.2 PLASMIDES ET OPINES 25
1.2.1 Les différents types de plasmides *25*
1.2.1.1 La classification des plasmides Ti 25
1.2.1.2 Les plasmides At 27
1.2.2 Les opines *28*
1.2.2.1 Définition et origines 28
1.2.2.2 Les familles d'opines chez *Agrobacterium* 29
1.2.2.2.1 Les opines composées d'une partie acide aminé 29
1.2.2.2.2 Les composés d'Amadori 34
1.2.2.2.3 Les phosphodiesters de sucre : les agrocinopines 35
1.2.2.3 Métabolisme des opines 36
1.2.2.3.1 Synthèse des opines dans la plante 36
1.2.2.3.2 Transport et catabolisme des opines chez *A. tumefaciens* 37
1.2.2.4 Rôle des opines : le concept d'opine 40
1.2.2.5 Les mannityl-opines : une synthèse et une dégradation en plusieurs étapes 41
1.2.2.5.1 Synthèse à partir de trois protéines 41
1.2.2.5.2 La voie de transport et de catabolisme non spécifique 42
1.2.2.5.3 La voie de transport et de catabolisme spécifique pour l'acide mannopinique et l'acide agropinique 44
1.3 LES PROTEINES PERIPLASMIQUES DE LIAISON (PBP) : STRUCTURE ET MECANISME 45
1.3.1 Les transporteurs ABC *45*
1.3.1.1 Généralités 45
1.3.1.2 Les domaines transmembranaires (TMD) 47
1.3.1.3 Les domaines de liaison à un nucléotide (NBD) 47
1.3.2 Les PBP : structure et mécanisme *48*
1.3.2.1 Structure générale 48
1.3.2.2 Classification structurale 49
1.3.2.3 Liaison avec le ligand 51
1.3.2.4 Interaction avec les transporteurs 51

OBJECTIFS DE LA THESE **53**

CHAPITRE 2 : ETUDES STRUCTURALES ET MESURES D'AFFINITE DES PBP MOTA CHEZ LA SOUCHE B6 ET SOCA ET ATTC CHEZ LA SOUCHE C58. ..... **55**

2.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE 55
2.2 PRESENTATION DES TRAVAUX 55
2.3 SOCA CAN BIND GLUTAMATE 82

2.4 CONCLUSION 82

CHAPITRE 3 : COMPARAISONS STRUCTURALE ET BIOPHYSIQUE DE DEUX PBP CAPABLES DE FIXER L'ACIDE MANNOPINIQUE CHEZ LA SOUCHE B6. 85

3.1 INTRODUCTION 85
3.2 RESULTS 87
3.2.1 Affinity of MotA and MoaA to Mannopinic acid 87
3.2.2 MotA Recognizes mannopinic acid 88
3.2.3 Trials to obtain MoaA structure 89
3.2.4 MoaA models 91
3.3 METHODS 91
3.4 CONCLUSION 94

CHAPITRE 4 : ASPECTS STRUCTURAUX ET BIOCHIMIQUES DES PBP PERMETTANT LE TRANSPORT DE L'ACIDE AGROPINIQUE CHEZ B6 95

4.1 INTRODUCTION 95
4.2 RESULTS 97
4.2.1 AgtB fold belongs to class D 97
4.2.2 AgtB recognizes agropinic acid only: the agropinic acid-binding signature 98
4.2.3 Affinity of AgtB and AgaA to agropine, agropinic acid and the other mannityl-opines 100
4.2.4 AgaA fold is a PBP from class C 101
4.2.5 AgaA specifically recognizes agropinic acid 103
4.2.6 Comparison between AgtB and AgaA structures 105
4.2.7 AgtB is branched with a few bacteria 106
4.2.8 The AgaA phylogenetical cluster is branched with peptide binding proteins 107
4.2.9 Agrobacterium tumefaciens R10 strain is able to import agropine 108
4.2.10 Construction of an agt-operon mutant 109
4.3 METHODS 109
4.4 CONCLUSION 113

CHAPITRE 5 : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES 115

5.1 TRANSPORT DU DFGA ET D'AUTRES COMPOSES D'AMADORI 116
5.2 LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES *MOTABCD* ET *AGTABC* 118
5.3 LA STRUCTURE DE MOAA 120
5.4 LE TRANSPORTEUR DE L'AGROPINE CHEZ B6 122
5.5 LE LIGAND D'ATTC 123
5.6 GENES PUTATIFS DE *BURKHOLDERIA SP.* PAMC 26561 RESPONSABLES DU CATABOLISME DE MANNITYL-OPINES 126

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 131

ANNEXE 1 : STRUCTURES OBTENUES 143

ANNEXE 2 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCES 145

Abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
ACC	acide 1-aminocyclopropane-1-carboxilique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN-T	ADN transféré
ATP	Adénosine tri-phosphate
Cα	Carbone alpha
DFG	désoxyfructosylglutamine
DFGA	désoxyfructosylglutamate
DFOP	désoxyfructosyloxoproline
GABA	γ-aminobutyric acid
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Luria Broth
MAD	Multiple-wavelength Anomalous Diffusion
Mb	megabase
MR	Molecular Replacement
NBD	Nucleotide Binding Domain
NCBI	National Center of Biology Information
OD	Optical Density
PAMC	Polar and Alpine Microbial Collection
pAt	plasmid *Agrobacterium tumefaciens*
PCR	Polymerisation Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PBP	Periplasmic Binding Protein
pTi	plasmid Tumor inducing
rpm	rotations per minute
RMSD	Root Mean Square Deviation
SAD	Single-wavelength Anomalous Diffusion
SAH	S-adénosyl-homosérine
SAM	S-adénosyl-méthionine
SRH	S-ribosyl-homosérine
SST4	Système de Sécrétion de Type 4
TMD	Transmembrane Domain

AVANT-PROPOS

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est l'agent responsable de la galle du collet, une maladie qui touche plus de 600 espèces de plantes, dont plusieurs d'intérêt agronomique. Elle se caractérise par la formation de tumeurs, appelée « galles », au niveau du site d'infection. La bactérie transfère et intègre une partie de son plasmide de virulence pTi (Tumor inducing) dans le génome de la plante, afin de détourner les voies métaboliques de l'hôte à son avantage. Ce détournement aboutit à la formation de tumeurs qui servent de niche pour *A. tumefaciens* et dans lesquelles sont produites des molécules particulières, appelées opines, qui servent de nutriments spécifiques pour la bactérie. Il existe plus d'une vingtaine d'opines différentes, produites par la plante transformée puis transportées et catabolisées par la bactérie en fonction du type de pTi qu'elle possède.

La souche *A. tumefaciens* B6 posséde un pTi de type octopine, qui permet de métaboliser l'octopine et les quatre mannityl-opines (la mannopine, l'acide mannopinique, l'agropine et l'acide agropinique). Les mannityl-opines sont synthétisées par une suite de réactions dont un premier intermédiaire est la désoxyfructosyl-glutamine (DFG). La DFG est aussi un composé abondant, appelé composé d'Amadori, issu de la dégradation naturelle de matières organiques. Même si ces molécules sont assez similaires, la souche B6 possède quatre systèmes de transport permettant l'import d'une ou plusieurs mannityl-opines. La souche *A. tumefaciens* C58, bien qu'elle possède un pTi de type nopaline qui ne permet pas le métabolisme des mannityl-opines, possède sur son autre plasmide, le pAt, le gène d'un transporteur de la DFG, apparemment capable de transporter également la mannopine. S'y trouve aussi un autre gène codant pour un transporteur annoté comme fixant la mannopine.

Le but principal de ce projet de thèse était de caractériser structuralement et biochimiquement les protéines périplasmiques de fixation (PBP), composantes qui déterminent la spécificité de chaque système de transport, fixant les mannityl-opines et la DFG chez les souches B6 et C58.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente le genre *Agrobacterium*, détaille le génome des deux souches pathogènes B6 et C58 et traite de leur mode d'infection chez les plantes. Ce chapitre introduit aussi les plasmides pTi et pAt ainsi que les molécules particulières que sont les opines, leur diversité, leur métabolisme, leur régulation et leur rôle.

Le métabolisme des mannityl-opines et de leurs précurseurs y est abordé en détail. Enfin, est développé dans ce chapitre l'état des connaissances structurales et mécanistiques sur les transporteurs ABC chez les bactéries à coloration de Gram négative et plus particulièrement sur les PBP.

Les chapitres 2, 3 et 4 décrivent les résultats obtenus dans l'étude structurale et biochimique des PBP impliquées dans le transport des mannityl-opines et de la DFG chez les souches C58 et B6. Ils sont présentés sous forme d'articles en préparation ou en soumission. Les résultats obtenus et les perspectives qu'ils offrent sont discutés dans le chapitre 5.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* : AGENT ÉTIOLOGIQUE DE LA GALLE DU COLLET

1.1.1 LE GENRE *AGROBACTERIUM*

1.1.1.1 Caractéristiques

Les bactéries du genre *Agrobacterium* (Figure 1) sont des alpha-protéobactéries telluriques appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Cette famille comporte également les bactéries du genre *Rhizobium*, connues pour la relation symbiotique qu'elles entretiennent avec des plantes légumineuses, au sein de nodosités, qui leur permettent de fixer l'azote atmosphérique.

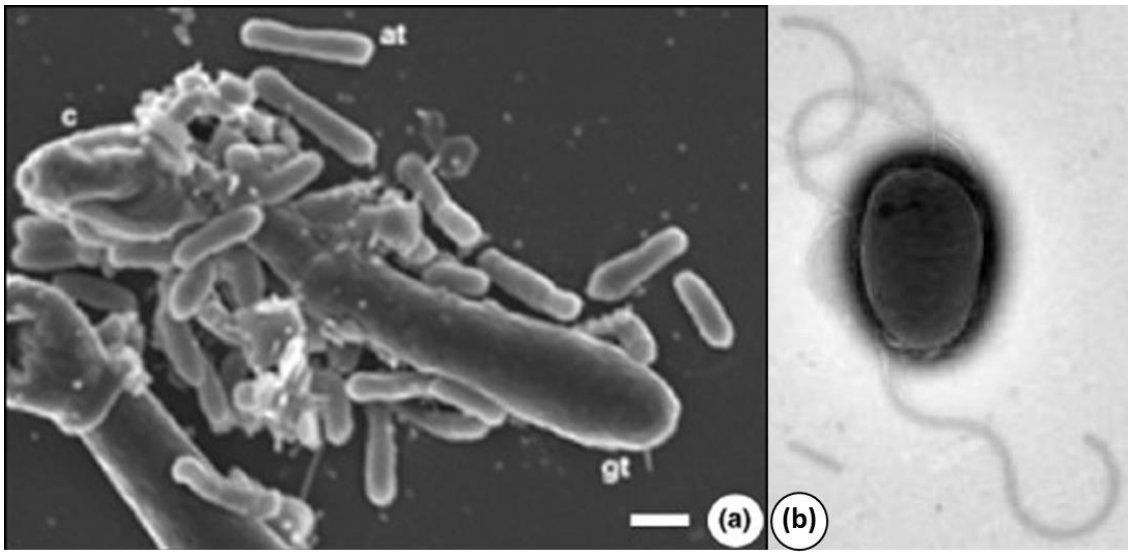


Figure 1 : *Agrobacterium tumefaciens.* (a) Image de microscopie électronique à champ d'une cellule hôte attaquée par *A. tumefaciens* (Duarte *et al.* 2007). (b) Image d'une cellule d'*A. tumefaciens* avec pili obtenue par microscopie électronique à transmission (J. Marion, Plate-forme microscopie I2BC, Gif-sur-Yvette).

Le genre *Agrobacterium* regroupe différentes espèces de bactéries, majoritairement saprophytes et non pathogènes. Certaines espèces sont cependant des phytopathogènes lorsqu'elles possèdent des éléments génétiques déterminant la virulence.

Les bactéries du genre *Agrobacterium* (ou agrobactéries) sont des bacilles d'une taille de l'ordre du micromètre, possédant des flagelles leur conférant une certaine mobilité dans leur milieu. Les agrobactéries sont des aérobies stricts, même si certaines peuvent

utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons, et synthétisent une catalase. Leur température optimale de croissance se situe entre 25 et 28°C.

1.1.1.2 Taxonomie

Le genre *Agrobacterium* a tout d'abord été décomposé en six espèces, en fonction de la pathogénie des bactéries (Young 2008). *Agrobacterium tumefaciens* a été décrite comme responsable de la galle du collet, *Agrobacterium rhizogenes* comme responsable du chevelu racinaire, *Agrobacterium vitis* comme responsable d'une galle du collet spécifique de la vigne, appelée broussin de vigne, *Agrobacterium rubi*, comme initiant la formation de tumeurs sur les tiges des plantes du genre *Rubus*, *Agrobacterium larrymorrei*, comme induisant la formation de tumeurs chez le figuier, et *Agrobacterium radiobacter*, comme une espèce non pathogène.

Les agrobactéries ont également été classées en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques, en trois groupes taxonomiques, ou biovars (Kersters and De Ley 1984). Le biovar 1 regroupe les souches d'*A. tumefaciens*, dont celles qui sont virulentes et induisent l'apparition de la galle du collet. Le biovar 2, renommé *Rhizobium rhizogenes* au lieu d'*Agrobacterium rhizogenes* est composé des souches à l'origine de l'apparition du chevelu racinaire. Le biovar 3 ne contient que les souches d'*Agrobacterium vitis*. Plusieurs autres classifications en biovars ont également été proposées, en fonction de la virulence ou du génome de chaque souche.

Plus récemment, les souches du genre *Agrobacterium* ont été classées en 10 groupes génomiques (G1 à G9 et G13), à partir des différences génomiques obtenues par des hybridations ADN-ADN et par une analyse du polymorphisme de longueurs des fragments amplifiés (ALFP). Cette classification tend à définir *A. tumefaciens* comme un complexe d'espèces plutôt que comme une espèce bactérienne à part entière (Popoff *et al.* 1970; Mougel *et al.* 2002). Une classification basée sur le polymorphisme du gène ubiquitaire *recA* a permis d'obtenir une classification plus fine (Figure 2) (Costechareyre *et al.* 2010), à la suite de l'analyse de 138 souches, et a confirmé la classification en biovars. La souche C58 qui est une des plus utilisées en laboratoire appartient au biovar 1 et au groupe G8 tandis que la souche B6 qui m'intéresse aussi pour mon travail de thèse fait partie du biovar 1 et du groupe G4.

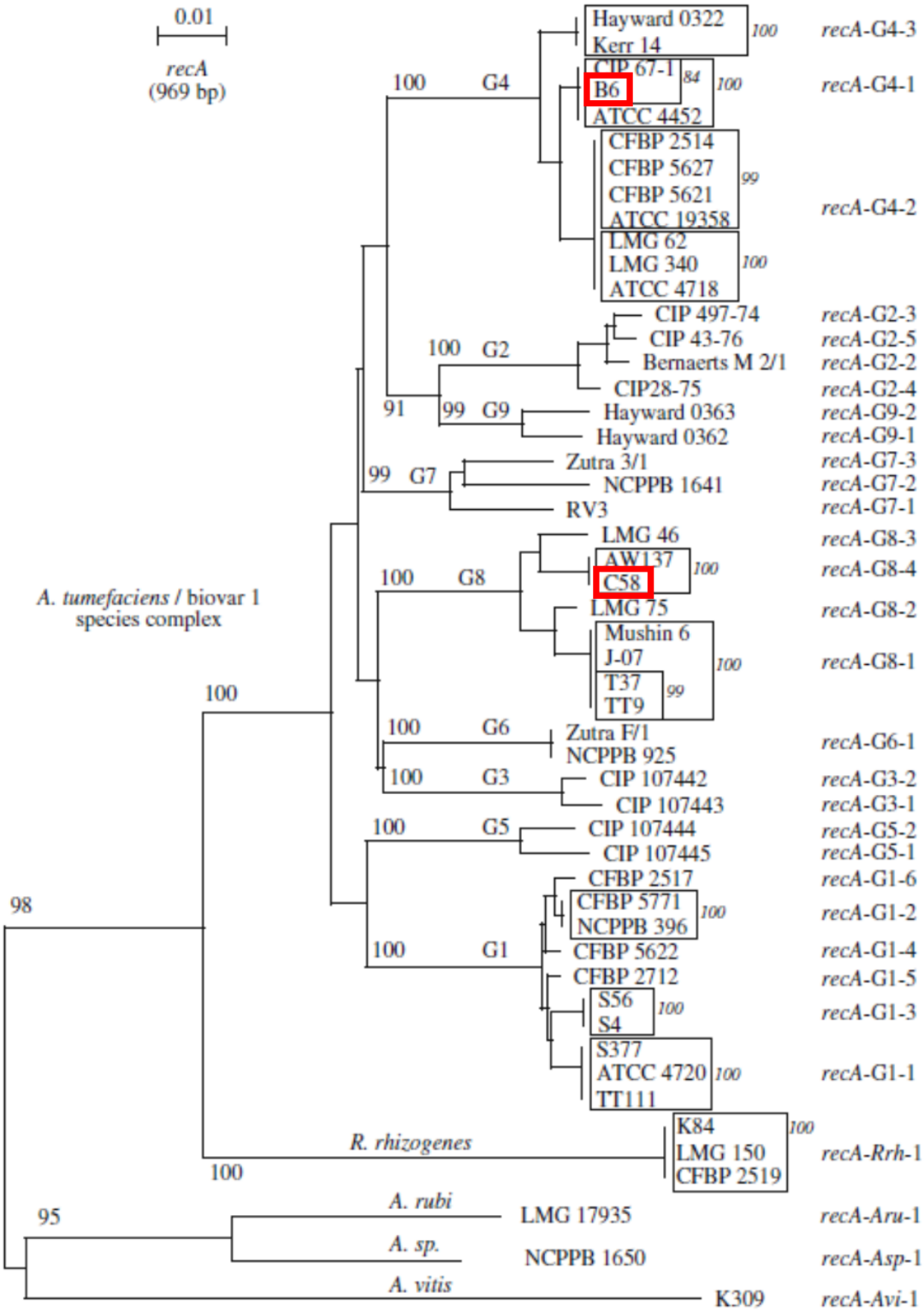


Figure 2 : Arbre phylogénétique partiel du genre Agrobacterium. A partir de la comparaison de séquences du gène recA, ubiquitaire, et de données phylogénétiques AFLP, les souches bactériennes sont classées en 3 biovars. Le biovar 1 est composé de 10 groupes génomiques. Les souches C58 et B6 sont encadrées en rouge. Extrait de Costechareyre et al, 2010.

1.1.1.3 Génomes des souches C58 et B6

Les données génétiques regroupant différentes souches d'*A. tumefaciens* sont disponibles sur le site internet :

https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php

1.1.1.3.1 Agrobacterium tumefaciens C58

La séquence du génome de la souche *A. tumefaciens* C58 a été intégralement déterminée en 2001 (Goodner *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001) et est composée de quatre éléments génétiques : un chromosome circulaire d'environ 2,8 Mb, un chromosome linéaire de 2 Mb, un plasmide At de 543 kb et un plasmide de virulence Tumor inducing (pTi) de 214 kb (Figure 3).

Le chromosome circulaire contient 2865 gènes. Il possède une origine de réplication semblable à celles des chromosomes bactériens. Le chromosome linéaire contient 1924 gènes et possède en revanche une origine de réplication semblable à celles retrouvées sur les plasmides. L'hypothèse avancée pour expliquer cette différence est que le chromosome linéaire a une origine plasmidique et que certains éléments du chromosome circulaire s'y sont dupliqués ou transférés (Goodner *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001).

Le plasmide At (pour *Agrobacterium tumefaciens*) regroupe 617 gènes, dont aucun n'est indispensable à la survie de la bactérie. Cependant, un grand nombre d'entre eux codent pour des systèmes de transport et d'utilisation de molécules nutritives spécifiques, ce qui confère un avantage adaptatif à la souche C58 dans des niches écologiques particulières. Certains d'entre eux faciliteraient aussi l'assimilation de nutriments lorsque la bactérie est dans le sol. Le plasmide pAt possède également tous les gènes nécessaires à sa conjugaison (Chen *et al.* 2002). Il n'est pas nécessaire au caractère pathogène de la bactérie, entièrement conféré par le plasmide Ti, mais il jouerait un rôle dans l'attachement de la bactérie aux cellules de plantes, ainsi que dans la taille des tumeurs induites. Cependant, les mécanismes de ces effets n'ont pas encore été caractérisés (Nair, Liu and Binns 2003; Matthysse, Jaeckel and Jeter 2008; Morton *et al.* 2013; Platt *et al.* 2014). Ce plasmide est retrouvé dans la majorité des souches d'*A. tumefaciens* isolées, qu'elles soient virulentes ou non (Lassalle *et al.* 2011).

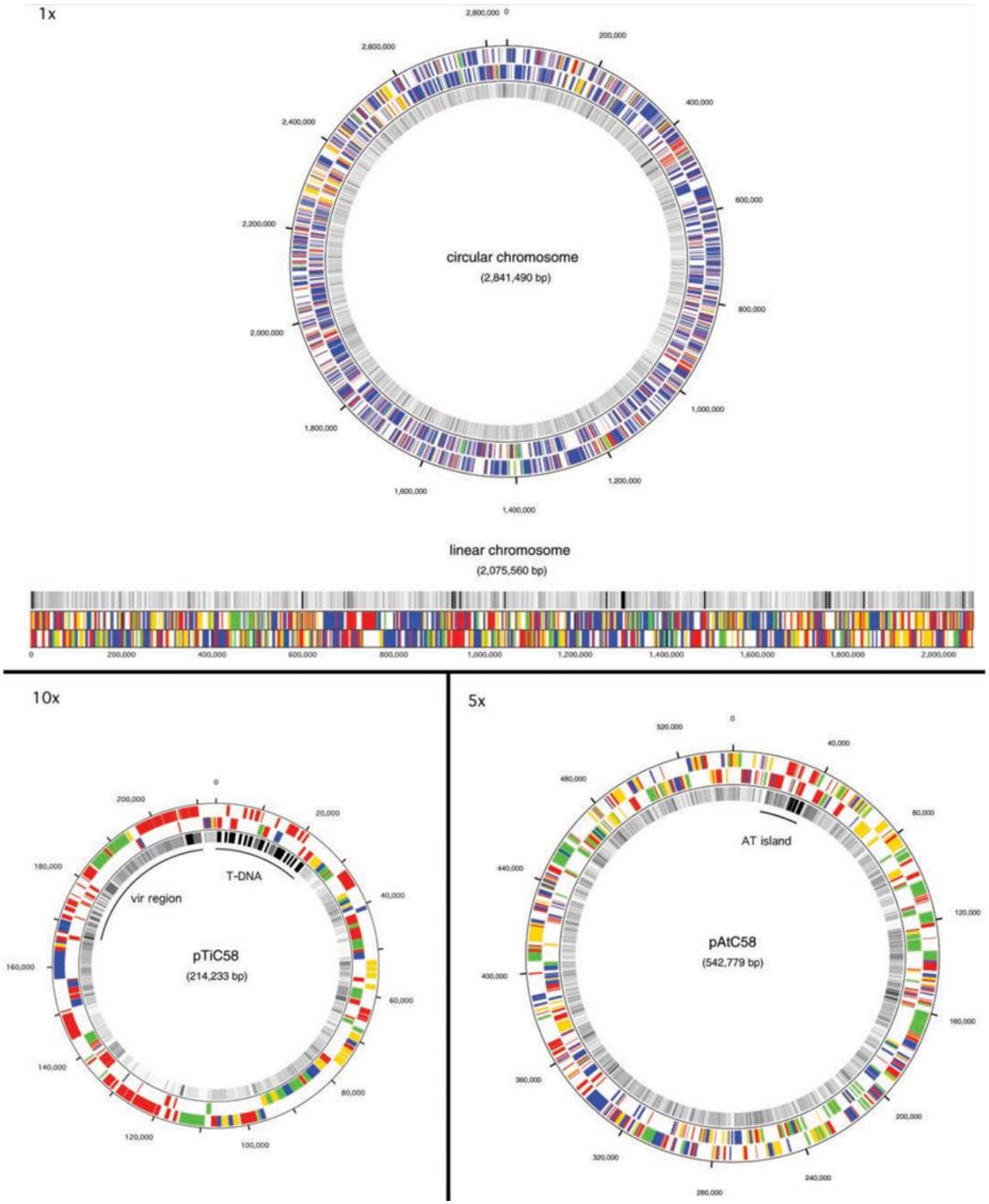


Figure 3 : Structure du génome *d'A. tumefaciens* C58. Représentation schématique du génome des quatre réplicons (5,67 Mb) : chromosome circulaire (2865 gènes sur 2,8 Mb), chromosome linéaire (1924 gènes sur 2 Mb), plasmide At (617 gènes sur 543kb) et plasmide Ti (233 gènes sur 214 kb). Les plasmides AtC58 et TiC58 sont représentés à échelle proportionnelle (x5 et x10 respectivement). Figure de Wood et al., 2001.

Le plasmide Ti comporte 233 gènes, et n'est pas, lui non plus, indispensable à la survie de la bactérie. Il est en revanche responsable de son caractère pathogène,

notamment à cause de la présence du fragment plasmidique appelé ADN-T (ADN transféré) transféré dans le génome de la cellule végétale lors de l'infection. Le pTi comprend également les gènes *vir*, codant pour les protéines Vir, permettant, entre autres, le transfert de cet ADN-T. Ce phénomène de transfert entre domaines du vivant est unique aux agrobactéries (Goodner *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001). Le pTi possède aussi les gènes du métabolisme de composés nutritifs spécifiques, appelés opines, qui sont produits par les cellules végétales ayant intégré l'ADN-T, puis transportés et utilisés par la bactérie. Enfin, le pTi possède les systèmes nécessaires à la communication bactérienne médiée par les signaux *quorum sensing*, les gènes *traI* et *traR*, ainsi que les régulons *tra* et *trb* permettant sa conjugaison.

1.1.1.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* B6

La séquence du génome de la souche *A. tumefaciens* B6 a été déterminée en 2014, et est composée de quatre éléments génétiques comparables à ceux de C58 : un chromosome circulaire d'environ 2,9 Mb, un chromosome linéaire de près de 2,1 Mb, un pAt de 665 kB et un pTi de 194 kb.

Selon l'annotation automatique, il y aurait près de 2966 gènes sur le chromosome circulaire, environ 1960 sur le chromosome linéaire, 783 sur le pAt et 192 sur le pTi.

Les plasmides At et Ti de B6 ont une structure génique différente de celle de C58. Plusieurs gènes présents sur les uns sont absents sur les autres et certains opérons sont organisés de manière différente. Le pTiB6 a deux fragments d'ADN-T au lieu d'un, appelés ADN-T_L pour « left », contenant les gènes codant la synthèse des hormones de plantes et celle de l'opine octopine, et ADN-T_R pour « right » contenant les gènes codant la synthèse des mannityl-opines (Dessaux *et al.* 1998).

1.1.1.4 Quorum sensing

Le quorum sensing est un type de communication intercellulaire qui permet aux bactéries d'une même population de synchroniser l'expression de certains de leurs gènes en fonction de leur densité. Il s'agit pour les bactéries d'un comportement coordonné parfois essentiel pour leur survie, et souvent pour leur adaptation à certaines conditions environnementales ou leur virulence. Le système est basé sur la production et la perception d'une ou plusieurs molécules signal appelées auto-inducteur. Lorsque la densité de population est faible, cette molécule n'est pas produite en quantité suffisante dans le milieu

pour être perceptible par les membres de la population bactérienne. En revanche, la multiplication cellulaire dans des conditions environnementales favorables entraine une augmentation de la concentration de l'auto-inducteur, qui devient alors suffisante dans le milieu pour dépasser un seuil critique de détection *via* une liaison à des facteurs de transcription protéiques spécifiques.

Ce mécanisme de régulation génique est largement répandu chez les bactéries, y compris chez *Agrobacterium*, et s'effectue toujours selon le même modèle avec des variations propres à chaque espèce.

1.1.2 LA GALLE DU COLLET

1.1.2.1 Description générale

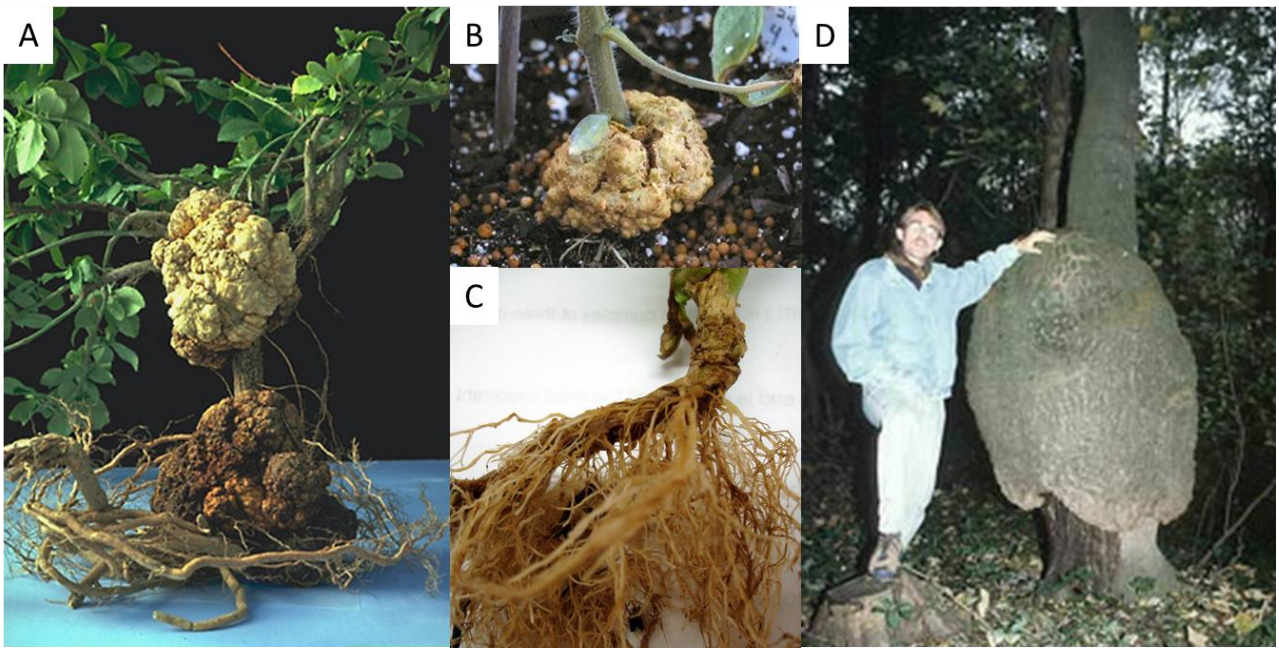


Figure 4 : Exemples de tumeurs provoquées par le genre *Agrobacterium*. A : Deux tumeurs sur un plant d'euonymus (Nester 2008). B : Galle sur un plant de tomate, photo de la Florida Division of Plant Industry. C : Chevelu racinaire chez le tabac, image issue du site internet https://www.cals.ncsu.edu. D : Tumeur de grande taille sur un frêne, image issue de http://www.genomenewsnetwork.org.

La galle du collet est une maladie, connue depuis l'antiquité (Tempé 1987), infectant une large gamme de plante. Elle est répandue partout dans le monde, bien que rare en zones tropicales et subtropicales. Elle se caractérise par la formation d'excroissances tissulaires, appelées galles ou tumeurs végétales, au niveau du collet (entre le système racinaire et la tige, Figure 4). Ces galles peuvent aussi apparaître sur les racines et, plus rarement, sur les parties aériennes de la plante (tige, feuilles). La taille et la couleur des tumeurs varient en fonction de l'espèce infectée, de la partie de la plante infectée et au

cours du temps. En vieillissant, les galles grossissent, brunissent, se lignifient et finissent par craqueler, permettant à d'autres microorganismes pathogènes ou opportunistes d'infecter la plante, ce qui peut engendrer son dépérissement.

La galle du collet a été observée sur 160 espèces différentes et a le potentiel d'affecter plus de 640 espèces réparties dans 93 familles (De Cleene and De Ley 1976). Un grand nombre d'entre elles présentent un intérêt agronomique ou horticultural, comme les plantes de la famille des *Rosaceae*, dont font partie le pommier, l'amandier ou encore le framboisier. Par conséquent, d'importantes pertes économiques sont associées à cette maladie, de l'ordre de 10 à 30% des plants pouvant être invendables notamment dans les pépinières. En effet, lorsqu'une plante est touchée par la galle du collet, elle s'en trouve fragilisée et son développement et son rendement diminuent significativement. Les plantes touchées appartiennent en grande majorité à la famille des dicotylédones mais les plantes monocotylédones peuvent aussi être infectées (Hiei, Ishida and Komari 2014).

L'apparition de cette maladie est favorisée par la présence de blessures causées par des chocs mécaniques ou climatiques (coup de bêche, gel, grêle). Ces blessures servent de point d'entrée pour *A. tumefaciens* et c'est à partir d'elles que les galles se développent.

1.1.2.2 Cycle d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le mécanisme infectieux par lequel les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*, c'est-à-dire celles qui possèdent un plasmide pTi, induisent l'apparition d'une tumeur met en jeu un processus de transgénèse. Ce mécanisme est également à l'origine de la formation du chevelu racinaire et des broussins de vigne induits par *Rhizobium rhizogenes* et *A. vitis*. A ce jour, ce sont les seuls exemples de transfert naturel d'information génétique entre bactéries et eucaryotes. Il a rapidement été utilisé en ingénierie génétique, notamment pour la mise au point de plantes transgéniques.

Le cycle infectieux d'*A. tumefaciens* se décompose en trois phases : (1) reconnaissance et attachement de la bactérie aux cellules de la plante hôte, (2) transfert et intégration du fragment ADN-T du plasmide de virulence dans le génome des cellules végétales infectées et (3) expression des gènes portés par l'ADN-T (Figure 5). Ce processus aboutit d'une part à la formation « physique » des tumeurs et d'autre part à la production par la plante des nutriments spécifiques pour les bactéries vivant dans les tumeurs en

détournant les voies métaboliques des cellules infectées. Les tumeurs servent donc de niche écologique pour la bactérie.

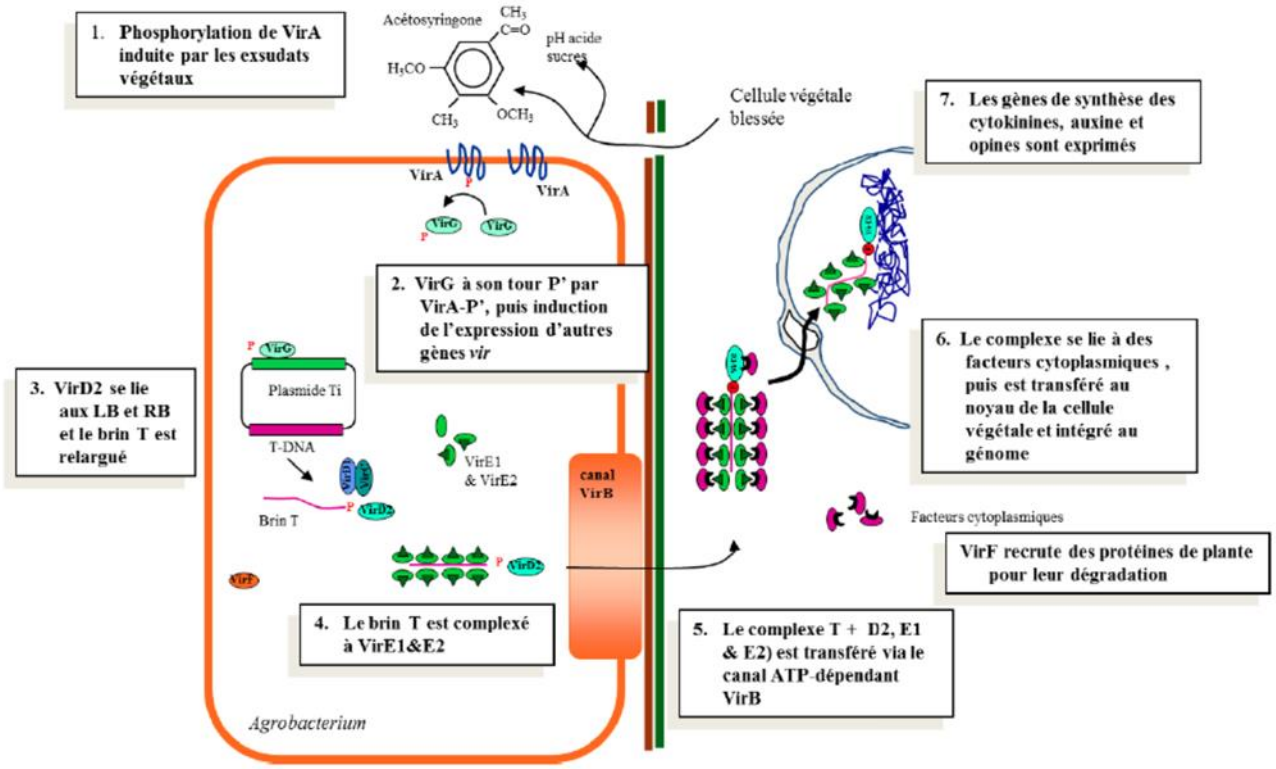


Figure 5 : Chronologie de l'infection de la cellule par *A. tumefaciens* et transfert de l'information génétique portée par l'ADN-T. Adapté de Michel Chalot, Université de Franche-Comté.

1.1.2.2.1 Reconnaissance et attachement à la plante

L'établissement du cycle infectieux par lequel *A. tumefaciens* induit la formation de tumeurs chez son hôte trouve son origine au niveau des blessures de la plante. Cette dernière libère dans la rhizosphère diverses substances, notamment des monosaccharides et des composés phénoliques, à caractère normalement bactériostatiques, voire antibiotiques. Ces composés sont cependant des chimio-attractants pour *A. tumefaciens* vers lesquels cette bactérie se déplace, à l'aide de ses flagelles, en suivant un gradient de concentration croissant (Brencic and Winans 2005).

Une fois la bactérie recrutée au niveau de la blessure, un contact physique avec son hôte est nécessaire pour assurer le transfert de l'ADN-T. Ce contact fait intervenir plusieurs protéines codées par des gènes chromosomiques telles que ChvA, ChvB et ExoC (Cangelosi *et al.* 1987), responsables de la synthèse et de l'excrétion de polysaccharides de type β-1-2-glucane. Ces polysaccharides interagissent avec des molécules de la paroi végétale, telle que la vitronectine connue pour être impliquée dans le maintien de la

structure et dans la cohésion des cellules de la paroi, ce qui permet l'attachement de la bactérie aux cellules de la plante.

1.1.2.2.2 Transfection et intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante

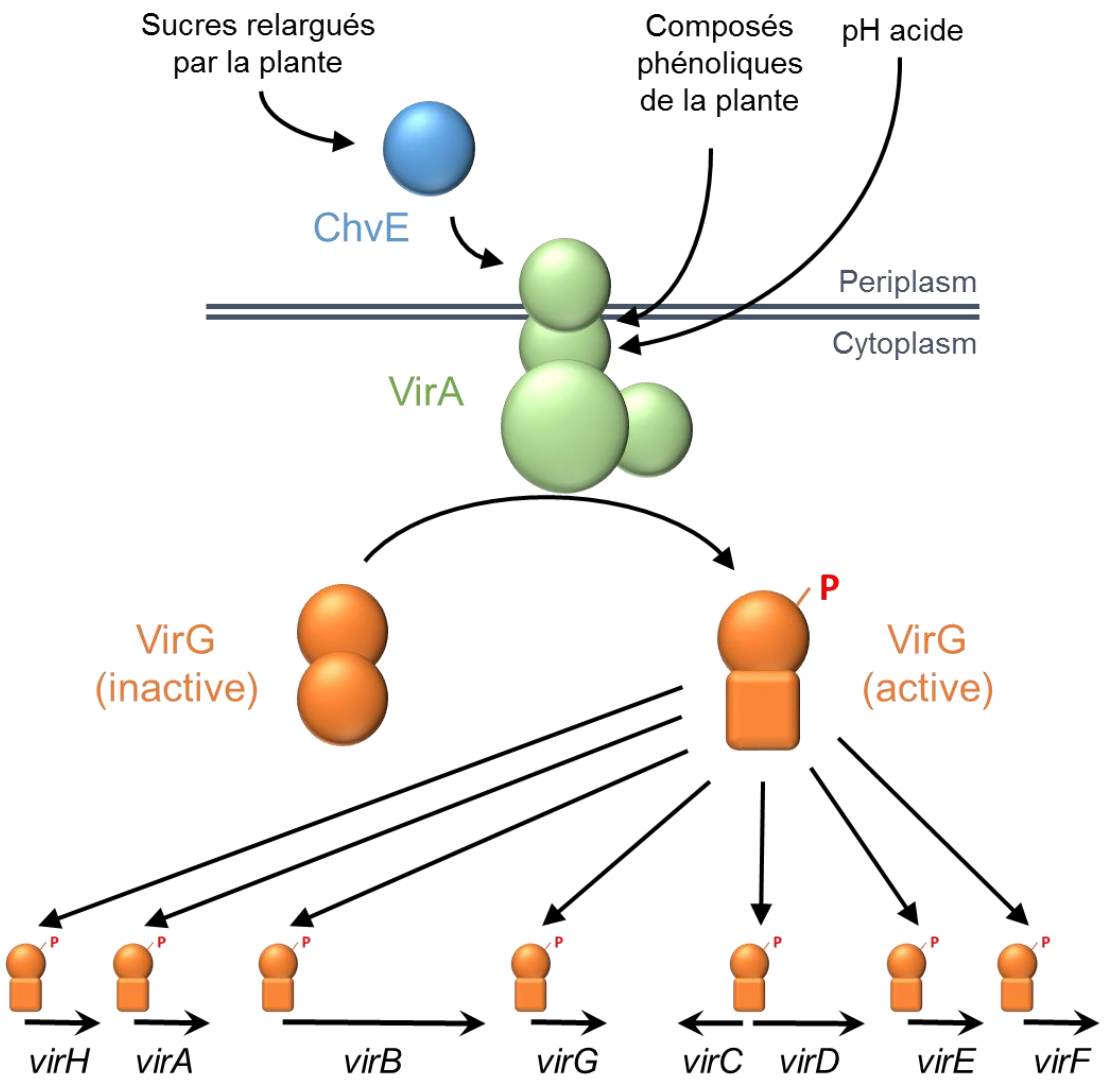


Figure 6 : La régulation des gènes de virulence par le système VirA/VirG et ChvE. VirA est une histidine kinase transmembranaire qui détecte les composés phénoliques, les sucres et l'acidité produits par la plante. ChvE est une protéine périplasmique fixant des sucres qui établit un contact avec la partie périplasmique de VirA, ce qui accroit son activité. VirA phosphoryle le régulateur VirG, qui active alors la transcription des gènes vir. Extrait de Brencic and Winans, 2005.

La deuxième partie du processus infectieux est initiée par deux protéines Vir (VirA et VirG), dont les déterminants se situent sur la partie non transférée du pTi, et par le système ChvG-ChvI et la protéine périplasmique ChvE, codés par des gènes chromosomiques. L'acidité du milieu est détectée par le système ChvG-ChvI qui initie la transcription du régulateur transcriptionnel VirG. Dans le même temps, lorsque ChvE fixe des sucres de la plante, elle interagit avec le récepteur transmembranaire VirA, et augmente la sensibilité de

ce dernier aux composés phénoliques (ex. acetosyringone et ferulate) de la plante et au bas pH (entre 5 et 5.5), ce qui permet son activation par autophosphorylation. Une fois activée, la partie cytoplasmique de VirA phosphoryle VirG qui se fixe alors sur les régions promotrices des gènes *vir* et permet leur transcription (Figure 6) (Brencic and Winans 2005).

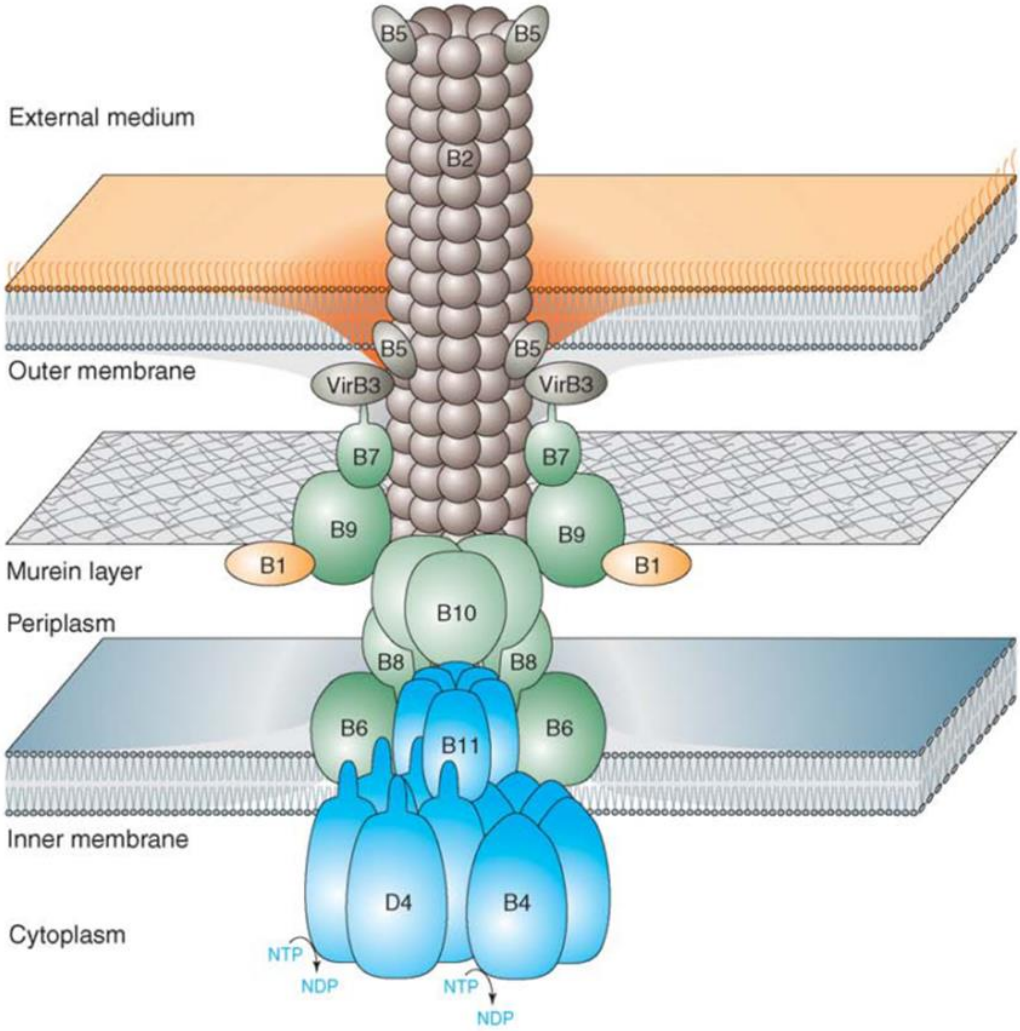


Figure 7 : Modèle du complexe protéique SST4 permettant le transfert du brin-T du cytoplasme de la bactérie à celui de la cellule-hôte. Extrait de Backert and Meyer, 2006.

Une fois les gènes *vir* activés et un contact stable établi avec l'hôte, la bactérie transfère son ADN-T dans le noyau des cellules végétales, où ce dernier s'intègre dans leur génome. Ce processus est mené à bien par les protéines VirB, VirC, VirD, VirE et VirF, qui assurent chacune une fonction bien définie. Tout d'abord, les endonucléases spécifiques VirD1 et VirD2 excisent le fragment ADN-T du pTi de la manière suivante : VirD1 assure la séparation des deux brins de l'ADN-T grâce à son activité hélicase, tandis que VirD2 clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions bordant ce fragment. Après l'excision, alors que le pTi est régénéré, VirD2 reste fixée de

manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN-T (Gelvin 2003). Le complexe VirD2-ADN-T formé, appelé aussi brin-T, peut ensuite être transféré dans la plante hôte grâce à une structure protéique particulière formant un canal entre la bactérie et la cellule végétale. Cette structure correspond à un système de sécrétion bactérien de type IV ou SST4 (Christie and Cascales 2005). Elle est formée de l'assemblage de 12 protéines : VirB1 à VirB11 et VirD4 (Figure 7).

Ce complexe protéique est organisé en trois sous-groupes. Le premier groupe est formé par les protéines à activité ATPasique VirB4, VirB11 et VirD4, qui permettent l'apport énergétique nécessaire à l'assemblage du complexe SST4 et au transfert du brin-T. Le second groupe est composé des protéines VirB6 à VirB10 et constitue le canal de translocation traversant les membranes bactériennes. Le troisième groupe est constitué d'oligomères de la piline VirB2, composante principale du pilus extracellulaire, et des protéines VirB5 et VirB7, probablement impliquées dans le contact entre la bactérie et la cellule végétale (Backert and Meyer 2006)(Figure 7). Ce système permet le passage du brin-T au travers des membranes bactériennes, de la paroi végétale et de la membrane de la cellule végétale pour arriver dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il permet également le transport de quatre autres protéines effectrices, les protéines VirE2, VirE3, VirF et VirD5, en lien avec l'existence d'une séquence consensus dans leur partie C-terminale requise pour leur translocation (Vergunst *et al.* 2005).

Les protéines VirE2 recouvrent l'ADN-T pour le protéger de la dégradation par des nucléases endogènes (Gelvin 1998), formant ainsi un complexe brin-T-VirE2 appelé le complexe-T. Cependant, aucune donnée expérimentale ne certifie que ce complexe est formé dans le cytoplasme de la cellule végétale et la possibilité qu'il soit formé avant ou pendant la translocation n'est pas à exclure.

Le complexe-T est ensuite dirigé vers le noyau de la cellule hôte grâce aux séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) des protéines VirD2 et VirE2. Plus précisément, VirD2 interagit avec des importines α et des cyclophilines endogènes (Howard *et al.* 1992; Ballas and Citovsky 1997) qui facilitent son entrée dans le noyau, et par conséquent celle du complexe-T. VirE2 quant à elle, interagit, entre autres, avec l'effecteur protéique VIP1 (VirE2-Interacting Protein) qui, une fois activé par phosphorylation, est recruté dans le noyau où il transporte le complexe VirE2-ADN-T (Djamei *et al.* 2007) (Figure 8).

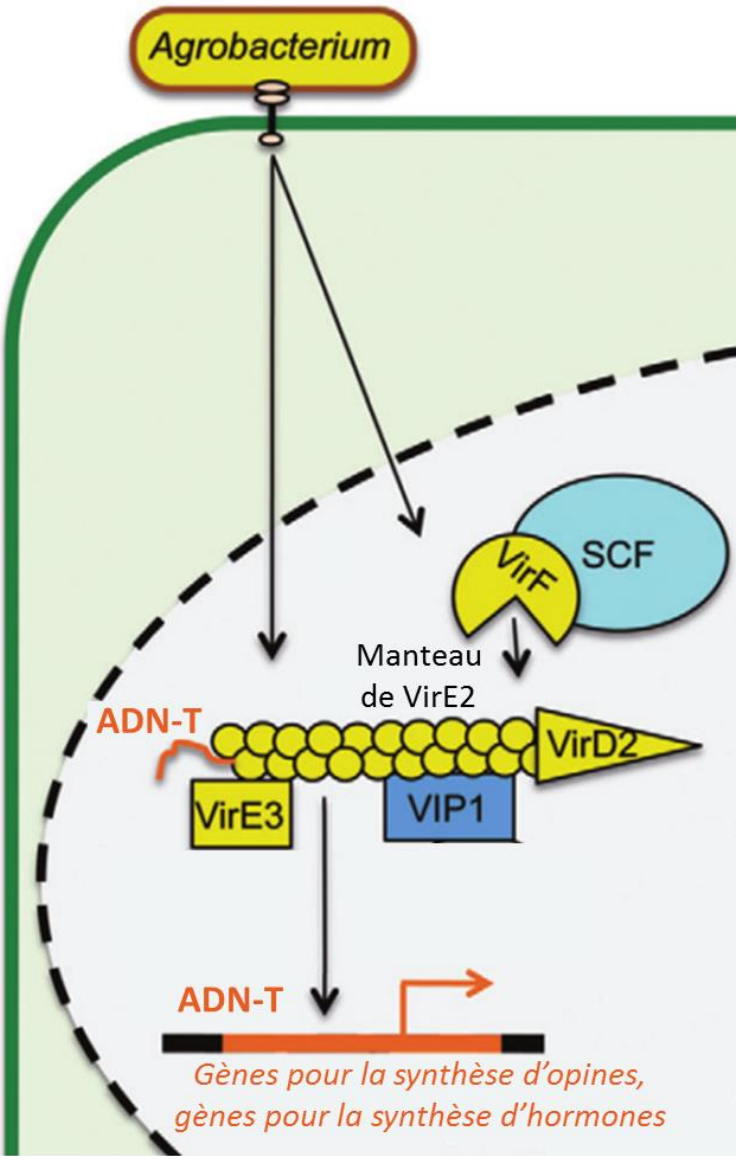


Figure 8 : Mécanisme d'intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale et les protéines impliquées dans ce processus. Une fois le complexe-T dans le cytosol de la cellule végétale, VirE2 interagit avec le facteur endogène VIP1, et avec VirE3, une protéine mimant VIP1. Grâce aux séquences NLS de VirD2, VirE3 et VIP1, le complexe peut être transporté dans le noyau, où VIP1 permet son interaction avec la chromatine. De son côté, VirF détourne le complexe ubiquitine ligase SCF afin de permettre l'ubiquitinylation de VirE2 et VIP1 pour les adresser au protéasome. L'ADN-T libéré est ensuite intégré dans le génome de la plante. Adapté de Bierne & Cossart 2012.

Une fois dans le noyau, l'ADN-T s'insère de manière aléatoire dans le génome de l'hôte, avec cependant une préférence pour les régions transcrites actives de la chromatine (Brunaud *et al.* 2002; Szabados *et al.* 2002; Li *et al.* 2006). Le mécanisme d'insertion reste peu clair, mais deux modèles d'intégration possibles, non exclusifs l'un de l'autre, ont été proposés. Le premier repose sur une recombinaison entre l'ADN-T simple brin et les régions du génome de la plante pour lesquelles il présente une micro-homologie (Tinland and Hohn 1995). Dans le deuxième modèle, l'ADN-T simple brin est d'abord répliqué pour former un

double brin qui s'intègre dans le génome par recombinaison non homologue (*non homologous end joining*) (Chilton and Que 2003). Avant ou pendant le processus d'intégration, l'ADN-T se libère des protéines VirD2 et VirE2, en utilisant la voie de dégradation protéasomale. Pour cela, la protéine d'origine bactérienne VirF interagit avec le complexe de protéines endogènes Skp1-Cullin1-F-Box (SCF) qui permet l'ubiquitinylation. VirF mime la sous-unité de reconnaissance au substrat F-Box de SCF et cible VirD2 et VirE2 afin de permettre leur ubiquitinylation et leur adressage au protéasome (Schrammeijer *et al.* 2001; Bierne and Cossart 2012).

1.1.2.2.3 Expression des gènes portés sur l'ADN-T

Une fois l'ADN-T intégré dans le génome de l'hôte, les gènes qu'il porte sont transcrits et traduits par la machinerie cellulaire de la plante hôte. Les gènes *iaaM*, *iaaH* et *ipt*, participent à la synthèse d'hormones végétales régulant la prolifération, l'élongation et la différenciation cellulaire chez les plantes (Zambryski, Tempe and Schell 1989; Veselov *et al.* 2003). Le gène *iaaM* code pour une tryptophane mono-oxygénase qui convertit le tryptophane en indole-3-acétamide (IAM) par décarboxylation oxydative. La protéine IaaH hydrolyse ensuite l'IAM en acide 3-indole-acétique (AIA), qui fait partie de la famille des auxines, phytohormones jouant un rôle essentiel dans la croissance en stimulant l'élongation des cellules végétales. Le gène *ipt* code pour une isopentényl transférase qui catalyse la synthèse d'une cytokinine (l'isopentényladénosine-5'-monophosphate) à partir d'une diméthylallyl-pyrophosphate et de l'adénosine-5'-monophosphate (AMP).

L'expression des oncogènes de l'ADN-T aboutit à une accumulation de ces phytohormones dans les cellules végétales infectées, ce qui perturbe l'équilibre hormonal et conduit à une multiplication anarchique des cellules transformées, et donc à la formation de tumeurs au site d'infection. Le développement de ces tumeurs végétales est associé à une néovascularisation des tissus, un processus qui rappelle l'angiogénèse tumoral chez l'animal (Ullrich and Aloni 2000). Ce processus se définit par la mise en place d'un réseau vasculaire sophistiqué, connecté au système circulatoire de la plante hôte, permettant l'apport en eau et en éléments nutritifs essentiels à la prolifération des cellules tumorales (Aloni, Pradel and Ullrich 1995; Ullrich and Aloni 2000). La différenciation de ces réseaux est liée à la concentration élevée en auxine ainsi qu'au déficit en oxygène de la tumeur. Ces deux facteurs stimulent l'activité de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxilique (ACC) synthase, qui permet la synthèse de l'ACC. L'ACC est ensuite dégradé par l'ACC oxydase

en éthylène, une phytohormone qui participe à la vascularisation par la restructuration du xylème (Wächter *et al.* 2003). L'éthylène stimule également la synthèse d'acide abscissique (ABA), qui limite le phénomène de transpiration dans les tumeurs et contribue au réapprovisionnement en eau et éléments nutritifs des racines vers les tumeurs en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'osmorégulation (Efetova *et al.* 2007).

Les autres gènes situés sur l'ADN-T codent pour des protéines qui permettent la synthèse de composés carbonés particuliers, appelés opines, qui servent de source nutritive spécifique pour les agrobactéries. Certaines opines sont aussi impliquées dans la dissémination des gènes de virulence. La partie II.B de ce chapitre traite des opines plus en détail.

1.2 PLASMIDES ET OPINES

1.2.1 LES DIFFÉRENTS TYPES DE PLASMIDES

1.2.1.1 La classification des plasmides Ti

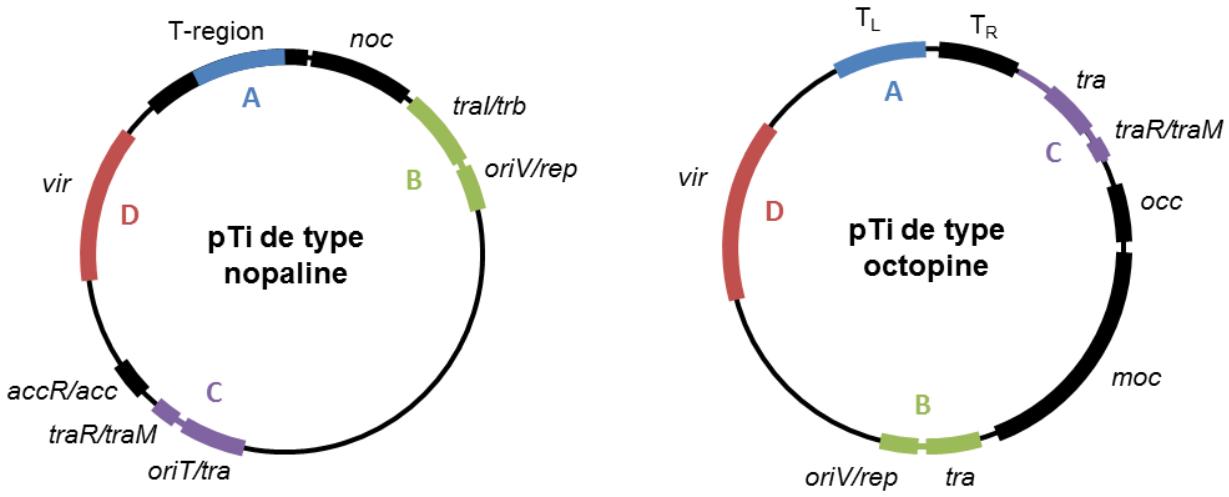


Figure 9 : Organisation fonctionnelle des plasmides Ti de type octopine et de type nopaline. Sur le pTi de type nopaline : *noc*, catabolisme de la nopaline; *traI/trb*, région de transfert ; *oriV/rep*, origine de réplication, *oriT/tra*, origine de transfert ; *traR/traM*, région de régulation du transfert ; *accR/acc*, catabolisme de l'agrocinopine ; *vir*, région de la virulence ; et T-region, ADN-T. Sur le pTi de type octopine, les annotations des régions sont les mêmes, sauf : T_L et T_R, parties gauche « Left » et droite « Right » de l'ADN-T ; *occ*, catabolisme de l'octopine, *moc*, catabolisme des mannityl-opines. Les régions A, B, C et D d'un plasmide ont une forte similarité de séquence avec les A,B,C et D correspondant de l'autre plasmide. Adapté de Dessaux *et al*, 1998.

Les plasmides Ti les mieux caractérisés portent les mêmes groupes d'opérons : une origine de réplication ORI, les gènes de virulence *vir*, l'ADN-T, constitué ou non de deux fragments (ADN-T_L et ADN-T_R) contenant les gènes permettant la synthèse d'hormones de croissance végétales ainsi que des opines, des opérons permettant le transfert conjugatif,

et enfin les gènes d'import et de catabolisme des opines synthétisées par les cellules de plante transformées (Figure 9). Cependant, les pTi diffèrent d'une souche à une autre, notamment au niveau de leurs gènes de métabolisme des opines. Leur structure globale est une structure mosaïque qui alterne des régions conservées (les gènes *vir* ou les gènes *tra*) et des régions variables (opérons du métabolisme des opines). Cette complexité rend une classification des différents pTi difficile.

Tableau 1 : Classification des plasmides Ti basées sur une opine. *Ces composés sont probablement dégradés par les bactéries possédant ces plasmides, bien que leur présence dans les tumeurs n'ait pas été vérifiée. DFG, désoxyfructosyl-glutamine ; DFGA : désoxyfructosyl-glutamate. Adapté de Dessaux *et al,* 1998.

Type de plasmide	Plasmides représentatifs	Opines synthétisées
Agropine	pTiBo542	mannityl-opines, agrocinopines C+D, leucinopine, leucinopine-lactame
Chrysopine	pTiChry5	chrysopine, DFG, DFGA, désoxyfructosyl-oxoproline
	pTiAnt4	chrysopine, DFG, DFGA, désoxyfructosyl-oxoproline, succinamopine, leucinopine
Cucumopine	pTiAB3	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
	pTiAg57	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
	pTiK305	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
	pTiK308	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
	pTiTm4	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
Lippia	pTi AB2/73	agrocinopines C+D*
Nopaline	pTiC58	nopaline, acide nopalinique, agrocinopines A+B
	pTiK27	nopaline, acide nopalinique, agrocinopines A+B
	pTiT37	nopaline, acide nopalinique, agrocinopines A+B
	pTiIIBV7	nopaline
Octopine	pTi15955	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
	pTiA6	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
	pTiA6NC	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
	pTiB6	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
	pTiR10	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
Succinamopine	pTiAT181	succinamopine, succinamopine-lactame, nopaline*
	pTiEU6	succinamopine, succinamopine-lactame, nopaline*
	pTiT10/73	succinamopine, succinamopine-lactame, nopaline*

Plus d'une vingtaine d'opines différentes ont été répertoriées et chaque pTi permet la synthèse et le catabolisme de quelques opines. Pour l'instant, les pTi ont été classés en différents types en fonction de la principale opine produite dans les tumeurs. Ainsi chez la souche C58, le plasmide de type nopaline porte les gènes de synthèse de la nopaline sur son fragment ADN-T et ceux du catabolisme de la nopaline sur sa partie non transférée. Ce

pTi possède aussi les gènes de synthèse et de catabolisme des agrocinopines A et B. Chez la souche *A. tumefaciens* B6, le pTi de type octopine possède les gènes de synthèse (sur deux fragments d'ADN-T) et de dégradation de l'octopine et des quatre mannityl-opines. Le tableau 1 montre les différents types de pTi répertoriés à ce jour avec des exemples de pTi et les opines dont ils possèdent les gènes de métabolisme.

Cette classification, qui reste en évolution, est discutable. En effet, certains pTi induisent des tumeurs qui contiennent des opines encore inconnues : par exemple, les gènes de synthèse du pTi de type *Lippia* de la souche AB2/73 n'ont pas encore été identifiés. De plus, comme il a été dit précédemment, un plasmide induit la production de plusieurs opines et il existe plusieurs combinaisons d'opines pouvant se recouper (Tableau 1). Par exemple, les plasmides de type cucumopine peuvent, comme ceux de type octopine, induire la synthèse d'octopine. Par conséquent, une classification de pTi reliée à au moins deux noms d'opine serait plus judicieux.

D'autres tentatives de classification ont été proposées. L'une d'elle a été établie sur l'incompatibilité de présence de deux pTi différents chez une même bactérie. Seulement il a été montré que cette incompatibilité dépendait des gènes *repABC*, qui sont conservés chez tous les pTi. La question d'une classification phylogénique a également été proposée, mais la structure mosaïque des pTi, résultant de plusieurs transferts horizontaux de gènes, de recombinaisons, de pertes de gènes et d'insertions de séquences au cours de l'évolution, rend une telle classification impossible (Otten, Burr and Szegedi 2008).

1.2.1.2 Les plasmides At

Peu de choses sont connues sur le plasmide At d'*Agrobacterium*. Il est décrit comme un plasmide cryptique, c'est-à-dire qu'aucun phénotype particulier n'est attribué à sa présence. Il n'est à priori pas nécessaire pour la survie de la bactérie. Sur le pAtC58, les gènes *soc* apparaissent comme importants pour l'import et la dégradation de la DFG, un composé d'Amadori qui sera décrit plus loin dans cette partie. Les gènes *blc* sont impliqués dans la dégradation des homosérines lactones, composés issu des signaux de *quorum sensing*, et dans l'assimilation de molécules produites par la plante, tels que le γ-hydroxybutirate et la γ-butyrolactone (Carlier *et al.* 2004).

Il est également possible que les gènes *att* de ce plasmide jouent un rôle dans l'attachement de la bactérie à la plante (Matthysse *et al.* 2000). Des mutants générés par

une insertion dans le gène *attC*, codant pour une protéine homologue aux Periplasmic Binding Proteins (PBP), ou dans le gène *attG*, codant pour une protéine décrite comme la partie transmembranaire d'un transporteur ABC, bloquerait à la fois la virulence et l'attachement de la bactérie, malgré la présence du pTi. Les mécanismes expliquant ces résultats surprenants sont encore inconnus (Matthysse, Jaeckel and Jeter 2008; Matthysse 2014).

Le séquençage des génomes de différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* montre que les pAt peuvent être variables d'une souche à l'autre. Les pAt des souches B6 et 15955 diffèrent en taille de celui de C58 et ne portent pas les mêmes gènes. Par exemple, l'intégralité de l'opéron *att* n'est pas conservée. En raison du manque d'annotations des gènes des différents pAt dont la séquence est connue, une classification de ces pAt en fonction des souches qui les possèdent ou des fonctions qu'ils donnent à la bactérie n'est pas possible.

1.2.2 LES OPINES

1.2.2.1 Définition et origines

La première opine fut découverte en 1927, dans du tissu musculaire de poulpe (*Octopus octopodia*), ce qui donna son nom, octopine (Morizawa 1927). D'autres molécules du même type furent par la suite découvertes dans les galles de plantes et le nom « opine » (du grec opos, « jus de plante ») leur fut attribué pour la première fois en 1977. Les opines sont des composés de faible poids moléculaire, trouvés principalement dans les tumeurs des plantes atteintes de la galle du collet, ou dans les hyperplasies des plantes atteintes du chevelu racinaire, toutes deux des maladies induites par des bactéries membres du genre *Agrobacterium*. Les opines sont aussi présentes dans les tissus de bon nombre d'invertébrés marins, où elles sont produites en condition d'anoxie ou d'hypoxie à partir du pyruvate, comme moyen alternatif à la production de lactate (Harcet, Perina and Pleše 2013). On en trouve également dans certaines plantes qui semblent avoir intégré de manière définitive un ADN-T dans leur génome, comme certaines espèces de tabac (Chen *et al.* 2014), mais aussi chez certains champignons (Fushiya *et al.* 1996). Il existe aussi une opine chez les eucaryotes supérieurs, la saccharopine, qui est un intermédiaire important dans la voie de dégradation de la lysine (Arruda *et al.* 2000).

Une cinquantaine de molécules correspondant à des opines ont été identifiées conduisant à une classification en différentes familles. Les opines chez *A. tumefaciens* sont définies comme des molécules dont la production dans des tumeurs de plantes atteintes par la galle du collet est déclenchée par *A. tumefaciens* pour subvenir à sa multiplication et promouvoir la dissémination de sa virulence (Dessaux *et al.* 1998). Toutes les opines produites dans la tumeur sont en effet utilisées comme source de carbone ou d'azote par les agrobactéries, et certaines d'entre elles, appelées opines conjugatives, jouent un rôle dans le transfert conjugatif du plasmide Ti, assurant ainsi la dissémination de la virulence.

Les opines sont classées en deux grands groupes (Figure 10). Le premier groupe est composé de dérivés d'amines secondaires issues de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un céto-acide. Il comporte la grande majorité des opines comme l'octopine, la nopaline, l'agropine et leurs dérivés. Le second groupe est constitué de phosphodiesters de sucres, appelées agrocinopines.

1.2.2.2 Les familles d'opines chez *Agrobacterium*

1.2.2.2.1 Les opines composées d'une partie acide aminé

1.2.2.2.1.1 Famille de l'octopine

L'octopine, initialement découverte dans le muscle de poulpe, a été purifiée à partir d'extraits de galles de plante par Morel et Lioret en 1956 avant d'être identifiée comme telle en 1964 (Ménagé and Morel 1964). Cette opine provient de la condensation enzymatique de pyruvate et d'arginine dans les plantes transformées par des souches de type octopine, comme B6 ou 15955. Elle est importante pour ces souches car il s'agit d'une opine conjugative

D'autres opines dérivées de l'octopine, trouvées dans les galles induites par les agrobactéries possédant un pTi de type octopine, font partie de cette famille (Figure 10A). Ces opines sont la lysopine, l'acide octopinique et l'histopine, caractérisées respectivement en 1960 (Biemann *et al.* 1960), 1965 (Ménagé and Morel 1965) et 1977 chez B6 (Kemp 1977). Elles sont issues de la condensation de pyruvate et, respectivement, de lysine, d'ornithine et d'histidine, catalysée par la même enzyme (Hack and Kemp 1977).

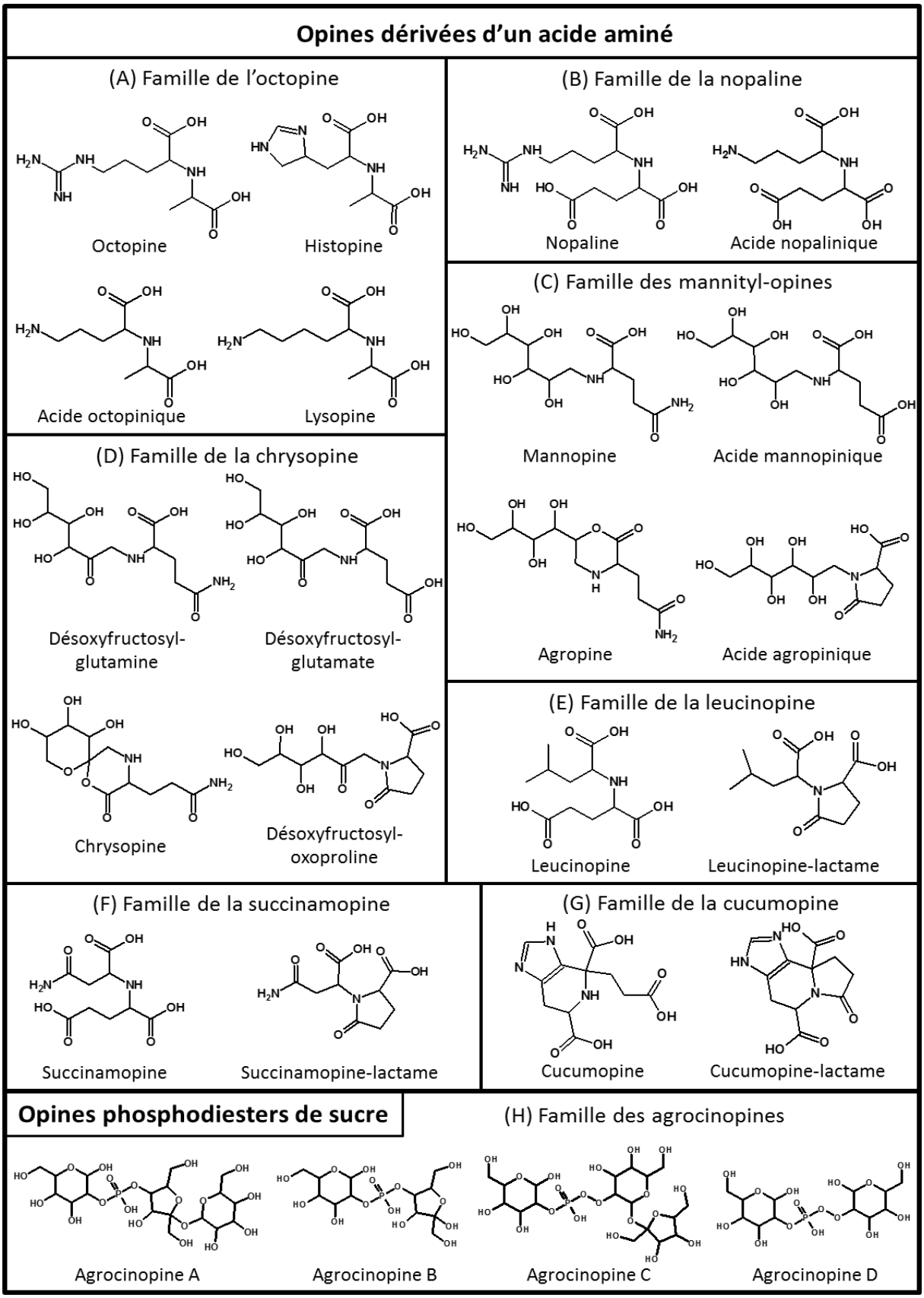


Figure 10 : Structure chimique des opines induites par le genre *Agrobacterium*. La mikimopine et la mikimopine-lactam, qui sont des stéréoisomères de la cucumopine et de la cucumopine-lactame respectivement, peuvent être classées dans la famille de la cucumopine.

1.2.2.2.1.2 Famille de la nopaline

La nopaline a également été découverte par Morel et Lioret dans des extraits de galles en 1956, mais n'a été caractérisée et nommée que 13 ans plus tard par Goldman (Goldman, Thomas and Morel 1969). A ce jour, cette opine n'est retrouvée que dans les tumeurs végétales induites par *A. tumefaciens*, et plus particulièrement par les souches possédant un pTi de type nopaline.

La nopaline est issue de la condensation enzymatique d'une arginine avec un α-cétoglutarate (Figure 10B). Elle est instable dans les tumeurs et peut prendre une forme lactamisée (c'est-à-dire une forme cyclisée par une liaison amine intramoléculaire), nommée pyronopaline (Hall, Schrimsher and Taylor 1983). La dernière opine de cette famille est l'acide nopalinique (ou ornaline), issu de la condensation d'une ornithine et d'un α-cétoglutarate.

1.2.2.2.1.3 Famille des mannityl-opines

La famille des mannityl-opines est composée de quatre membres : la mannopine, l'acide mannopinique, l'agropine, et l'acide agropinique. L'agropine a été la première découverte dans des extraits de tumeurs des souches A6, B6 et A66 en 1978 (Firmin and Fenwick 1978), suivi de l'acide agropinique, isolé des mêmes extraits en 1980 (Coxon *et al.* 1980). La première structure de l'agropine, a été établie avec un bicycle puis révisée, elle ne contient finalement qu'un seul cycle (Figure 10C). La découverte de la mannopine et de l'acide mannopinique date de 1982 (Tate *et al.* 1982), isolés à partir de tumeurs induites par la souche A281, possédant un pTi542 de type agropine.

Les mannityl-opines ont été trouvées jusqu'à présent uniquement dans les excroissances de plante induites par le genre *Agrobacterium*. Leurs gènes de synthèse, de transport et de dégradation sont présents sur les pTi de type octopine et ceux de type agropine.

La mannopine, qui est la 1-désoxymannosyl-glutamine, n'est pas issue d'une condensation entre un mannose et une glutamine et ne résulte pas d'une synthèse directe en une seule étape. Curieusement, elle est formée à partir d'un précurseur qui est aussi une opine, la DFG (ou santhopine), qui fait partie de la famille de la chrysopine, détaillée plus bas. Il en est de même pour l'acide mannopinique (un acide 1-désoxymannosyl-glutamique) dont le précurseur est le désoxyfructosyl-glutamate (DFGA). L'agropine est une forme

lactonisée de la mannopine (c'est-à-dire une forme cyclisée par estérification intramoléculaire, entre le carboxylate et l'hydroxyle du C2 de la partie sucre de la mannopine, Figure 11 haut), tandis que l'acide agropinique est une forme lactamisée de la mannopine (Figure 11 bas).

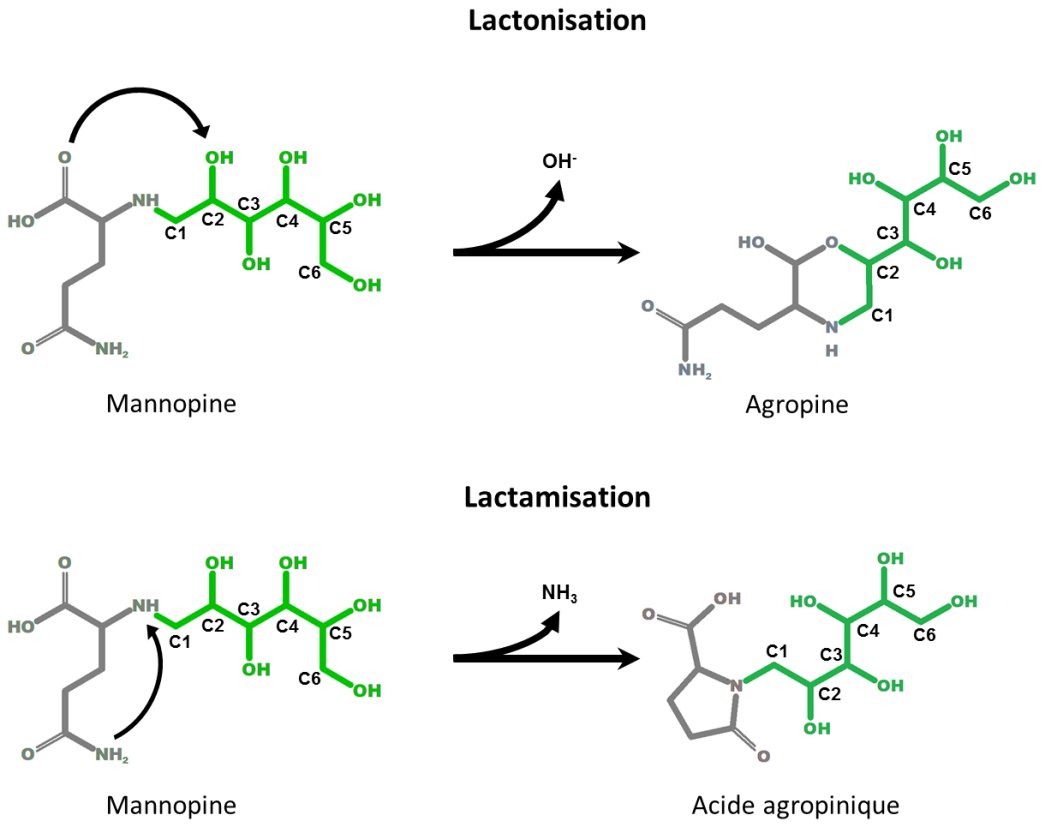


Figure 11 : Réactions simplifiées de lactonisation (haut) et de lactamisation (bas) de la mannopine. Les carbones numérotés sont ceux de la partie sucre de l'opine.

1.2.2.2.1.4 Famille de la chrysopine

Cette famille comme la famille des mannityl opines est constituée de quatre membres : la désoxy-fructosyl-glutamine (DFG) ou santhopine, le désoxy-fructosyl-glutamate (DFGA), la chrysopine et la désoxy-fructosyl-oxoproline (DFOP), produites par les plantes infectées par les souches possédant les plasmides pTiChry5 ou pTiAnt4. Elle a été caractérisée en 1995 (Chilton *et al.* 1995).

Chez les agrobactéries, la DFG est issue de la condensation de fructose et de glutamine par une conjugase, et sert d'intermédiaire pour la formation de la mannopine et de l'agropine. C'est également un composé d'Amadori, dont une description plus détaillée sera faite plus loin dans cette partie. Les autres opines de la famille de la chrysopine sont

des dérivés de la DFG. Le DFGA est issu d'une condensation enzymatique ou spontanée de glutamate avec de fructose, la chrysopine est le produit de la lactonisation de la DFG et la DFOP est une forme lactamisée de la DFG. Les structures chimiques de ces composés sont très proches des quatre mannityl-opines (Figure 10D).

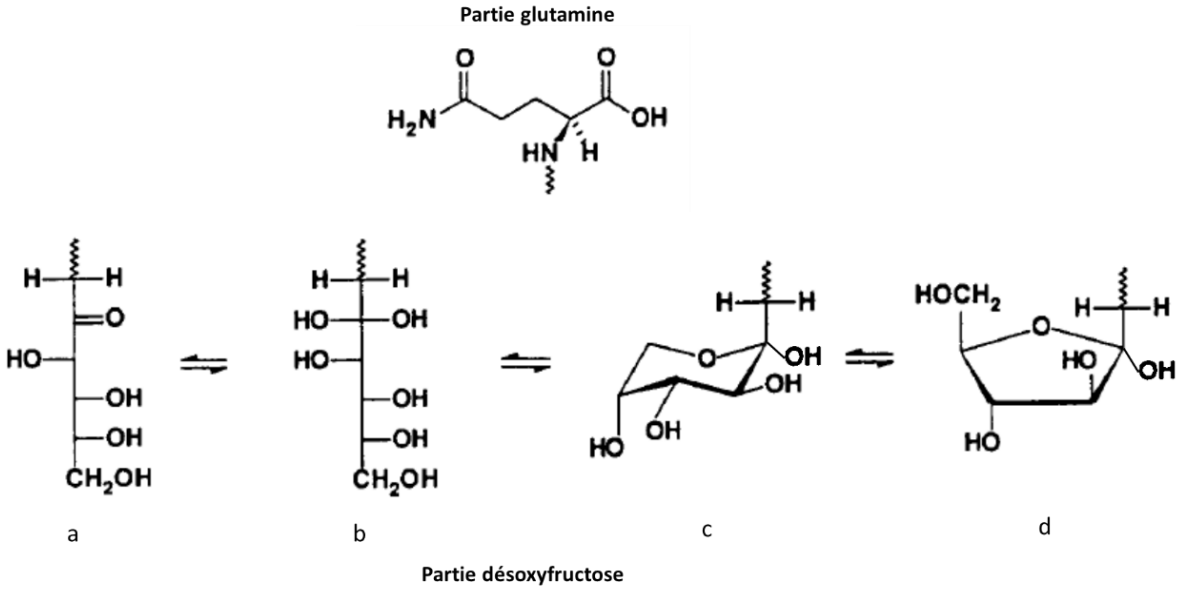


Figure 12 : Les différentes formes de la partie sucre de la DFG. Adapté de Chilton et al., 1995.

Comme le carbone 2 de sa partie sucre comporte un groupement cétone, la partie désoxyfructose de la DFG peut adopter plusieurs configurations (Chilton *et al.* 1995) : linéaire (Figure 12a et 12b), cyclisée en C6 (Figure 12c) ou cyclisée en C5 (Figure 12d).

1.2.2.2.1.5 Autres familles

Il existe d'autres familles d'opines dérivées d'acides aminés qui sont produites dans les excroissances végétales générées par les agrobactéries pathogènes. Parmi elles se trouvent les familles de la succinamopine dérivée de succinate ; de la cucumopine/mikimopine, produit d'une condensation entre histidine et α-cétoglutarate; et de la leucinopine dérivée de leucine.

La famille des leucinopines comporte la leucinopine, issue de la condensation de leucine et de α-cétoglutarate, et la leucinopine-lactame, son dérivé lactamisé (Figure 10E). Elles ont été découvertes et caractérisées en 1983 à partir d'extraits de tumeurs induites par les souches 542, 398, A2 et AT1 (Chang *et al.* 1983). Elles sont retrouvées dans les tumeurs induites par des souches de type agropine et chrysopine/succinamopine.

La famille de la succinamopine comporte la succinamopine, issue de la condensation d'asparagine avec de l'α-cétoglutarate, et la succinamopine-lactame, son dérivé lactamisé (Figure 10F). Ces deux opines ont été isolées de galle de tabac induites par les souches *A. tumefaciens* A518, A519 et AT181, et caractérisées en 1984 (Chilton *et al.* 1984). Les opines de cette famille sont produites par des souches possédant un plasmide Ti de type succinamopine et chrysopine/succinamopine.

La famille des mikimopines est retrouvée dans les hyperplasies induites par *Agrobacterium rhizogenes* NIAES1724. Elle est composée de la mikimopine, issue de la condensation de L-histidine et d'α-cétoglutarate, et de son dérivé lactamisé, la mikimopine-lactame, toute deux caractérisées en 1990 (Isogai *et al.* 1990). Le gène *mis*, codant pour la mikimopine synthase, localisé sur l'ADN-T du plasmide Ri (plasmide de virulence d'*Agrobacterium rhizogenes*) de la souche NIAES1724, est également retrouvé dans le génome de plusieurs espèces de tabac (du genre *Nicotiana*). Tout comme plusieurs autres gènes de synthèse d'opines, il est possible que son intégration dans le génome des ancêtres de ces plantes leur ait fourni un avantage évolutif, leur permettant de perdurer et de se répandre (Chen *et al.* 2014). La famille de la cucumopine comporte la cucumopine et son dérivé lactamisé, la cucumopine-lactame (Figure 10G). Elles sont des stéréoisomères de la mikimopine et de la mikimopine-lactame et ont été découvertes en 1988 (Davioud *et al.* 1988), dans les hyperplasies de plusieurs espèces de plantes. Des souches possédant un plasmide Ti de type cucumopine peuvent permettre leur production.

1.2.2.2.2 Les composés d'Amadori

Les composés d'Amadori sont des produits naturels issus d'un réarrangement spontané, appelé « réarrangement d'Amadori », d'une base de Schiff. Cette réaction est une des premières étapes de la réaction de Maillard, une chaîne de réactions impliquée dans le brunissement des composés organiques (Yaylayan and Huyghues-Despointes 1994).

Ce réarrangement a pour substrat la base de Schiff appelée glycosylamine, issue de la condensation d'un sucre réducteur, tel que le D-glucose, avec un acide aminé (Figure 13). En milieu acide, cette glycosylamine peut se réarranger en cétoamine, plus stable. La DFG et le DFGA, décrits plus haut en tant qu'opines, sont aussi issus du réarrangement des glycosylamines formées à partir de D-glucose (ou de D-mannose) et de glutamine ou de glutamate respectivement. Les cétoamines formées par ce réarrangement peuvent ensuite

subir plusieurs réactions comme la cyclisation ou la condensation pour donner des produits terminaux de glycation (ou PTG) dans la réaction de Maillard (Lin and Zheng 2010).

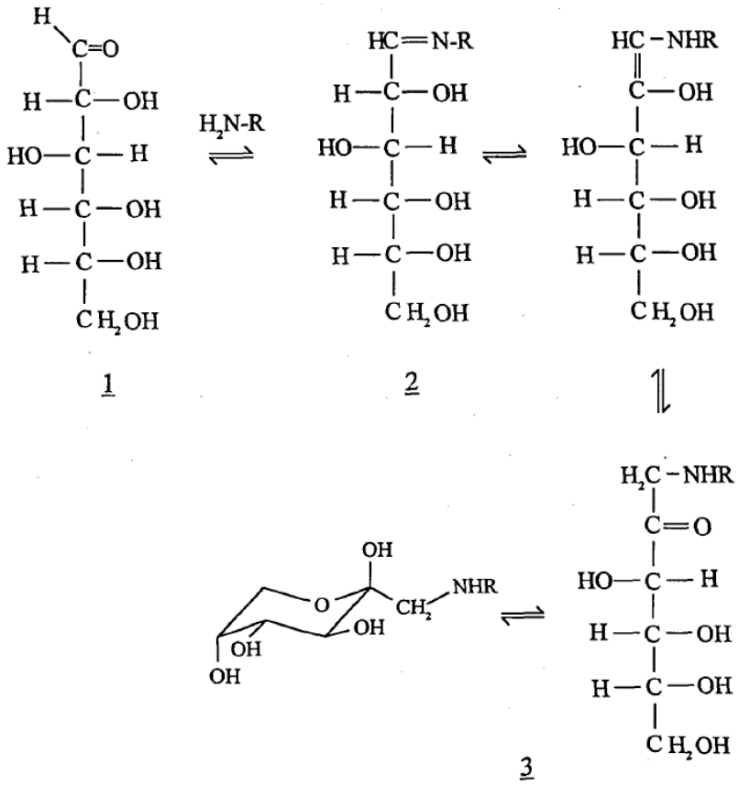


Figure 13 : Réarrangement d'Amadori. Un sucre réducteur, comme le D-glucose (1) réagit avec une amine pour donner une glycosylamine (2). Celle-ci est instable en milieu acide et se réarrange spontanément en cétoamine (3) (Yaylayan and Huyghues-Despointes 1994).

Comme des réarrangements d'Amadori se produisent dans toute matière organique à pH faible, les composé d'Amadori sont très largement répandus, et plusieurs espèces, comme les champignons du genre *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp., mais aussi plusieurs bactéries, sont capables de les assimiler (Deppe *et al.* 2011). Des enzymes spécifiques de tels composés, appelées Amadoriases, permettent d'oxyder ces composés pour obtenir un acide aminé et une glucosone. Chez *A. tumefaciens*, la protéine SocD, codée par le plasmide At a été décrite comme une Amadoriase capable de dégrader la DFG (Baek *et al.* 2003, 2005).

1.2.2.2.3 Les phosphodiesters de sucre : les agrocinopines

Les agrocinopines A, B, C et D forment une famille particulière d'opines qui sont des phosphodiesters de sucres. Elles diffèrent entre elles par la nature de l'ose phosphorylé (arabinose pour A/B et glucose pour C/D) et par la nature de la liaison phosphate entre le groupement phosphate et fructose (liaison avec l'hydroxyle du carbone 4 du fructose pour

A/B et liaison avec l'hydroxyle du carbone 2 du glucose pour C/D) (Figure 10H). Les agrocinopines B et D sont respectivement des versions plus courtes des agrocinopines A et C avec un glucose ou un fructose manquant au niveau de la partie sucrose de l'opine.

Cette famille d'opines fut découverte en 1981, à partir d'extraits de tumeurs de plants de tomates induites par la souche A208 pour les agrocinopines A et B ; ou par la souche A281 pour les C et D (Ellis and Murphy 1981). Le motif pyranose-2-phosphate partagé par les quatre agrocinopines est le motif reconnu comme inducteur conjugatif (El Sahili et al, 2015). Le gène de synthèse de ces opines, situé sur l'ADN-T, ainsi que leur gène de catabolisme sont retrouvés sur des pTi de type nopaline, pour les agrocinopines A et B, et de type agropine ou *Lippia* pour les agrocinopines C et D.

1.2.2.3 Métabolisme des opines

1.2.2.3.1 Synthèse des opines dans la plante

La plupart des opines synthases sont des conjugases, permettant la conjugaison d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un acide aminé et d'un cétoacide. Leurs gènes se trouvant sur le fragment ADN-T du pTi, la synthèse des opines est donc réalisée dans les cellules de plante. Ces gènes sont en général moins nombreux que ceux du catabolisme, et certains permettent la formation de plusieurs opines grâce à une faible spécificité pour leurs substrats (Vladimirov, Matveeva and Lutova 2015). C'est le cas pour le gène *ocs* codant pour une octopine synthase qui permet aussi la formation de l'acide octopinique, la lysopine et l'histopine.

La plupart des opines qui ne sont pas des dérivés lactames sont formées par cette simple étape de conjugaison. Elles peuvent par la suite, en fonction des conditions physico-chimiques de la cellule de plante, être lactamisées, comme par exemple la nopaline qui se convertit spontanément en pyronopaline à pH acide (Hall, Schrimsher and Taylor 1983).

La synthèse des opines de la famille des mannityl-opines est particulière car elle nécessite plusieurs étapes dans lesquelles une opine est le précurseur d'une autre opine. Elle sera détaillée dans la section 1.2.2.5.

Les agrocinopines sont elles aussi un cas particulier car l'enzyme permettant leur synthèse, l'agrocinopine synthase (acs), est une diester phosphorique hydrolase,

permettant de phosphoryler un sucre pour établir par la suite une liaison phosphodiester avec un deuxième sucre.

1.2.2.3.2 Transport et catabolisme des opines chez *A. tumefaciens*

1.2.2.3.2.1 Transport dans le cytoplasme

Les mécanismes de sécrétion des opines hors des cellules de plante sont encore mal connus. L'import dans le périplasme de la bactérie est réalisé par des porines non spécifiques. Dans le périplasme, une éventuelle interaction entre les opines et le peptidoglycane n'est pas connue.

Les opines sont ensuite transportées dans le cytoplasme par des systèmes tripartites composés d'une protéine périplasmique de liaison (PBP pour Periplasmic Binding Protein), d'une partie transmembranaire (TMD pour TransMembrane Domain) et d'une partie de liaison à un nucléotide (NBD pour Nucleotide Binding Domain). Le mécanisme de ce transport sera détaillé dans la partie 1.3.

Ces transporteurs sont codés par un opéron situé sur la partie non transférée du pTi. En général, un seul complexe de transport est nécessaire et suffisant pour la translocation des opines d'une famille complète dans le cytoplasme. Par exemple, le transporteur NocPTQM permet le passage de la nopaline, de la pyronopaline et de l'acide nopalinique à travers la membrane plasmique (Lang *et al.* 2014).

Encore une fois, les mannityl-opines font office d'exception, car un transporteur a été décrit pour chacune d'elles. Ces transporteurs seront détaillés plus loin dans ce chapitre. Leurs gènes se trouvent dans un groupe d'opérons, présent sur la partie non transférée des pTi de type octopine et agropine.

Le cas de la DFG est aussi particulier car les souches d'*A. tumefaciens* possédant un pAt comme celui de C58 sont capables de transporter ce composé comme nutriment naturel, plutôt que comme opine, car elles n'en induisent pas la production dans les cellules de plantes transformées. L'opéron responsable du transport mais aussi du catabolisme de cette opine est l'opéron *soc*. Comme la DFG est largement présente dans l'environnement, il a été proposé que le plasmide comportant cet opéron soit apparu et ait perduré pour permettre à la bactérie de métaboliser la DFG naturellement trouvée dans le sol.

1.2.2.3.2.2 Dégradation des opines

Les enzymes de dégradation des opines sont issues de gènes situés sur la partie non transférée du pTi dans la même région et souvent dans le même opéron que celui du transport des opines. Elles permettent de dégrader les opines produites par les gènes de synthèse situés sur l'ADN-T. Pour de nombreuses opines, l'enzyme en question est une opine oxidase, catalysant la décondensation de l'opine en acide aminé et sucre ou cétoacide.

Les enzymes de synthèse et de dégradation des opines ne sont généralement pas homologues. Ce n'est cependant pas le cas pour certaines enzymes du métabolisme des mannityl-opines. En conséquence, un enchainement de réactions est nécessaire à leur dégradation, comme pour leur formation. L'enchainement des réactions pour la dégradation des mannityl-opines sera décrit plus loin dans ce chapitre.

La chrysopine nécessite elle aussi une réaction supplémentaire pour être dégradée, catalysée par une santhopine cyclase, qui effectue la lactonolyse de cette opine en DFG (Chilton *et al.* 1995).

Les agrocinopines ont également une voie de dégradation particulière du fait de leur nature. Elle fait intervenir une phosphodiesterase, qui va cliver la liaison phosphodiester entre les deux sucres, puis une phosphatase, permettant de déphosphoryler le sucre-phosphate.

1.2.2.3.2.3 Régulation du catabolisme

Les régulateurs des opérons permettant le transport et la dégradation des opines les mieux caractérisés sont OccR, NocR et AccR. Chez la souche de type Ach5, de type octopine, OccR, en présence d'octopine, active la transcription de l'opéron *occ* qui contient les gènes codant pour le système de transport de l'octopine et son enzyme de dégradation. Il semble en revanche réprimer sa propre transcription (von Lintig, Zanker and Schröder 1991; Wang, Helmann and Winans 1992). De même, NocR active l'expression de l'opéron *noc* en présence de nopaline chez la souche C58 (von Lintig, Zanker and Schröder 1991). AccR est, quant à lui, un répresseur transcriptionnel de l'opéron responsable du transport et du catabolisme de l'agrocinopine A.

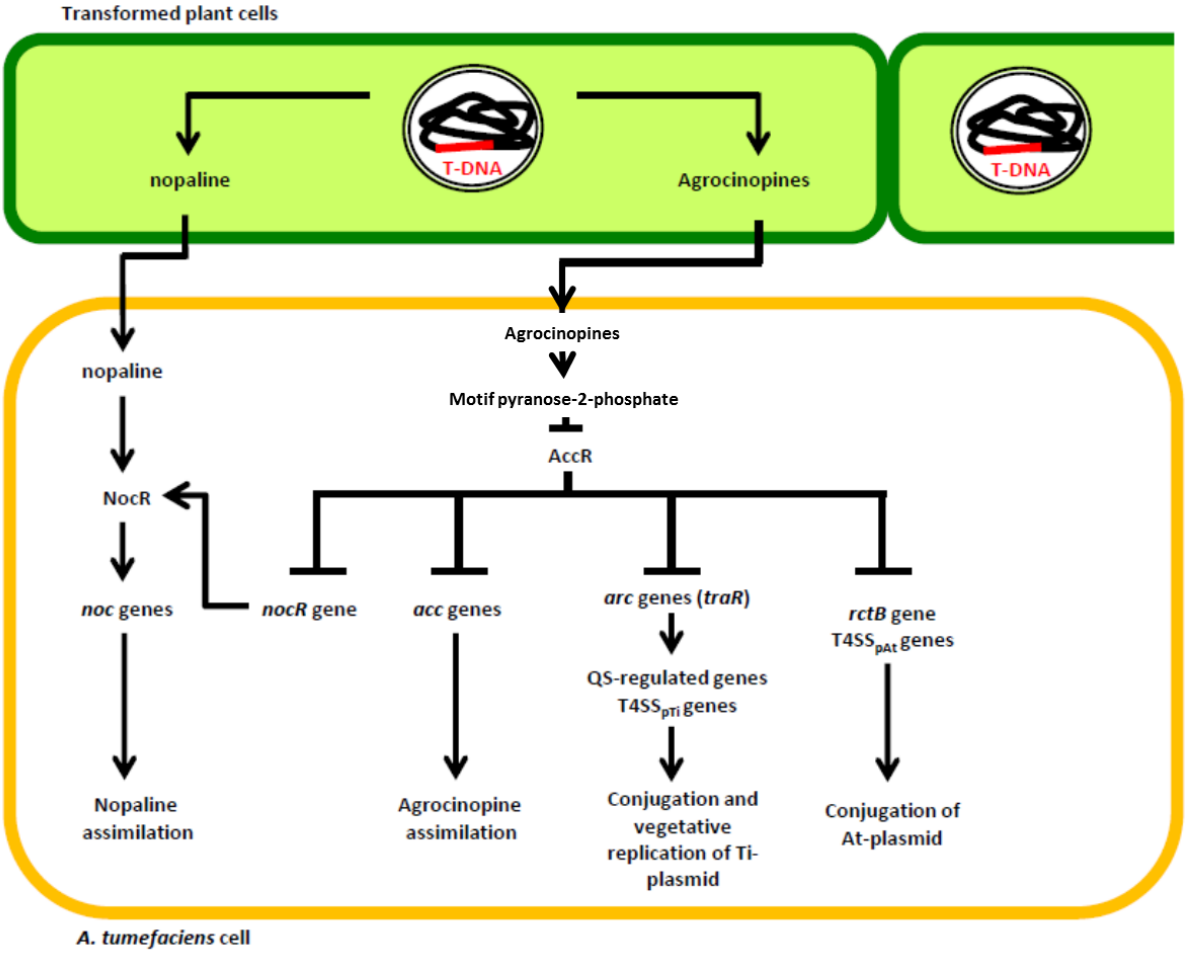


Figure 14 : Gènes régulés par AccR par un motif de l'agrocinopine chez la souche *A. tumefaciens* C58. Le motif pyranose-phosphate de l'agrocinopine A, en inhibant l'activité répressive d'AccR, permet l'import de nopaline et d'agrocinopine ainsi que l'initiation des mécanismes de quorum sensing, et est impliquée dans le transfert conjugatif du pAt (Lang *et al.* 2013).

OccR et AccR contrôlent aussi l'expression d'autres gènes. OccR est un activateur transcriptionnel du gène *traR* dont l'expression est à l'origine de la détection et de la

production de signaux *quorum sensing*. AccR, quant à lui, réprime la transcription de l'opéron *arc*, impliqué dans la formation du système de sécrétion de type IV (SST4) utilisé lors de la conjugaison du plasmide Ti et contenant le gène *traR*, celle de l'opéron *rep* chargé de la réplication du plasmide de virulence (Figure 14), ainsi que celle des gènes *rct* codant également pour un SST4 qui intervient dans la conjugaison du plasmide At, même si ce dernier est autonome en absence du pTi. AccR contrôle également l'expression de l'opéron *noc*, responsable du transport et du catabolisme de la nopaline (Lang *et al.* 2013).

Il a été montré récemment que chez la souche 15955, de type octopine, la mannopine peut elle aussi induire le transfert du plasmide en activant un allèle de *traR*, le gène *trlR* (Wetzel *et al.* 2014).

1.2.2.4 Rôle des opines : le concept d'opine

Une tumeur végétale induite par les agrobactéries est une source d'opines qui confère un avantage aux bactéries possédant le pTi (c'est à dire ayant les gènes permettant leur assimilation), pour se multiplier, répliquer le plasmide et le disséminer. La formation et le fonctionnement de cette niche écologique ont été formalisés sous le nom de concept d'opine (opine concept). Ce concept est appuyé entre autres sur la présence sur le pTi d'opérons de dégradation spécifiques de chaque opine dont la bactérie induit la synthèse dans la tumeur. Il a été décrit précédemment qu'un plasmide Ti possédait à la fois les gènes de synthèse et de catabolisme d'opines spécifiques, et que celles-ci régulaient la transcription des opérons cataboliques. La présence de ces gènes sur le pTi apparait comme une véritable marque de fabrique de l'interaction entre *A. tumefaciens* et son hôte. Il a été proposé que cette présence d'opines dans la tumeur et la capacité de la bactérie à les dégrader confèrent un avantage sélectif aux populations d'agrobactéries colonisant les tumeurs et potentiellement en compétition avec d'autres bactéries. Plusieurs expériences, utilisant parfois des plantes génétiquement modifiées pour produire des opines et des souches bactériennes capables ou incapables d'assimiler les opines, ont permis d'avancer le concept d'opine en montrant que la croissance des souches utilisant des opines était favorisée au contact des plantes transgéniques (Savka and Farrand 1997; Dessaux *et al.* 1998). La validité de ce concept d'opine a été également démontré récemment *in planta* (Lang *et al.* 2014).

1.2.2.5 Les mannityl-opines : une synthèse et une dégradation en plusieurs étapes

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mannityl-opines et à leurs précurseurs. Ce sont les seules opines dont la synthèse n'est pas réalisée en une seule étape de condensation. Qui plus est, leurs précurseurs sont eux-mêmes des opines assimilables par la bactérie. En outre, à l'inverse des autres opines dont une famille entière peut être reconnue par un même transporteur, chaque mannityl-opine serait associée avec un système de transport dédié.

1.2.2.5.1 Synthèse à partir de trois protéines

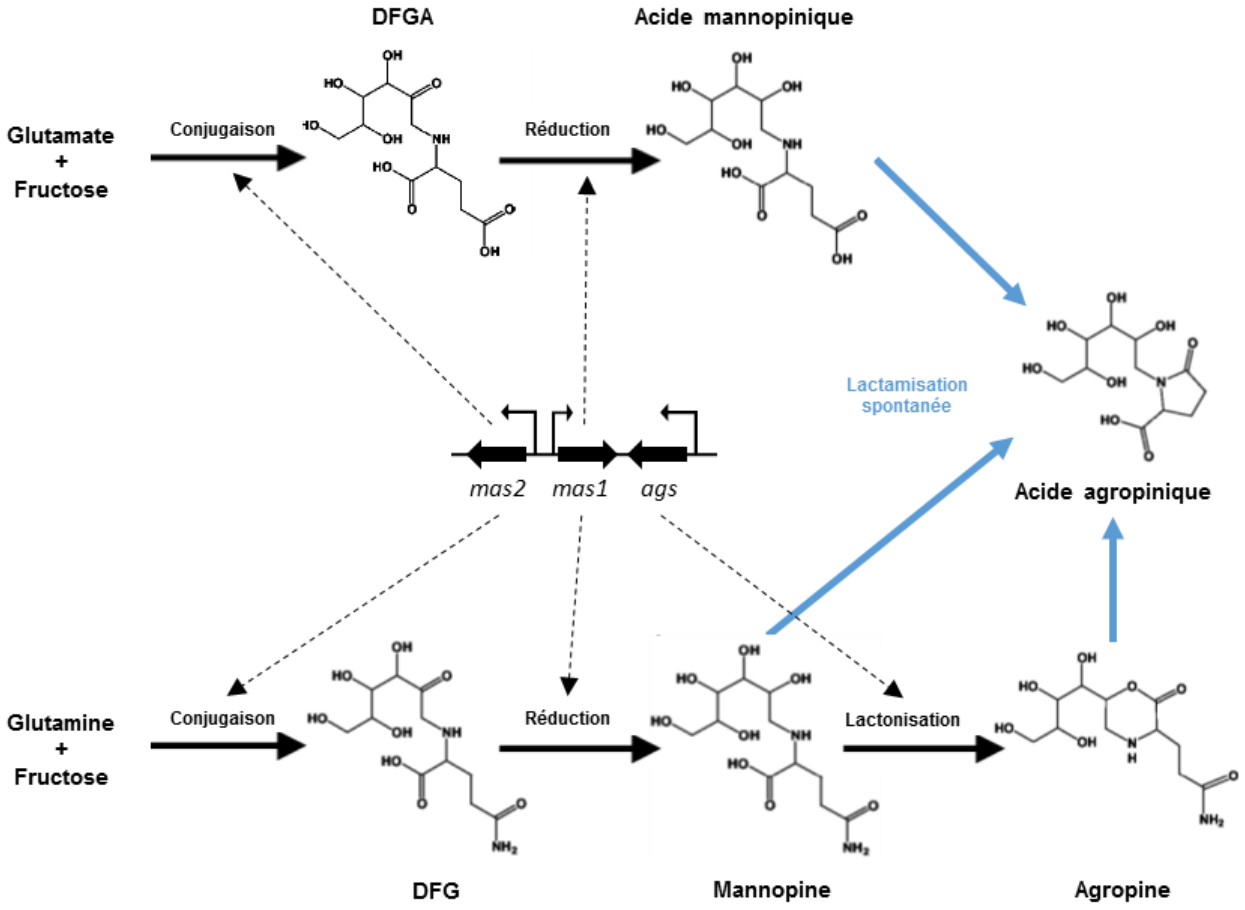


Figure 15 : Synthèse des mannityl-opines dans la cellule végétale transformée. Mas2 catalyse la conjugaison entre la glutamine et le fructose pour former la désoxyfructosyl-glutamine (DFG) et entre le glutamate et le fructose pour former le désoxyfructosyl-glutamate (DFGA). Mas1 réduit ces deux opines en mannopine et acide mannopinique respectivement. Ags catalyse la lactonisation de la mannopine en agropine. La mannopine, l'acide agropinique et l'agropine peuvent se lactamiser spontanément pour former l'acide agropinique (flèches bleues).

La synthèse de la mannopine fait intervenir les enzymes mas2, qui conjugue fructose et glutamine pour former de la DFG, puis mas1 qui réduit la DFG en mannopine. La synthèse de l'acide mannopinique se fait vraisemblablement de la même manière, sauf que mas2

utilise le glutamate au lieu de la glutamine, pour former du DFGA. L'agropine semble formée après action de la cyclase ags (agropine synthase), parfois annotée mas0, par lactonisation de la mannopine, bien que l'activité de cette enzyme n'ait encore jamais été vérifiée. Ces trois enzymes sont codées par les gènes du même nom, situés sur la partie transférée des pTi de type octopine et agropine (Figure 15).

Une fois sécrétées, l'import de ces opines dans le périplasme est réalisé *via* des porines non spécifiques. Des insertions aux sites de restriction HindIII et EcoRI dans la région permettant le catabolisme des mannityl-opines ont permis de cartographier cette région et de montrer que deux voies cataboliques coexistent : l'une permet le transport et la dégradation non spécifiques de la mannopine, l'acide mannopinique et l'agropine, l'autre permet un transport et une dégradation spécifiques pour l'acide mannopinique et l'acide agropinique (Dessaux, Tempé and Farrand 1987; Dessaux *et al.* 1988; Hong *et al.* 1993).

1.2.2.5.2 La voie de transport et de catabolisme non spécifique

La première voie catabolique fait intervenir la région *moc* du pTi, composée des opérons *mot*, *moc* et *agt*, et des gènes *agcA*, *mocR* et *mocS* (aussi annoté *mocR'*) (Figure 16 haut). La Protéine Périplasmique de Fixation (PBP) MotA fixerait la mannopine et l'acide mannopinique dans le périplasme et apporterait chaque ligand au transporteur à ATP-Binding Cassette (ABC) MotBCD associé pour l'importer dans le cytoplasme. De même, la PBP AgtB interagirait avec l'agropine pour l'amener au transporteur ABC AgtAC associé afin de lui faire traverser la membrane plasmique. La mannopine cyclase AgcA hydrolyserait l'agropine en mannopine. MocC permettrait ensuite l'oxydation de cette dernière en DFG mais de manière surprenante pas celle de l'acide mannopinique en DFGA (Kim, Chilton and Farrand 1996). Enfin, MocD et E catalyseraient la déconjugaison de la DFG (et peut-être de la DFGA) en fructose et glutamine (ou fructose et glutamate). Les gènes *mocA* et *mocB*, situés en aval de *mocC*, codent pour des enzymes homologues à une 6-phosphoglucose deshydrogénase et une 6-phosphogluconate déshydratase respectivement, enzymes utilisées lors de l'utilisation des sucres chez plusieurs agrobactéries (Kim and Farrand 1996). MocR réprime la transcription de *mocC* et *mocDE*, et cette répression est levée en présence d'agropine (Jung *et al.* 1999). MocS semble aussi réprimer la transcription de ces gènes, mais de manière beaucoup moins efficace que MocR. Ceci est peut-être dû à une régulation très fine de ces opérons pour éviter une dépense énergétique trop grande en cas

d'absence, ou de faibles concentrations de mannopine et d'agropine dans le milieu. Mais ce système de régulation reste obscur.

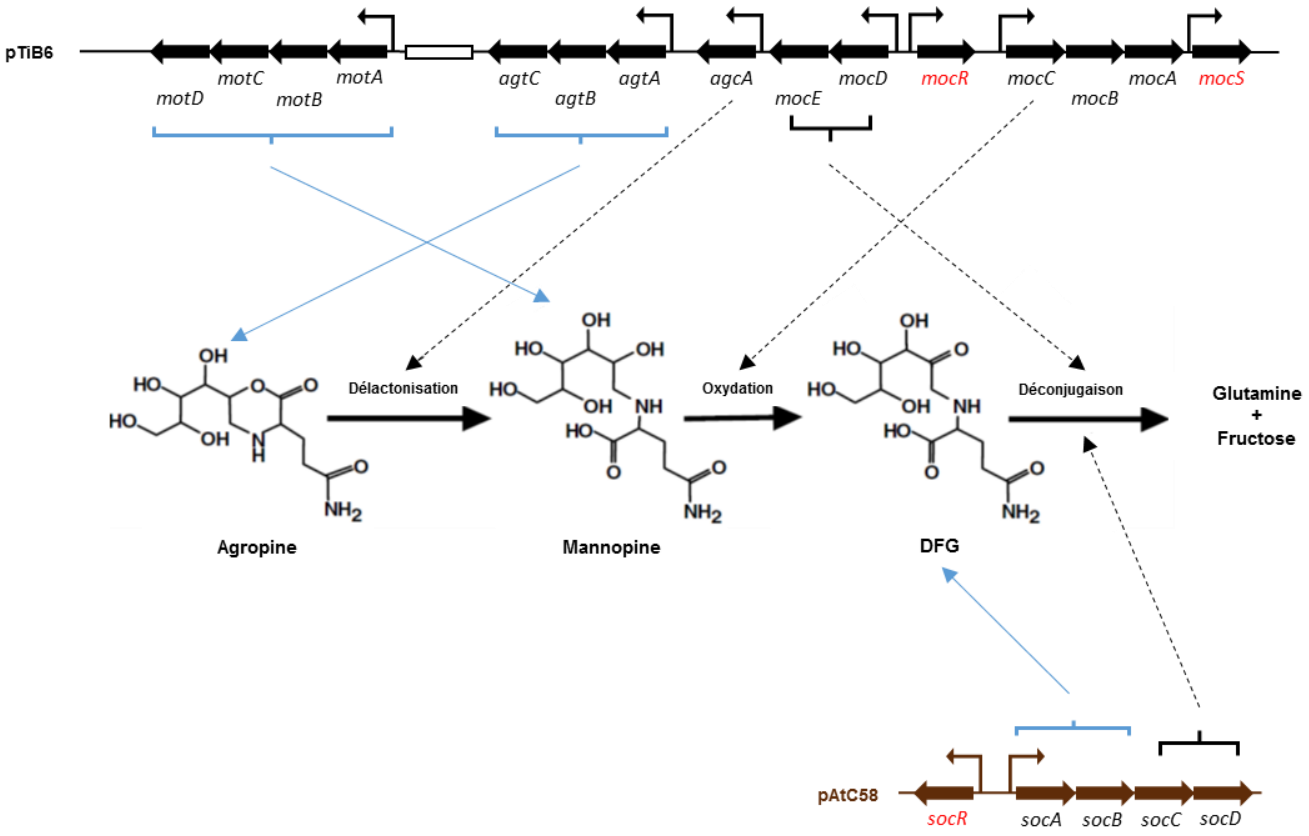


Figure 16 : Opérons responsables du transport et du catabolisme de la mannopine, de l'agropine et de la désoxyfructosyl-glutamine (DFG) sur le pTiB6 (en noir) et sur le pAtC58 (en marron). Les transporteurs sont symbolisés par des flèches bleues et les enzymes par des flèches pointillées noires. Chez B6, les protéines AgtABC importent l'agropine dans le cytoplasme de la bactérie MotABCD importent la mannopine. AgcA délactonise l'agropine en mannopine. MocC catalyse l'oxydation de la mannopine en DFG. MocDE déconjuguent la désoxyfructosyl-glutamine en glutamine et fructose. MocR et MocS, en rouge, sont les régulateurs transcriptionnels de certains de ces opérons. Chez C58, les protéines SocAB transportent la DFG dans le cytoplasme et SocCD la déconjuguent en glutamine et fructose. SocR, en rouge, régule cet opéron. Inspiré de Baek et al., 2005.

Des alignements de séquences entre gènes de synthèse et gènes de catabolisme ont montré qu'ils étaient homologues deux à deux. Le gène *ags* partage 60,9% d'identité de séquence avec *agcA*, et leurs produits protéiques partagent 58% d'identité et 79% de similarité (Hong *et al.* 1997). Le gène *mas2* partage 46% d'identité de séquence avec *mocD*. Les séquences nucléotidiques de *mocE* et *mocC* sont similaires avec les parties 5' et 3', respectivement, de *mas1.* La fusion hypothétique des protéines MocE et MocC partagent 23% d'identité de séquence et 51% de similarité avec Mas1. Au vu de ces alignements, il a été proposé que Mas1 soit issu d'une fusion d'homologues de MocE et MocC (Kim and Farrand 1996). Pour expliquer cette homologie entre gènes de synthèse et gènes de dégradation, ainsi que la présence des gènes *mocA* et *mocB*, homologues à des gènes

chromosomiques de plusieurs agrobactéries, il a été proposé que certains gènes de cette voie de catabolisme aient eu pour origine des gènes localisés dans un génome bactérien, et que les gènes de synthèse ont dérivé des gènes de catabolisme (Kim and Farrand 1996).

Le fait qu'une activité mannopine cyclase ait été observée avec AgcA va dans le sens de cette théorie. Elle explique même la levée de l'inhibition du catabolisme par MocR en présence de mannopine comme seule source de carbone (Jung *et al.* 1999) par la production d'agropine par AgcA. La réaction inverse de délactonisation de l'agropine, censée être catalysée par cette enzyme, n'a en revanche pas été observée.

Le transporteur et les enzymes permettant la translocation et la dégradation de la DFG ne sont pas homologues avec les protéines codées par l'opéron *soc*, situé sur le pAtC58 (Baek *et al.* 2003). L'opéron *soc* code pour la PBP (SocA), le transporteur ABC (SocB), l'hydrolase (SocC) et la conjugase (SocD) (Figure 16 bas). Aucune protéine chez C58 ne permet la dégradation de la mannopine, mais lorsque le gène *mocC* est ajouté, cette souche devient capable de cataboliser cette opine, ce qui signifie qu'elle possède un transporteur qui permet sa translocation dans le cytoplasme. Ce transporteur semble être SocAB.

1.2.2.5.3 La voie de transport et de catabolisme spécifique pour l'acide mannopinique et l'acide agropinique

La deuxième voie catabolique fait intervenir la région *aga*/*moa* du pTi (Figure 17), composée des opérons *moaBCDA*, *agaDBCA*, *agaEFG* et du gène *moaR*. Selon les analyses génomiques et fonctionnelles de Lyi et collaborateurs (Lyi, Jafri and Winans 1999), la PBP AgaA fixe l'acide agropinique dans le périplasme de la bactérie pour l'apporter au transporteur AgaBCD afin d'importer l'opine dans le cytoplasme. La PBP MoaA fixe l'acide mannopinique pour l'apporter au complexe MoaBCD afin de permettre sa translocation à travers la membrane plasmique. AgaG et AgaF catalyseraient ensuite la délactamisation de l'acide agropinique en acide mannopinique, qui serait lui-même directement déconjugué en mannose et glutamate par AgaE. MoaR est le répresseur transcriptionnel des trois opérons codant pour ces protéines. Sa répression est levée par l'acide mannopinique et l'acide agropinique.

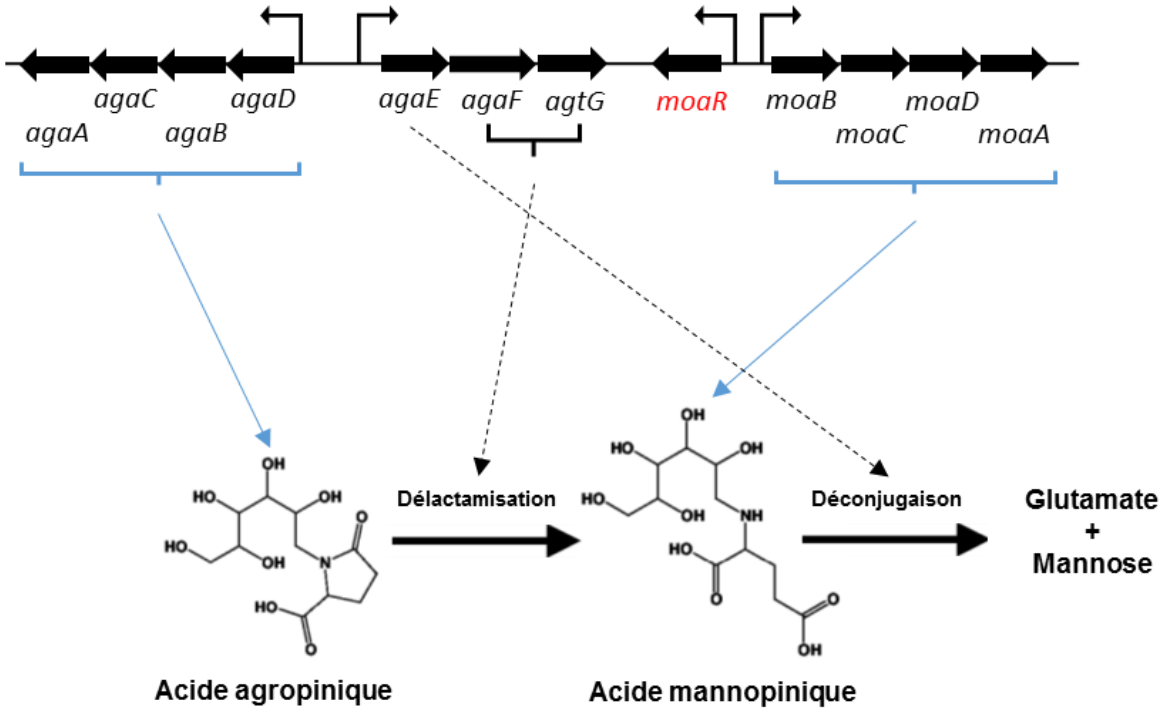


Figure 17 : Opérons responsables du transport et du catabolisme de l'acide mannopinique et de l'acide agropinique. AgaDBCA transportent l'acide agropinique du périplasme vers le cytoplasme. MoaBCDA importent l'acide mannopinique. AgaFG délactamisent l'acide agropinique en acide mannopinique. AgaE déconjugue l'acide mannopinique en glutamate et mannose. MoaR, en rouge, est le régulateur transcriptionnel de ces opérons.

La différence notable observée entre ces deux voies de catabolisme est que l'acide mannopinique est directement déconjugué par AgaE sans passer par un intermédiaire oxydé, contrairement à la mannopine, oxydée par MocC. Ensuite, les protéines impliquées dans le catabolisme de l'acide mannopinique et de l'acide agropinique ne sont pas homologues avec les protéines de l'autre voie de catabolisme, tout comme les enzymes de dégradation avec les enzymes de la voie de synthèse.

1.3 Les Protéines Périplasmiques de Liaison (PBP) : structure et mécanisme

1.3.1 Les transporteurs ABC

1.3.1.1 Généralités

Chez les bactéries, le transport de molécules de l'environnement est une étape clé dans de nombreux processus biologiques tels que la nutrition, la communication intercellulaire, la virulence ou encore la dissémination du pouvoir pathogène. Ce mécanisme fait intervenir des complexes protéiques transmembranaires de différents types. Les plus représentatifs sont les transporteurs de type ABC, mais il existe aussi des transporteurs de type TRAP (*Tripartite* ATP-*independent Periplasmic*) ou TTT (*Tripartite Tricarboxylate*

Transporter). Chez les bactéries à coloration Gram négative, ces transporteurs sont associés à des protéines périplasmiques auxiliaires appelées PBP (*Periplasmic Binding Protein*) qui assurent la spécificité et le transport unidirectionnel des molécules vers le cytoplasme.

Les transporteurs à ATP *Binding Cassette* (ABC) constituent une vaste famille de protéines ubiquitaires chez les organismes vivants (Higgins 2003). Chez l'homme, plus d'une cinquantaine de gènes codent pour des transporteurs ABC (Dean, Rzhetsky and Allikmets 2001) et il en existe plus de 120 chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Sanchez-Fernandez *et al.* 2001). Les souches *A. tumefaciens* C58 et B6 sont parmi les α-proteobactéries les plus riches en transporteurs ABC puisqu'environ 9% du génome de C58 code pour de tels transporteurs.

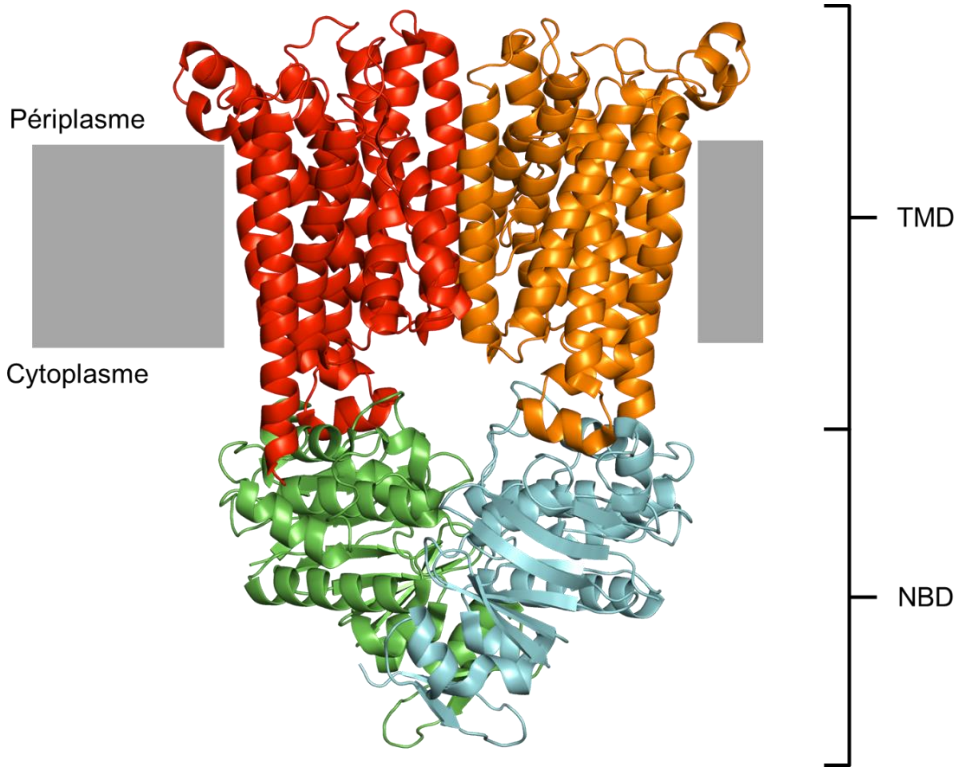


Figure 18 : Structure cristalline de BtuCD obtenue à une résolution de 2,79 Å (code PDB : 4R9U), le transporteur ABC de la vitamine B12 chez *E. coli*. Les TMD (BtuC) sont composés de 10 hélices transmembranaires et les NBD (BtuD), qui se trouvent dans le cytoplasme, sont formés d'hélices α et de feuillets β.

Ces complexes utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de deux molécules d'ATP pour la translocation au travers des membranes biologiques des substances contre leur gradient de concentration. Les éléments transportés, ou allocrites (Holland and A. Blight 1999), peuvent être de tailles et de natures différentes (sucres, acides aminés, ions, métaux…),

liant ainsi les transporteurs ABC à des fonctions diverses et variées. Chez les procaryotes, ces complexes peuvent être des importeurs comme des exporteurs, alors que seuls des exporteurs ont été découverts chez les eucaryotes.Malgré la grande variété d'allocrites transportés, les complexes conservent une organisation structurale commune. Ils sont constitués de deux domaines transmembranaires hydrophobes (*TransMembrane Domains* ou TMD) et de deux domaines cytoplasmiques qui assurent l'activité ATPasique (*Nucleotide-Binding Domains* ou NBD). Chez les procaryotes, ces quatre domaines sont souvent les produits de gènes individuels, tandis que chaque sous-unité des exporteurs eucaryotes possède un domaine TMD et un domaine NBD (Figure 18).

1.3.1.2 Les domaines transmembranaires (TMD)

Les TMD dimérisent pour former le pore de translocation qui permet le passage de l'allocrite à travers la membrane plasmique. Chacun d'entre eux est composé de 4 à 10 chaînes α ancrées à la membrane et reliées entre elles par des boucles extra- et intra-cytoplasmique (Quentin, Fichant and Denizot 1999). Au niveau de ces hélices, des résidus sont impliqués dans l'interaction avec l'allocrite. Malgré les faibles similarités de séquences des TMD, un motif, appelé EAA ou L-loop, est conservé sur une des boucles cytoplasmiques, et serait impliqué dans la reconnaissance des domaines NBD. Il jouerait donc un rôle dans la transmission de changements conformationnels entre les TMD et les NBD lors du mécanisme de translocation.

1.3.1.3 Les domaines de liaison à un nucléotide (NBD)

Les NBD sont les « domaines moteurs » des transporteurs ABC. Chaque NBD fixe et hydrolyse une molécule d'ATP en adénosine-diphosphate (ADP) et un phosphate inorganique (Pi). Ces domaines ne forment pas d'intermédiaires phosphorylés. Contrairement aux TMD, les séquences des NBD sont très conservées, notamment au niveau de cinq motifs peptidiques : les motifs de Walker A et B, la signature LSGGQ et les motifs Q-loop et H-loop. Le motif de Walker A (ou P-loop) est impliqué dans la liaison aux groupements phosphate de l'ATP, via une lysine conservée (Hung *et al.* 1998). Le motif de Walker B est engagé dans la coordination de l'ion Mg^{2+}, essentiel à la réaction d'hydrolyse. Ces deux motifs ne sont pas spécifiques des transporteurs ABC, car ils sont communs à la plupart des protéines qui possèdent une activité ATPasique. La signature LSGGQ (ou C-loop) est en revanche spécifique des transporteurs ABC et serait impliquée à la fois dans l'hydrolyse de l'ATP et dans la transmission de changements conformationnels des NBD

aux TMD lors du transport de l'allocrite. Le motif Q-loop interagit avec l'ion Mg^{2+} et une molécule d'eau et est également impliqué dans la transmission des changements conformationnels entre NBD et TMD (Schneider and Hunke 1998). Le motif H-loop interagit avec le phosphate γ de l'ATP via une molécule d'eau et est impliqué dans l'activation de l'hydrolyse de l'ATP (Davidson *et al.* 2008).

1.3.2 LES PBP : STRUCTURE ET MÉCANISME

Les PBP sont des protéines de taille variant entre 25 et 70 kDa. Elles permettent la capture de solutés et les amènent aux domaines transmembranaires des transporteurs ABC, qui permettent la translocation des solutés à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme. Les PBP diffusent librement dans le périplasme des bactéries à coloration Gram négative, alors qu'elles sont ancrées à la membrane par une queue hydrophobe chez les bactéries à coloration Gram positive et les archées (Sutcliffe and Russell 1995).

1.3.2.1 Structure générale

La première structure cristalline d'une PBP a été résolue au début des années 70. Il s'agit de l'ABP (*L-arabinose-Binding Protein*) d'*E. coli*, impliquée dans la perception du L-arabinose (Quiocho *et al.* 1974). Des centaines de données structurales relatives à ces protéines ont été obtenues depuis. Elles montrent que les PBP, malgré une faible similarité de séquence et une affinité pour des ligands de nature différente (acide aminés, peptides, métaux, sucres, polysaccharides, …) conservent une architecture protéique commune. Elles sont constituées de deux domaines globulaires (ou lobes), reliés par une région charnière. L'espace entre les deux lobes contient le site de fixation au ligand. Chaque lobe est composé d'un feuillet β central entouré par un nombre variable d'hélices α (Quiocho and Ledvina 1996). Ces deux domaines peuvent se mouvoir autour de la région charnière en fonction de sa structure secondaire, ce qui confère une certaine flexibilité à la protéine. La PBP peut donc adopter une position « fermée » ou « ouverte » avec un degré d'ouverture variable.

Bien que la structure tertiaire des PBP soit globalement conservée, il existe des différences de tailles et de réarrangement des structures secondaires au niveau des deux lobes.

1.3.2.2 Classification structurale

En se basant sur la topologie des domaines globulaires, les PBP ont tout d'abord été classées en deux classes : I et II. Les protéines de ces deux classes ne diffèrent que par le nombre et l'ordre des brins composant le feuillet β central des lobes ainsi que par le nombre de segments reliant ces deux domaines (Fukami-Kobayashi, Tateno and Nishikawa 1999). Une troisième classe regroupant les PBP dont la région charnière est constituée d'une seule hélice α a été introduite par la suite (Karpowich *et al.* 2003).

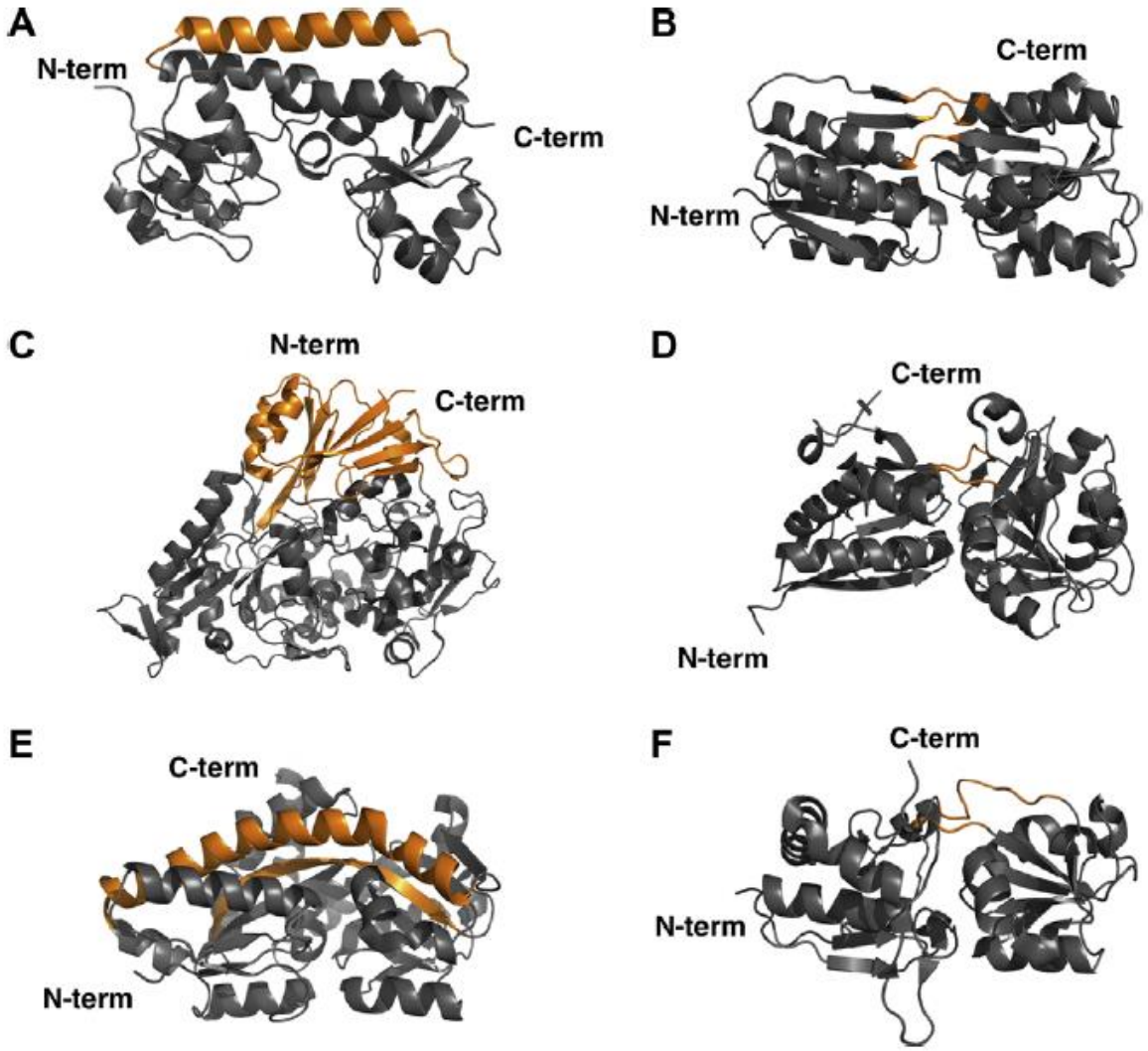


Figure 19 : Classification des PBP selon Bertsson et al, 2010. Les régions charnières définissant les 6 classes structurales sont colorées en orange. Cette classification est basée sur la superposition de structures issues de la PDB de protéines de divers organismes et fixant des ligands de nature différente.

Le nombre croissant de données structurales relatives aux PBP a cependant conduit à définir une nouvelle classification, basée cette fois sur les similitudes structurales de ces protéines (Berntsson *et al.* 2010). Six groupes structuraux notés de A à F, obtenus à partir

d'un alignement de structures tridimensionnelles et non plus à partir d'un alignement de séquences peptidiques, ont ainsi été proposés (Figure 19). Cette nouvelle classification montre que la différence majeure entre les PBP de différents groupes se trouve dans la région charnière.

Les PBP de la classe A possèdent une charnière formée d'une hélice α, comme la protéine PsaA de *Streptococcus pneumoniae* qui fixe du zinc (Code PDB : 1PSZ). Cette région charnière structurée ne permet qu'une faible flexibilité dans l'ouverture des deux lobes. De nombreuses PBP de cette classe fixent un métal. Les domaines des protéines de la classe B sont reliés par trois segments courts sans structure particulière, ce qui confère une plus grande flexibilité, et les extrémités N et C terminales ne sont par conséquent pas dans le même domaine. Une telle architecture est observée pour la Maltose Binding Protein (MBP, code PDB : 1ANF). La classe C, telle que décrite dans cette classification, est formée de deux domaines de tailles différentes reliés par un troisième domaine charnière. Ce cluster regroupe les PBP les plus grandes (50 à 70 kDa). Il contient de nombreuses protéines liant les peptides, telle que DppA d'*E. coli* (Code PDB : 1DPP). Des alignements de séquences suggèrent que les PBP MoaA, fixant l'acide mannopinique, et AgaA, fixant l'acide agropinique, appartiennent à ce groupe (Annexe 2). Le groupe D se caractérise par des domaines de tailles équivalentes reliés par une région charnière de deux brins de 4 à 5 résidus, comme c'est le cas pour la protéine TbpA d'*E. coli* (Code PDB : 2QRY) qui est impliqué dans le transport de la thiamine. Les séquences des PBP MotA, fixant la mannopine, AgtB, fixant l'agropine, et AttC sont similaires à celles des protéines de cette classe (Annexe 2). Les PBP du groupe E sont caractérisées par la présence d'une seule hélice α et d'un brin β connectant les deux lobes. Les PBP de ce groupe sont en général associées à des transporteurs de type TRAP, comme la protéine SiaP de *Haemophilus influenzae* (Code PDB : 2CEY). Enfin, le groupe F contient les PBP avec une région charnière constituée de deux segments de 8 à 10 résidus, architecture observée pour la protéine NocT d'*Agrobacterium tumefaciens* (Code PDB : 4P0I) (Lang *et al.* 2014). Un alignement des séquences de SocA, qui transporte la DFG chez C58, et des PBP de ce groupe laisse penser que cette protéine appartient au groupe F (Annexe 2).

Cette classification en fonction de la structure montre que les protéines conservant une forte similarité structurale ne se lient pas forcément à des ligands de même nature, et ne présentent pas toujours de fortes similarités de séquence.

1.3.2.3 Liaison avec le ligand

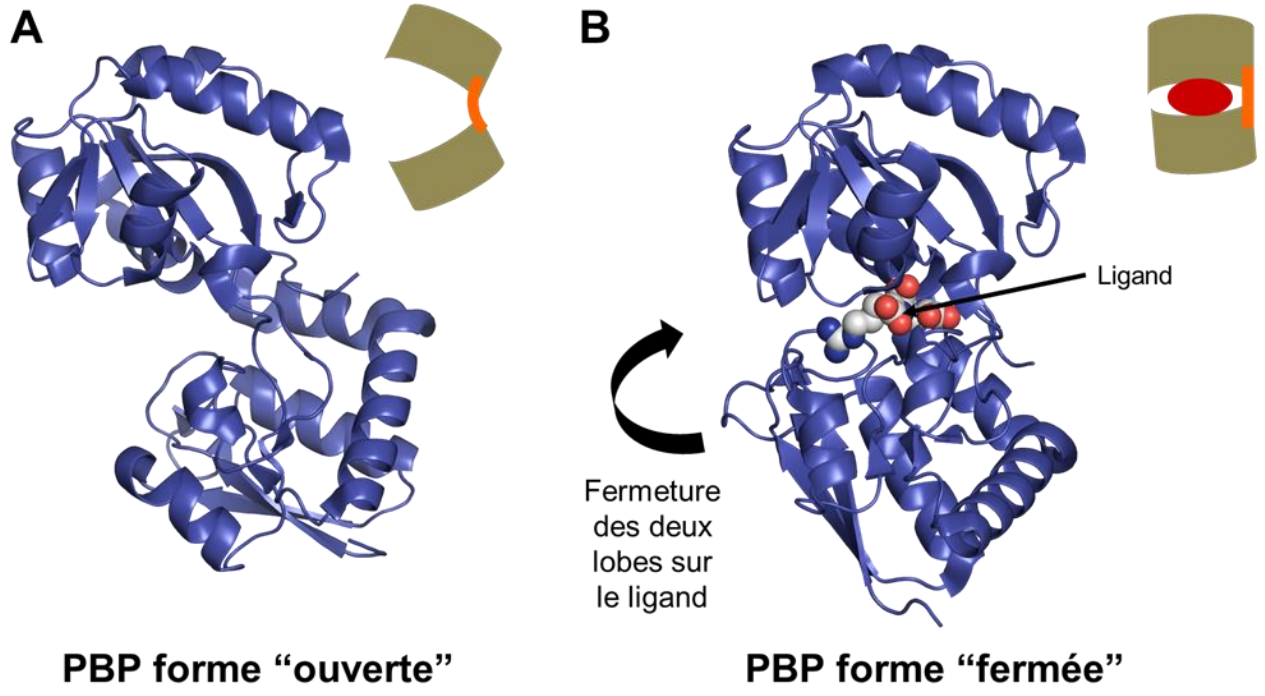


Figure 20 : Structure de la PBP NocT (classe F) d’*A. tumefaciens* C58. A : forme ouverte non ligandée (code PDB : 4P0I). B : forme fermée suite à la fixation du ligand (la nopaline) représenté en sphères (code PDB : 4POX). Les deux domaines pivotent autour de la région charnière de 43° en comparaison avec la structure non liée (Lang *et al.* 2014).

En absence de ligand, les PBP adoptent une forme ouverte (Bermejo *et al.* 2010). Cette conformation permet la reconnaissance et la fixation spécifique du ligand via des interactions avec les résidus de la poche à l’interface entre les deux lobes. La capture du ligand entraîne un mouvement de charnière qui permet le rapprochement des deux lobes se fermant ainsi sur la molécule.

Les PBP agissent comme une pince pour fixer le ligand à l’interface entre les domaines (Figure 20). Le changement de conformation, qui est une rotation des lobes autour de la région charnière, peut être très variable, allant de quelques degrés dans le cas de la fixation de la vitamine B12 par la PBP BtuF d’*E. coli*, à 60° dans le cas de la protéine LivJ d’*E.coli*, liant des acides aminés (leucine, isoleucine et valine) (Berntsson *et al.* 2010).

1.3.2.4 Interaction avec les transporteurs

L’interaction entre les PBP et les TMD des transporteurs ABC est une étape clé dans le mécanisme de transport. Les structures cristallines des complexes PBP-transporteur ABC entiers, comme celle du complexe MalE-MalFGK2 chez *E. coli* (Shilton 2008), ont permis

de proposer un mécanisme de transport. En l'absence d'interaction entre la PBP et le transporteur ABC, état dit de « repos », le pore de translocation, composé des TMD, est en conformation ouverte vers le cytoplasme et les NBD, également ouverts, sont liés à des molécules d'ATP (Figure 21A).

L'interaction du transporteur avec la PBP liée au soluté induit un changement de conformation des TMD, permettant au pore de translocation de s'ouvrir vers le périplasme et au NBD de se rapprocher l'un de l'autre. De façon concomitante, la PBP s'ouvre pour libérer son ligand dans le pore de translocation. A ce stade, le complexe PBP-transporteur ABC est stable (Oldham, Davidson and Chen 2008) (Figure 21B). Les NBD hydrolysent ensuite les molécules d'ATP, ce qui induit un nouveau changement conformationnel des TMD, induisant l'ouverture du pore vers le cytoplasme en libérant le soluté (Figure 21C). Le relargage des ADP formés ramène le transporteur dans sa conformation initiale (Figure 21D), afin de commencer un nouveau cycle après capture de nouveaux ATP.

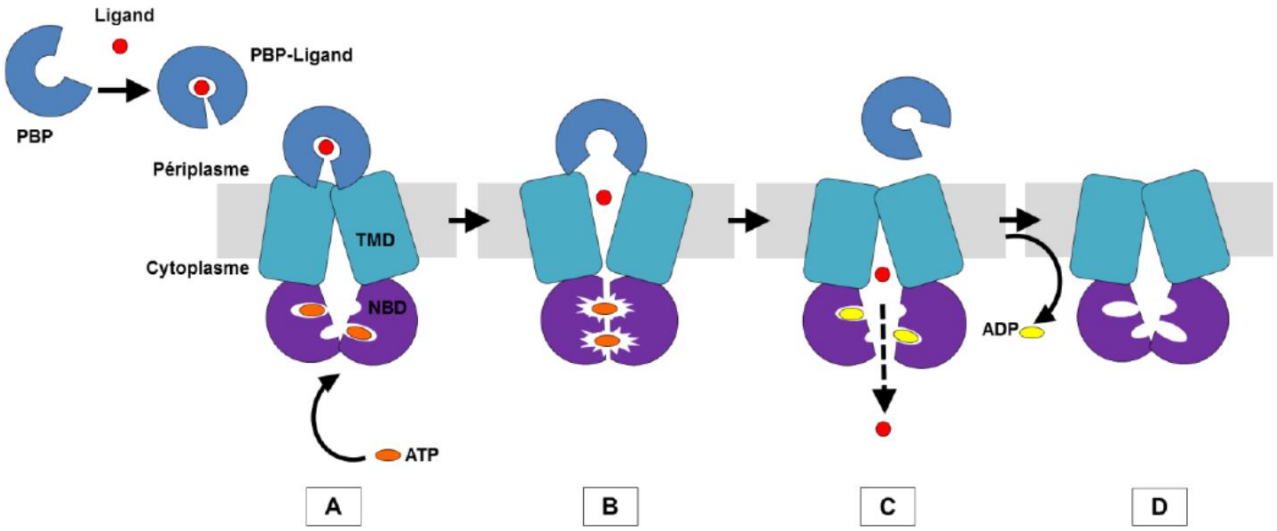


Figure 21 : Mécanisme de transport assuré par le système PBP-transporteur ABC. A : le pore de translocation du transporteur ABC est fermé vers le périplasme et ouvert vers le cytoplasme. Après la capture du ligand dans le périplasme, la PBP interagit avec les domaines TMD tandis que les domaines NBD capturent des molécules d'ATP dans le cytoplasme. B : l'interaction PBP/TMD induit un changement conformationnel de ces domaines. La PBP s'ouvre et le ligand est libéré dans le pore de translocation ouvert vers le périplasme. Les changement conformationnels des TMD permettent aux NBD de se rapprocher l'un de l'autre pour hydrolyser l'ATP. C : Après hydrolyse, le pore de translocation est s'ouvre de nouveau vers le cytoplasme pour y libérer l'allocrite. Les domaines NBD s'éloignent l'un de l'autre D : Les molécules d'ADP sont libérée dans le cytoplasme et le transporteur retourne à son état initial.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif principal de ma thèse a été de valider au niveau moléculaire les expériences de génétiques qui avaient identifiées les systèmes de transport des mannityl-opines (la mannopine, l'acide mannopinique, l'agropine et l'acide agropinique) dans les souches C58 et B6 *d'Agrobacterium tumefaciens*. Par une approche biophysique (cristallographie et mesures d'affinité), je souhaitais caractériser les modes de fixation de la partie Protéine Périplasmique de Fixation (PBP) des systèmes de transport identifiés pour ces différentes opines afin de comprendre leur spécificité et leur sélectivité. J'ai aussi étudié la fixation de la DFG, un intermédiaire dans la formation de la mannopine ainsi qu'un composé d'Amadori.

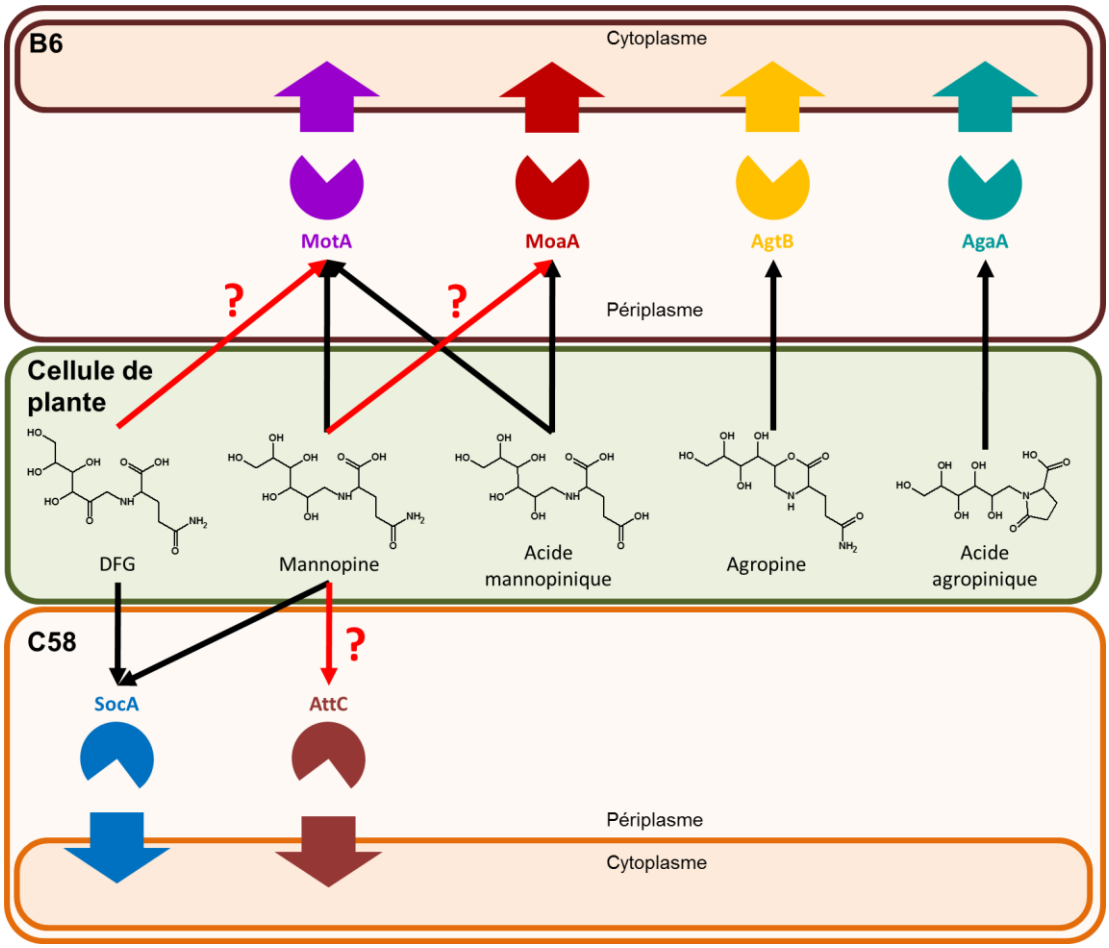


Figure 22 : Schéma récapitulatif des objectifs de thèse. Les camemberts représentent les PBP étudiées et les flèches épaisses de couleur représentent les transporteurs ABC associés. Les flèches rouges représentent les interactions inconnues. Les flèches noires représentent les interactions connues, mais les modes de fixation et les affinités restent à déterminer.

Les PBP MotA, chez la souche B6 capable de croître sur mannopine, et SocA, chez la souche C58 capable de croître sur mannopine uniquement en présence du gène *mocC* qui code pour l'enzyme de dégradation de la mannopine, ont été décrites comme fixant la

mannopine. Ces deux PBP ne se ressemblent pas. En effet, elles ne partagent que 5% d'identité de séquence et des alignements de séquences avec les PBP de la Protein Data Bank montrent qu'elles appartiendraient à deux clusters structuraux différents : MotA au cluster D et SocA au cluster F dans la classification des PBP. Mon premier objectif a donc été de comprendre comment deux PBP si différentes pouvaient fixer un même ligand. SocA a également été décrite comme capable de fixer la DFG. La capacité de MotA à fixer la DFG n'a en revanche jamais été étudiée. J'ai ainsi vérifié si MotA était capable tout comme SocA de fixer la DFG.

Suite à mon travail sur SocA démontrant que la PBP ne peut pas fixer de la mannopine, j'ai cherché parmi les PBPs de C58, celles qui pouvaient éventuellement fixer de la mannopine. La PBP AttC étant la seule PBP annotée comme pouvant fixer de la mannopine, j'ai décidé d'étudier la structure et l'affinité de cette PBP avec la mannopine L'acide mannopinique et la mannopine sont deux mannityl-opines chimiquement très similaires. MotA chez B6 a été décrite comme pouvant fixer les deux opines tandis que la PBP MoaA chez B6 a été décrite comme étant spécifique de l'acide mannopinique. MotA et MoaA partagent 6% d'identité de séquence, et MoaA appartiendrait au cluster C, différent de celui de MotA, dans la classification des PBP. Mon deuxième objectif a donc été de caractériser les deux modes de fixation de l'acide mannopinique et d'étudier leur affinité par microcalorimétrie.

Chez B6, les PBP AgtB et AgaA ont toutes deux été décrites comme sélectives pour respectivement l'agropine, et l'acide agropinique. AgtB partage 31% d'identité de séquence et appartiendrait au même cluster structural D que MotA (Annexe 2), qui est une PBP apparemment non sélective, tandis que AgaA partage 27% d'identité de séquence et appartiendrait au même cluster structural C que MoaA (Annexe 2), PBP décrite comme sélective. Mon troisième objectif a été d'étudier la relation structure-sélectivité de ces deux PBP, et de les comparer avec celles de MotA et MoaA.

Les résultats de mes travaux expérimentaux, présentés dans les chapitres qui suivent, sont le fruit d'une approche multidisciplinaire combinant la biologie structurale, la biochimie, la phylogénie et la microbiologie. Ils ont permis de réviser ou de valider les données de génétiques et ouvrent de nouvelles questions.

CHAPITRE 2 : ETUDES STRUCTURALES ET MESURES D'AFFINITÉ DES PBP MOTA CHEZ LA SOUCHE B6 ET SOCA ET ATTC CHEZ LA SOUCHE C58.

2.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La bactérie pathogène *A. tumefaciens* est capable de détourner la machinerie de la plante pour produire des composés nutritifs spécifiques aux souches virulentes. Ces composés de faible poids moléculaire sont appelés opines. Chez la souche B6, la mannopine assure cette fonction de nutriment.

Bien que la plupart de ces opines sont synthétisées dans la plante en une simple étape de condensation d'acide aminé et de cétoacide ou de sucre, la mannopine est issue de la réduction d'une autre opine, la désoxyfructosyl-glutamine ou DFG, produite dans les tumeurs induites par B6. Cette opine est aussi un produit issu du réarrangement d'Amadori impliqué dans le brunissement des composés organiques et est largement répandue dans le sol. La souche C58 n'induit pas sa production dans les plantes infectées mais est capable de la métaboliser.

L'import de la mannopine chez B6 est assuré par la protéine périplasmique MotA, un des produits de l'opéron *mot* situé sur la partie non transférée du plasmide Ti. Chez C58, l'import de la DFG est assuré par la protéine périplasmique SocA, codée par un gène de l'opéron *soc* situé sur le pAt. SocA est aussi décrite comme capable de transporter la mannopine, bien que C58 soit incapable de cataboliser cette opine (Baek *et al.* 2003).

Le mode de fixation de la mannopine et de la DFG (qui peut adopter plusieurs conformations) et les spécificités de MotA et de SocA étaient inconnues lorsque j'ai commencé cette thèse. De plus, aucun transporteur de la DFG n'était décrit chez B6.

2.2 PRÉSENTATION DES TRAVAUX

Dans le but de caractériser et de comparer le mode de fixation et de comprendre la spécificité des protéines MotA et SocA envers la mannopine et la DFG, nous avons combiné l'étude structurale par diffraction aux rayons X des protéines liées à la mannopine, la DFG et à la glucopine (une opine synthétique épimère en C2 de la partie sucre de la mannopine) aux mesures d'affinité et de fluorescence intrinsèque des protéines. Nous avons également

étudié l'occurrence et la parenté de ces deux PBP chez d'autres bactéries par des études de phylogénie.

Les études structurales et biochimiques ont montré que la PBP MotA peut fixer les trois molécules avec une haute affinité, et donc que MotA n'est pas spécifique de la mannopine. Ces études ont également révélé que la PBP SocA est capable de fixer la DFG sous forme cyclique avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire, et la glucopine avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire, tandis qu'elle est incapable d'interagir avec la mannopine, malgré ce qui avait été décrit (Baek *et al.* 2003).

Les études phylogénétiques de ces deux PBP ont montré que MotA était peu répandue chez les bactéries et plutôt propre aux *Rhizobiaceae*, tandis que de nombreuses bactéries, Gram négatives et Gram positives, possédaient des homologues de SocA capables de fixer la DFG.

Nous avons conclu de l'ensemble de ces données que la mannopine sert de substrat privé, importé par MotA, pour les bactéries permettant leur production dans les tumeurs, tandis que la DFG, très abondante naturellement, sert de nutriment pour un grand nombre de bactéries, ce qui corrèle avec la large occurrence de son transporteur SocA.

Comme il a été montré que la mannopine est transportée chez C58 et que SocA ne semble pas être son transporteur, nous avons entrepris l'étude structurale et biophysique de la PBP AttC. Cette étude n'a révélé aucune interaction avec la mannopine.

Mon travail a consisté à cloner les gènes *motA* et *attC*, purifier les protéines MotA, SocA et AttC et à trouver les conditions de cristallisation des complexes protéines-ligands. J'ai résolu les structures de MotA et SocA ligandées par remplacement moléculaire en utilisant un modèle construit sur le serveur @TOME-2, et celle d'AttC par remplacement moléculaire en utilisant MotA comme modèle. Avec l'aide de Magali Aumont-Nicaise, j'ai déterminé les affinités des trois protéines pour les différentes molécules par microcalorimétrie. J'ai également vérifié ces affinités par suivi d'autofluorescence.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant soumis dans le journal *Journal of Biological Chemistry*.

Structural Basis for High Specificity of Amadori Compound and Mannopine Opine Binding in Bacterial Pathogens

Loïc Marty, Armelle Vigouroux, Magali Aumont-Nicaise, Yves Dessaux, Denis Faure, and Solange Moréra*

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS CEA Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France

Running title: *Selection of mannopine opine and Amadori compound by PBPs*

To whom correspondence should be addressed: Dr Solange Morera, E-mail: solange.morera@i2bc.paris-saclay.fr

Keywords: plant pathogen, periplasmic binding protein, opine, mannopine, DFG/santhopine, glucopine

ABSTRACT

Agrobacterium tumefaciens pathogens genetically modify their host plants to drive the synthesis of opines in plant tumours. Opines are either sugar-phosphodiesters or the products of condensed amino acids with ketoacids or sugars. They are *Agrobacterium* nutrients and imported into the bacterial cell *via* periplasmic binding proteins (PBPs) and ABC-transporters. Mannopine, an opine from the mannityl-opine family, is synthesized from an intermediate named deoxy-fructosyl-glutamine (DFG), which is also an opine and abundant Amadori compound (a name used for any derivative of aminodeoxysugars) present in decaying plant materials. The PBP MotA is responsible for mannopine import in mannopine-assimilating agrobacteria. In the nopaline-opine type agrobacteria strain, SocA protein was proposed as a putative mannopine-binding PBP, and AttC protein was annotated as a mannopine binding-like PBP. Structural data on mannityl-opine-PBP complexes is currently lacking. By combining affinity data with analysis of seven X-ray structures at high resolution, we investigated the molecular basis of MotA, SocA and AttC interactions with mannopine and its DFG precursor. Our work demonstrates that AttC is not a mannopine binding protein, and reveals a specific binding-pocket for DFG in SocA with an affinity in nanomolar range. Hence, mannopine would not be imported into nopaline-type agrobacteria strains. In contrast, MotA binds both mannopine and DFG. We thus defined one mannopine-and two DFG-binding signatures. Unlike mannopine-PBPs, selective DFG-PBPs are present in a wide diversity of bacteria, including Actinobacteria, α-,β-, and γ-proteobacteria, revealing a common role of this Amadori compound in pathogenic, symbiotic and opportunistic bacteria.

Agrobacterium tumefaciens pathogens have adapted a strategy of niche construction (called tumour niche or opine niche) inside the plant hosts. Indeed, they mediate the transfer of a portion of their tumour-inducing (Ti) plasmid, (namely T-DNA), to the plant cell (Gelvin 2003; Pitzschke and Hirt 2010). The T-DNA becomes incorporated into the plant nuclear DNA. T-DNA gene expression drives the synthesis of plant hormones that leads to the formation of a tumour characteristic of the crown-gall disease. Expression of the T-DNA genes in plant tumours also allows the production of novel organic compounds called opines which are either sugar-phosphodiesters or the products of condensed amino acids with ketoacids or sugars (Schell *et al.* 1979; Tempé and Petit 1983; Dessaux, Petit and Tempe 1993; Flores-Mireles, Eberhard and Winans 2012). Opines are specifically utilized as growth substrates by the inciting agrobacteria and confer upon these pathogens an advantage when in competition with other members of the soil microflora for the colonization of the opine-rich environments (Schell *et al.* 1979; Guyon *et al.* 1993; Wilson *et al.* 1995; Oger, Petit and Dessaux 1997; Savka and Farrand 1997; Lang *et al.* 2014). The genes required for opine catabolism (import and degradation) in the agrobacterial pathogens are coded for by their Ti plasmid, but located in segments outside the T-DNA region. Some opines, designated conjugative opines, such as octopine or agrocinopine (actually only the arabinose-2-phosphate moiety of the agrocinopine is recognized) (El Sahili *et al.*

2015), mediate the horizontal transfer (bacterial conjugation) of the Ti-plasmid (Dessaux *et al.* 1998).

In *Agrobacterium*-induced plant tumours, over 20 opines are known and classified into distinct families according to their precursors which are sugars, amino acids and ketoacids. Octopine and nopaline are opines synthesized in a one-step conjugation of the amino acid arginine and a ketoacid (Hack and Kemp 1980; Depicker *et al.* 1982). Unlike octopine and nopaline, mannopine (1-deoxy-mannosyl-glutamine) from the mannityl-opine family is not the result of a one-step formation, since it is formed from a precursor which is also an opine named 1-deoxy-fructosyl-glutamine (DFG) from the chrysopine family (Hong and Farrand 1994; Hong *et al.* 1997). Mannopine synthesis requires the Mas2 enzyme which conjugates fructose and glutamine into DFG followed by the activity of the oxydo-reductase Mas1, which reduces DFG into mannopine (Fig. 1) (Zhu *et al.* 2000). DFG is a peculiar opine, in that this compound is widely available in the environment outside the *Agrobacterium*-induced plant tumour as a product of the decomposition of organic materials, and belongs to a wide class of molecules known as Amadori compounds, a term used for any derivative of aminodeoxysugars (Chilton *et al.* 1995).

In *A. tumefaciens*, the recognition and import of opines is facilitated by periplasmic binding proteins (PBPs) and their associated ATP-binding cassette (ABC) transporters (Schardl and Kado 1983; Kim and Farrand 1997). Structural data on mannityl-opine-PBP complexes is currently lacking. In this study, we investigated and compared the structural and biochemical properties of two PBPs sharing 5% sequence identity, MotA and SocA, which have been associated with the assimilation of mannopine using genetic approaches (mapping of gene regions and defective mutants) and opine uptake/transport experiments (Dessaux, Tempé and Farrand 1987; Hong *et al.* 1993; Oger *et al.* 1998; Baek *et al.* 2003). MotA belongs to the mannopine transport system encoded by the Ti plasmid of the *A. tumefaciens* strain B6 (Fig. 1) (Oger *et al.* 1998). In *A. tumefaciens* strain C58, Ti plasmid genes drive the synthesis (in the plant cells) and assimilation (in the bacterial cells) of the opines agrocinopine and nopaline, but not those of mannopine. Therefore MotA and the mannopine-degrading enzyme MocC are not present in this strain, which cannot grow when mannopine is the sole source of C and N. In contrast, A. tumefaciens strain C58 can grow when DFG is the sole resource (Baek *et al.* 2003). Remarkably, the constitutive expression of the mannopine-degrading enzyme MocC in *A. tumefaciens* C58 conferred upon this strain the capability to grow on mannopine. Baek et al (Baek *et al.* 2003) identified the region of the pAt carrying the *socA* gene (encoding the PBP SocA) and *socB* gene (encoding the associated ABC transporter) as responsible for both DFG and mannopine import in wild-type strain C58 and its MocC-expressing derivative, respectively.

Finally, we used the synthetic opine analogue glucopine which constitutes the sugar part-C2 epimer of mannopine to probe ligand specificity. This work led to the identification of fingerprint sequences that define mannopine- and/or DFG-binding PBPs and provides new insights into the utilization of mannopine and DFG in host-interacting bacteria.

RESULTS

Affinity of MotA, SocA and AttC to Mannopine, DFG and the Synthetic Glucopine– By intrinsic protein fluorescence titration, the dissociation constant (K_D) values between MotA and mannopine, DFG and glucopine, were 4 ± 0.5 nM, 104.5 ± 20 nM and 55.5 ± 9.1 nM respectively (Fig. 2A) showing that MotA is very efficient for mannopine binding. Using isothermal titration calorimetry (ITC), similar K_D values were obtained, i.e. 19.8 ± 3 nM, 99 ± 13 nM and 79.4 ± 3 nM for MotA-mannopine, MotA-DFG and MotA-glucopine respectively (Fig. 2B). For SocA, autofluorescence displayed K_D values of 56.9 ± 10 nM and 2.5 ± 0.4 µM for DFG and glucopine respectively (Fig. 2A). With ITC, they were 74.1 ± 13 nM and 4 ± 0.2 µM respectively, in the same magnitude than those obtained from fluorescence titration (Fig. 2B). No interaction could be measured between SocA and mannopine. The ITC data confirmed the 1:1 binding stoichiometry for both MotA and SocA and indicated a negative enthalpy change for all ligands, suggesting that the binding was enthalpy driven.

Because SocA was not able to bind mannopine, the system transport associated with SocA should not import mannopine in strain C58. Indeed, when no binding of a ligand is observed, there is no import *via* the system transport of the examined PBP. Therefore, we searched among the annotated PBPs in strain C58, whether another PBP could bind mannopine. The PBP AttC also

encoded by the At plasmid of A. tumefaciens C58 was the only PBP annotated as a mannopine binding-like PBP in this strain. Nonetheless, no interaction between AttC and the three ligands was detected by ITC and fluorescence titration measurements.

MotA is a PBP from Cluster D While SocA a PBP from Cluster F–The X-ray structures of the mature monomeric unliganded MotA and the three liganded MotA with mannopine, DFG and glucopine were determined at 2.55 Å, 1.75 Å, 1.9 Å and 1.8 Å resolution respectively (Table 1). The three liganded forms adopt a similar closed conformation (average root mean square deviation (RMSD) of 0.22 Å for all Cα) whereas the unliganded structure shows an open conformation (Fig. 3A-B) as commonly reported for PBPs from clusters B, C, D and F solved with and without a ligand (Oh *et al.* 1993; Planamente *et al.* 2010, 2012; Lang *et al.* 2014; El Sahili *et al.* 2015). A 36° rotation around the hinge region (formed by 2 short β-strands of residues 127-134 and 256-263) of the C-terminal domain (residues 134-256) was observed once the N-terminal domains (residues 31-127 and 263-354) of the unliganded and liganded structures were superimposed (Fig. 3C). The unliganded MotA structure shows that each N-terminal sequence containing a His-tag enters the ligand binding site of a symmetric molecule (Fig. 3D). The monomeric MotA possesses a typical fold of cluster D within the PBP structural classification (Berntsson *et al.* 2010) as SSM-EBI (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm) (Krissenel and Hendrick 2004) reports: RMSD between Cα atoms of MotA and similar PBP structures are over 2.2 Å with sequence identity around 17-29%. The closest structure (RMSD of 1.8 Å over 301 Cα atoms and 32% sequence identity) is that of *A. tumefaciens* Atu4243 in complex with GABA (PDB code 4EUO) (Planamente *et al.* 2012).

The two X-ray structures of the mature monomeric SocA liganded with DFG were obtained at 1.93 and 1.5 Å and that with glucopine at 1.84 Å (Table 1). Although SocA with DFG crystallizes in two different cell parameters from the same space group (one monomer *versus* two monomers in the asymmetric unit), the three SocA-DFG complexes are very similar, displaying an average RMSD of 0.4 Å for all Cα atoms. Moreover, all liganded forms adopt a similar closed conformation (average RMSD for all Cα atoms of 0.46 Å). SocA belongs to cluster F (Berntsson *et al.* 2010) and resembles several PBPs from the same cluster which mainly bind amino acids or derivatives of amino acids such as ArtI from *Caldanaerobacter subterraneus* and STM4351 from *Salmonella enterica*, both in complex with arginine (PDB codes 4YMX and 2Y7I with RMSD of 1.14 Å and 1.2 Å over 207 and 211 Cα atoms respectively) (Stamp *et al.* 2011; Yu *et al.* 2015). The PBP NocT from *A. tumefaciens* in complex with nopaline (PDB code 4POX) (Lang *et al.* 2014) displays with SocA a RMSD of 1.68 Å over 214 Cα atoms, corresponding to a sequence identity of 31%.

MotA Recognizes Mannopine, DFG and the Synthetic Glucopine: The Mannopine/DFG-Binding Signature–Mannopine, DFG and glucopine bound between the two closed lobes of MotA are surrounded by Ser37, Trp41, Gln67, Gln87, Gly89, Asp92, Ser128, Tyr130, Trp235, Arg238, Asp261 and Thr297 residues. The glutamine moiety of the three ligands, sandwiched by Trp41, Tyr130 and Trp235 aromatic residues, makes identical interactions with MotA involving its glutamine side chain with Ser128, Asp261 and Thr297 side chains, its carboxylate part with Arg238 and Ser37 side chains and finally its amino group with the carboxyl group of Asp261 (Figures 4A-C). The sugar moiety of the three ligands makes slightly different interactions implying Ser37, Gln67, Gln87, Gly89, Asp92 and Asp261 (Fig. 4A-C). Upon superposition of the three MotA complexes, the glutamine moiety and the C1 atom of all ligands overlap in contrast to the rest of the ligand. Indeed, the deoxyfructosyl part of DFG adopts an α-pyranosyl conformation cyclized in C6-C2 and the glucopine, although linear, follows the conformation of the DFG with its C2 and C3 carbons and their respective bound hydroxyls at a similar position to those of the sugar part of DFG (Fig. 4D). Though the C2 hydroxyl of the mannopine is shifted by 1.56 Å in DFG and glucopine, it forms a hydrogen bond with Asp261 side chain. Therefore, Asp261 is a critical protein residue as it maintains the glutamine side chain, the main amino atom and the OH of the C2 atom in all ligands. The C2 hydroxyl also interacts with the side chain of Tyr130 in MotA-mannopine complex while it interacts with the side chain of Gln87 in DFG and glucopine complexes. The conformation of the sugar moiety of both DFG and glucopine induces a 1.48 Å shift of Asp92 residue toward the ligand compared to its position in the mannopine complex where the mannopine adopts a linear conformation (Fig. 4D).

The ligand binding sites between MotA and its closest structural homolog (the GABA-binding Atu4243) share four conserved residues only: Tyr130, Trp235, Arg238, and Asp261, which are Tyr123, Trp222, Arg225, Asp248 in Atu4243 (Fig. S1). Atu4243 presents a narrow pocket adapted for a selective GABA-binding. Indeed, both the tryptophan and glutamate at positions 30 and 82 in Atu4243 replacing Ser37 and Gly89 in MotA respectively clash with the sugar moiety of mannopine thus preventing the binding of any longer ligand in Atu4243. Ser128 and Thr297 in interaction with the glutamine moiety of mannopine correspond to Phe121 and Tyr284 in Atu4243, respectively. Both aromatic residues block access to any ligand in this region of Atu4243. Although the large binding site of MotA might accept a GABA molecule which could be held by the four conserved residues with Atu4243, no interaction between MotA and GABA was observed with intrinsic fluorescence and ITC assays, confirming the requirement of aromatic residues contacts restricting the size of the ligand binding site to accommodate a GABA. In contrast, the apparent K_D value of 2.2 ± 0.3 µM for MotA towards glutamine shows that MotA can bind glutamine (Fig. S2). We were thus able to propose two signatures: $S_{37}W_{41}S_{128}W_{235}R_{238}D_{261}T_{297}$ for glutamine binding, and $Q_{87}G_{89}D_{92}Y_{130}D_{261}$ for mannose binding with Asp261 being involved in both. Together, they form the mannopine binding signature.

AttC is a PBP from Cluster D: Fold Comparison with MotA–The structure at 2.49 Å resolution (Table 1) of the mature monomeric unliganded AttC belongs to the cluster D (Berntsson *et al.* 2010) and adopts an open conformation (Fig. S3A). A model of its closed conformation based on MotA-mannopine structure shows that AttC and MotA share four residues in the ligand binding site: Gly99 (Gly89 in MotA), Trp244 (Trp235 in MotA) involved in the ligand stacking, Arg247 (Arg238 in MotA) involved in the binding of the ligand carboxylate group and Asp270 (Asp261 in MotA) which interacts with an amino-group of the ligand. The rest of the mannopine-binding signature is not conserved in AttC in line with the fluorescence and microcalorimetry results. The ligand binding sites of AttC and MotA exhibit almost the same size. However, that of AttC contains several charged and polar residues such as Arg, Asp, Gln, Thr (Fig. S3B).

SocA Specifically Recognizes DFG: The DFG-binding signature–Similarly to what is observed in MotA, the deoxyfructosyl part of the bound DFG in SocA is also an α-pyranosyl conformation cyclized in C6-C2 (Fig. 5A). The DFG bound between the two closed lobes of SocA is surrounded by Phe96, Ala113, Ala114, Gly116, Arg121, Gly134, Leu163, Asp201, Ser223 and Ala226 residues (Fig. 5A). By adopting a bent conformation, the synthetic glucopine shares with DFG the same binding mode involving several Van der Walls contacts and ten protein main chain polar interactions (Figures 5B-C). The position of all their atoms excluding the C6 hydroxyl overlaps (RMSD of 0.22 Å) when both complexed SocA structures are superimposed. Their glutamine moiety interacts with the carbonyl of Ala113 and stacks against Phe96. Their carboxylate group is held by the guanidinium group of Arg121 and two NH of Gly116 and Leu163. Their amino group is maintained by Ala114 main chain and Asp201 side chain. The sugar moiety of both ligands makes four hydrogen bonds with protein main chains and two with side chains (Asp201 and Ser223). We were thus able to discriminate the residues involved in ligand binding *via* their main chain from those *via* their side chain, with Ser223 involved in both. Therefore, $A_{113}A_{114}G_{116}G_{134}L_{163}A_{226}$ defines the main chain-involved binding signature while $M_{52}F_{96}R_{121}D_{201}S_{223}$ the side chain-involved binding signature. Together, they form the DFG binding signature.

Around the glutamine moiety of DFG and glucopine, the ligand binding site of SocA resembles those of amino acid-binding PBPs from cluster F with four conserved residues corresponding to Phe96, Arg121, Ala114 and Asp201 in SocA. As suggested, SocA binds glutamine with an apparent K_D value of 2.1 ± 0.3 µM (Fig. S2). In contrast, longer residues such as arginine will create a steric hindrance with the Met52 side chain in line with the lack of detectable interaction between SocA and arginine by ITC and autofluorescence. Both opine-binding SocA and NocT are distinguishable from their homologs in cluster F due to their binding site accommodating bulkier ligands possessing an amino acid. However, they differ in their ligand binding mode. SocA cannot accept a nopaline molecule due to the presence of the arginine moiety and the presence of the first carboxylate group of its ketoacid moiety which create an additional steric clash with Asp201 (Fig. S4).

NocT does not bind DFG by autofluorescence likely due to the absence of the equivalent Asp201 in SocA which is Ser207 in NocT.

Comparison between MotA and SocA Structures–The selective DFG binding site of SocA shows no similarity with the non-selective one of MotA. Hence, the conformation and orientation of DFG bound in the two ligand binding sites are different (Fig. S5A). Notably, DFG exhibits opposite orientation when SocA and MotA structures are superimposed. Comparison according to the superposed ligands shows no structurally conserved protein residue. However, Arg238 and Asp261 in MotA, and Arg121 and Asp201 in SocA conserve the same function: the arginine guanidinium group makes a salt-bridge with the carboxylate group of the DFG glutamine part while the aspartic acid side chain makes a hydrogen bond with the main amino group of the DFG glutamine part (Fig. S5B). The glutamine moiety of each ligand shares a similar conformation. In contrast, the sugar moiety of DFG in SocA differs in MotA by a 70° rotation around the C1-C2 bond and the compact conformation of the sugar moiety of glucopine in MotA corresponds to a bent conformation in SocA (Fig. S5C).

MotA is Present in a Few Bacteria–About 40 bacterial MotA-homologous PBPs with a threshold set at at least 40% identity were recovered using blastP from NCBI. All redundant sequences were removed and three additional homologous sequences found in *Agrobacterium* genomes of the AgrobacterScope genome library (Genoscope, France) as well as the sequence of AttC were added. The relation tree constructed from 17 sequences reveals different subgroups (Fig. 6). Members of the MotA subgroup sharing more than 89% sequence identity possess the mannopine/DFG binding-signature $S_{37}W_{41}Q_{87}G_{89}D_{92}S_{128}Y_{130}W_{235}R_{238}D_{261}T_{297}$. They belong to four *A. tumefaciens* octopine/mannityl-opine type (B6, AF2428881, TT111 and Ach5) and one agrocinopine/mannityl–opine type (Bo542) strains and to one strain of the plant symbiont *Sinorhizobium fredii*. In addition, two MotA-like deduced proteins from *Rhizobium leguminosarum* and remarkably the β-proteobacterium *Burkholderia* sp. strain PAMC26561 (80% and 74% sequence identity with MotA, respectively) might bind mannopine. Indeed, their binding site only differs by S_{89}/A_{89} instead of G_{89} and E_{92} instead of D_{92}, and modelling revealed that this would not affect the mannopine/DFG binding. All members of the other subgroup in which mannopine/DFG-signature is degenerated are annotated as putative putrescine/spermidine-binding PBPs. The binding signature is also strongly degenerated in AttC in line with the observed 31% sequence identity with MotA.

SocA is Present in Numerous Bacteria–SocA relatives search in the bacterial kingdom (protein database at NCBI) and subsequent phylogenetical analysis reveals over 240 PBPs with conserved DFG binding signature. To refine this analysis, we reconstructed a phylogeny with the SocA-relatives extracted from the complete genome NCBI database only (Fig. 7). The SocA-clade delineated with a solid bootstrap value (100%) encompasses PBPs from α-proteobacteria such as Rhizobiales (*Agrobacterium, Aureimonas, Rhizobium* and *Sinorhizobium*), γ-proteobacteria such as Enterobacteriales (*Klebsiella, Pantoea, Erwinia*) and Actinobacteria (*Arthrobacter*) which all possess the DFG binding signature. Outside the SocA-cluster, the DFG-signature degenerates, but modelling indicates that only the E_{201}/D_{201} side chains variation in the *Micromonospora* sub-branch may affect the DFG binding.

DISCUSSION

This work establishes a structural basis for the high mannopine specificity of the PBP MotA, encoded by the Ti-plasmid of octopine/mannityl opines-type and agrocinopine/mannityl opines-type *Agrobacterium* strains. Mannopine is synthesized from the intermediate DFG, which is a naturally abundant Amadori compound present in decaying plant materials. To date, no DFG transporter has been characterized in a mannopine-assimilating agrobacteria strain.

Using two different biophysical approaches, we showed that the PBP MotA can bind both mannopine and DFG with high affinity (nanomolar range), and with a slightly higher preference for mannopine. With an affinity in the micromolar range, MotA also binds the amino-acid glutamine. Thus, MotA mainly contributes to the importation of mannopine as a specific nutrient and could also contribute to that of DFG. Phylogenetical and structural data revealed the presence of a single copy of the *motA* gene among α-proteobacteria that are *Rhizobiaceae* (*Agrobacterium*, *Sinorhizobium* and *Rhizobium*). Notably, a *motA* gene orthologue was identified in the β-proteobacterium *Burkholderia* sp. PAMC 26561 indicating that this strain could also take up

mannopine and DFG. To our knowledge, mannopine is only produced by T-DNA transformed plant cells, suggesting that non-pathogenic bacteria which have acquired mannopine-importation and assimilation may live in host plants infected by *A. tumefaciens*, which is in agreement with observations in engineered plants producing opines (Oger *et al.* 2004). However, in tumours, these non-pathogenic bacteria would probably not outcompete the pathogenic agrobacteria due to the production of a wide variety of opines in the tumour niche. As previously shown (Lang *et al.* 2014), binding and assimilation of all these opines contribute to the fitness of pathogenic agrobacteria in plant tumours.

Using ITC and autofluorescence, we clearly showed that SocA cannot bind mannopine. Conversely, Baek *et al.* (Baek *et al.* 2003) observed that the genomic region of the At plasmid of strain C58 coding for the PBP SocA and its membrane transporter mediates mannopine import, suggesting that SocA may bind mannopine. However, the strain C58 lacks the gene encoding the enzyme MocC that degrades mannopine into DFG. Within the frame of the concept of the opine niche (Lang *et al.* 2014), the selective pressure that leads to the ability of strain C58 to assimilate mannopine without using it as a nutrient remains elusive, especially considering that this strain is also lacking the mannopine synthesis genes on the T-DNA of the Ti plasmid. A possibly explanation for this discrepancy lies in the sources of mannopine. Mannopine used in the present study was checked by mass spectrometry and from the same lab-made, synthetic batch used in previously reported, mannopine uptake experiments (Dessaux, Tempé and Farrand 1987; Hong *et al.* 1993). Mannopine used in Baek *et al.* (Baek *et al.* 2003) was at this time of commercial origin, and possibly contaminated by residual amount of precursors, as no control of its purity was reported. In contrast to mannopine, we observed that SocA binds DFG with a higher affinity (nanomolar range) than previously reported (micromolar range) (Sakaguchi, Ferri and Sode 2005). The SocA ligand pocket seems pre-formed to selectively accommodate DFG *via* several protein main chains interactions. The rigid binding site architecture is not appropriate for mannopine or any extended ligand, which would create steric clashes with the sugar in a modelled mannopine. Furthermore, to be accommodated in SocA, the bound synthetic opine analogue glucopine must adopt a bent conformation that is not possible for mannopine. We propose the structure of SocA as a reference model to understand the selective DFG-binding mode among bacterial PBPs. Phylogenetic and structural data have shown that SocA is conserved (between 70 and 100% sequence identity) in different bacterial phyla (Rhizobiales, Enterobacteriales and Actinobacteria), and that PBPs belonging to other clusters could bind DFG with a similar binding mode to SocA. This wide occurrence of SocA PBPs correlates with the abundance of DFG in nature. It is tempting to speculate that DFG is associated with a selective pressure towards the acquisition of binding, transport and degradation functions in micro-organisms. Bacteria that have evolved a SocA-like PBP could therefore benefit from a marked selective advantage in DFG-rich environments. Although the octopine/mannityl-opines type strains, such as B6 or Ach5, possess MotA to bind DFG and maybe import it, they also possess SocA on their At plasmid. The DFG-binding capability of MotA is likely to be a relatively promiscuous event as the *motA* gene is located in a Ti plasmid region exclusively involved in mannopine degradation. Nevertheless, MotA and SocA both display a strong affinity for the Amadori compound. The DFG sugar moiety can adopt linear and cyclic conformations, the latter being the common form observed in both PBPs.

Although the structure of the PBP AttC from the nopaline-type C58 strain belongs to the same structural cluster as MotA, we could not measure any interaction between AttC and mannopine or DFG. Moreover, AttC appears in the MotA phylogenic tree in an evolutionarily remote branch with respect to the MotA clade and does not harbor the mannopine-binding motif. Taken together these data should lead to a revision of the automatic annotation of AttC which has been predicted as a mannopine-binding like protein. This is in line with the fact that the *A. tumefaciens* strain C58 is not able to catabolize mannopine. The AttC binding site which is rich in arginine, aspartate and polar residues suggests that AttC may be able to bind a ligand possessing branched carboxylate and amino groups. Precise ligand identification will enable an understanding of the role of this PBP and provide new insights on the diversity of ligands bound to PBPs from cluster D (Berntsson *et al.* 2010).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Synthesis and purification of opines– Mannopine was synthesized using L-glutamine and D-mannose as precursors in the presence of sodium hydrogencarbonate as described by Tate and *al.* (Tate *et al.* 1982) while glucopine was synthesized using L-glutamine and D-glucose. DFG was synthesized using L-glutamine and D-glucose as described by Chilton and *al.* (Chilton *et al.* 1995) Solutions of mannopine and DFG were checked by mass spectrometry (Fig. S6).

Cloning, expression and purification of MotA, SocA and AttC–The primers 5'-CCCCCCATATGGATGTGGTTATTGCCTCT TCAGGCG and 5'-CCCCCGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTG GTGGTGGCGAGATAGGCGCACGTTGTCG TA were used to PCR-amplify the *motA* gene from *A. tumefaciens* B6 without the signal sequence. The amplicon was cloned into pET-28b. The synthetic genes (Genscript) coding for the mature SocA and AttC were inserted into pET-28b and pET-29a, respectively. *E. coli* BL21 pLysS were transformed either by pET-28b-*motA* or pET-28b-*socA* and *E. coli* Rosetta pLysS by pET-29a-*attC*. Cells were grown at 37°C in LB broth supplemented with 0.5 mM IPTG for protein production. Cells were centrifuged, resuspended in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 20 mM imidazole, 500 mM NaCl buffer, and disrupted by sonication. After centrifugation at 20 000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was loaded onto a 5 mL Ni-Trap column (GE Healthcare). Protein elution was performed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. Protein fractions were loaded onto a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl.

Crystallization and structure determination–Crystallization conditions (Table 1) for liganded MotA and SocA (molar ratio of protein:ligand used was 1:5), unliganded MotA and AttC were screened using the QIAGEN kits and manually optimized. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (paraffin oil or 22% (w/v) PEG 400) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA I and II beamlines at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France). Data collection and processing statistics are given in Table 1. All structure determinations were performed by molecular replacement (MR) with PHASER (McCoy *et al.* 2007). The coordinates of the N-terminal (residues 31 to 128 and 260 to 310) and the C-terminal (residues 131 to 258 and 324 to 352) domains of a model from @TOME-2meta-server (Pons and Labesse 2009) was used for MotA-mannopine structure. Structures of the other liganded forms and the unliganded-form of MotA were determined using MotA-mannopine coordinates. Structure determination of both SocA-DFG complexes and SocA-glucopine complex was performed using the coordinates of the N-terminal (residues 43 to 133 and 227 to 270) and the C-terminal (residues 138 to 222) domains of a SocA model from @TOME-2 (Pons and Labesse 2009). AttC structure was determined using the N-terminal and the C-terminal domains of MotA as a search model. Refinements were performed with BUSTER-2.10 (Blanc *et al.* 2004) with NCS restraints when necessary and TLS groups. All electron density maps were evaluated using COOT (Emsley and Cowtan 2004). Refinement details are shown in Table 1. Molecular graphics images were generated using PYMOL (http://www.pymol.org).

K_D measurements by fluorescence titration and microcalorimetry–Ligands bound to MotA, SocA and AttC were monitored by autofluorescence by excitating the proteins at a wavelength of 295 nm and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophans at 335 nm. All experiments were performed at 24°C in triplicates in 50 mM Tris-HCl pH 8 and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (1 µM) and increasing concentrations of ligand using a Tecan infinite M1000 PRO microplate reader (Tecan Group SA). Each ligand has no emission signal at 335 nm. The data were analyzed using Origin 7 software (ORIGIN) and fitted to the equation $f=\Delta Fluorescence_{max}*abs(x)/(KD+abs(x))$.

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal Llc (Northampton, MA). The experiments were carried out at 20°C in 50 mM Tris-HCl pH 8 and 150 mM NaCl (same buffer as fluorescence titration). Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) was 50 µM. 19 injections of 2 µl of the ligand solution at 500 µM, were performed at 180 s intervals while stirring at 1000 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with the software supplied by MicroCal (ORIGIN). This software uses the relationship between the heat generated by each injection and ΔH (enthalpy change in $Kcal.mol^{-1}$), Ka (the association binding constant in M^{-1}), n (the number of binding sites), total

protein concentration and free and total ligand concentrations.

Phylogenetic analysis–Sequences were analyzed using blastP from NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Alignements of MotA/SocA and related sequences were conducted using the ClustalW software. Relationship tree was build using the MEGA software, 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.

Acknowledgments: LM was supported by ANR-Blanc SENSOR (ANR-12-BSV8-0003-01/02/03) and all other authors by CNRS and ANR-12-BSV8-0003-01/02/03. This work has benefited from the I2BC crystallization platform and @TOME-2, both supported by FRISBI ANR-10-INSB-05-01. We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposals ID 20130869 and 20140774) in using Proxima beamlines. We are grateful to Gavin Fox for critical reading of the manuscript.
The atomic coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank (PDB) under accession codes 5L9P (free-liganded MotA), 5L9G (MotA with mannopine), 5L9I (MotA with DFG), 5L9L (MotA with glucopine), 5L9M (SocA with DFG at 1.93 Å resolution), 5LOM (SocA with DFG at 1.5 Å resolution), 5L9O (SocA with glucopine) and 5L9S (free-liganded AttC).

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Author contributions: YD provided the mannopine, DFG and glucopine compounds and information on mannopine and DFG metabolism. LM and SM performed all the crystallography work. LM and AV performed the fluorescence assays. MAN performed the microcalorimetry experiments. LM, DF and SM performed the phylogenetic analysis. SM wrote the manuscript. All the authors discussed the results and contributed to the writing of the manuscript.
Abbreviations: periplasmic binding proteins, PBPs; deoxy-fructosyl-glutamine, DFG.

REFERENCES

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

2. Gelvin, S. B. (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 16–37, table of contents

3. Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J. P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F., and Villarroel, R. (1979) Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host. Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci. 204, 251–66

4. Tempé, J., and Petit, A. (1983) La piste des opines. in Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. (Pühler, A. ed), pp. 14–32

5. Dessaux, Y., Petit, A., and Tempe, J. (1993) Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. Phytochemistry. 34, 31–38

6. Flores-Mireles, A. L., Eberhard, A., and 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

7. Wilson, M., Savka, M. A., Hwang, I., Farrand, S. K., and Lindow, S. E. (1995) Altered Epiphytic Colonization of Mannityl Opine-Producing Transgenic Tobacco Plants by a Mannityl Opine-Catabolizing Strain of Pseudomonas syringae. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2151–8

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

9. Oger, P., Petit, A., and Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. Nat. Biotechnol. 15, 369–72

10. Guyon, P., Petit, A., Tempé, J., and Dessaux, Y. (1993) Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading Agrobacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 92–98

11. Lang, J., Vigouroux, A., Planamente, S., El Sahili, A., Blin, P., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Moréra, S., and Faure, D. (2014) Agrobacterium uses a unique ligand-binding mode for trapping opines and acquiring a competitive advantage in the niche construction on plant host. PLoS Pathog. 10, e1004444

12. El Sahili, A., Li, S.-Z., Lang, J., Virus, C., Planamente, S., Ahmar, M., Guimaraes, B. G., Aumont-Nicaise, M., Vigouroux, A., Soulère, L., Reader, J., Queneau, Y., Faure, D., and Moréra, S. (2015) A Pyranose-2-Phosphate Motif Is Responsible for Both Antibiotic Import and Quorum-Sensing Regulation in Agrobacterium tumefaciens. PLOS Pathog. 11, e1005071

13. Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K., and Murphy, P. J. (1998) Opines and opine-like molecules involved in plant- Rhizobiaceae interactions. in The rhizobiaceae (Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P. J. J. eds), pp. 173–197, 10.1007/978-94-011-5060-6

14. Hack, E., and Kemp, J. D. (1980) Purification and Characterization of the Crown Gall-specific Enzyme, Octopine Synthase. Plant Physiol. 65, 949–55

15. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., and Goodman, H. M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl. Genet. 1, 561–73

16. Hong, S. B., and Farrand, S. K. (1994) Functional role of the Ti plasmid-encoded catabolic mannopine cyclase in mannityl opine catabolism by Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 176, 3576–83

17. Hong, S. B., Hwang, I., Dessaux, Y., Guyon, P., Kim, K. S., and Farrand, S. K. (1997) A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by Agrobacterium strains. J. Bacteriol. 179, 4831–40

18. Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., and Winans, S. C. (2000) The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. J. Bacteriol. 182, 3885–3895

19. Chilton, W. S., Stomp, A.-M., Beringue, V., Bouzar, H., Vaudequin-dransart, V., Petit, A., and Dessaux, Y. (1995) The chrysopine family of amadori-type crown gall opines. Phytochemistry. 40, 619–628

20. Schardl, C. L., and 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

21. Kim, H., and 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

22. Dessaux, Y., Tempé, J., and Farrand, S. K. (1987) Genetic analysis of mannityl opine catabolism in octopine-type Agrobacterium tumefaciens strain 15955. MGG Mol. Gen. Genet. 208, 301–308

23. Hong, S. B., Dessaux, Y., Chilton, W. S., and Farrand, S. K. (1993) Organization and regulation of the mannopine cyclase-associated opine catabolism genes in Agrobacterium tumefaciens 15955. J. Bacteriol. 175, 401–10

24. Oger, P., Kim, K.-S., Sackett, R. L., Piper, K. R., and Farrand, S. K. (1998) Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of traR, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. Mol. Microbiol. 27, 277–288

25. Baek, C.-H., Farrand, S. K., Lee, K.-E., Park, D.-K., Lee, J. K., and Kim, K.-S. (2003) Convergent evolution of Amadori opine catabolic systems in plasmids of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol. 185, 513–524

26. Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F., and Kim, S. H. (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. J. Biol. Chem. 268, 11348–55

27. Planamente, S., Vigouroux, A., Mondy, S., Nicaise, M., Faure, D., and Moréra, 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, 30294–30303

28. Planamente, S., Mondy, S., Hommais, F., Vigouroux, A., Morera, S., and Faure, D. (2012) Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. Mol. Microbiol. 86, 1085–1099

29. Berntsson, R. P. a, Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D. J., and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. FEBS Lett. 584, 2606–2617

30. Krissenel, E., and Hendrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60, 2256–2268

31. Stamp, A. L., Owen, P., El Omari, K., Lockyer, M., Lamb, H. K., Charles, I. G., Hawkins, A. R., and Stammers, D. K. (2011) Crystallographic and microcalorimetric analyses reveal the structural basis for high arginine specificity in the Salmonella enterica serovar Typhimurium periplasmic binding protein STM4351. Proteins. 79, 2352–7

32. Yu, J., Ge, J., Heuveling, J., Schneider, E., and Yang, M. (2015) Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 5243–8

33. Oger, P. M., Mansouri, H., Nesme, X., and 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

34. Sakaguchi, A., Ferri, S., and Sode, K. (2005) SocA is a novel periplasmic binding protein for fructosyl amino acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1074–80

35. Tate, M. E., Ellis, J. G., Kerr, A., Tempé, J., Murray, K. E., and Shaw, K. J. (1982) Agropine: a revised structure. Carbohydr. Res. 104, 105–120

36. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658–674

37. Pons, J.-L., and Labesse, G. (2009) @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. Nucleic Acids Res. 37, W485–91

38. Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S. M., and Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60, 2210–21

39. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60, 2126–32

40. Baek, C. H., Farrand, S. K., Park, D. K., Lee, K. E., Hwang, W., and 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, 221–233

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Metabolism of deoxyfructosylglutamine (DFG, orange) and mannopine (green) in transformed plant cells and the two *A. tumefaciens* B6 (up) and C58 (down) strains. In plant tumour cells, the genes *mas2* (dark red) and *mas1* (blue) responsible for the biosynthesis of DFG and mannopine respectively, are located on the T-DNA transferred from the *A. tumefaciens* B6 Ti plasmid. In *A. tumefaciens* B6, the genes (*motA-D*) coding for mannopine import on the Ti plasmid are shown in purple. Mannopine is converted into DFG which in turn is deconjugated into glutamine and fructose by the reverse synthesis reactions. No DFG transporter has been identified yet. In *A. tumefaciens* C58 strain, mannopine and DFG were proposed to be both transported by the products of *socAB* (slate) located on the At plasmid. DFG is degraded by the products of *socCD* into glutamine and fructose.(Baek *et al.* 2005) AttC (gene in light brown) was annotated as a mannopine-binding like protein.

FIGURE 2. ITC and fluorescence K_D measurements. The top graphs of MotA (A) and SocA (B) microcalorimetry experiments show heat differences upon injection of ligand (top panel) and integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single binding model using Microcal ORIGIN (low panel). The lower graphs show fluorescence monitoring upon titration with each ligand and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicates. (C) Calculated parameters for each experiment are indicated.

FIGURE 3. Ribbon representation of MotA structures: (A) with mannopine in green, (B) unliganded. Lobes I and II are shown in deep-purple and pink, respectively, and the hinge region in red. (C) Comparison between the open unliganded (deep-purple) and the closed liganded (green) forms of MotA. (D) Packing of the unliganded MotA crystal: the N-terminus His_6-tag (shown in sticks) of a molecule (deep purple) of the asymmetric unit enters the ligand binding site of its symmetric molecule (green).

FIGURE 4. Mannopine (A), DFG (B) and glucopine (C) bound to the binding site of MotA are shown in grey/green, grey/orange and grey/deep-blue sticks respectively and in their annealing Fo-Fc omit map contoured at 4σ. Hydrogen bonds between MotA and each ligand are shown as dashed lines in black (distance below 3.2 Å) and in green (distance between 3.2 and 3.4 Å). (D) Superposition of the three ligands in the binding site of MotA. The residues in green interact with mannopine, in orange with DFG and in deep-blue with glucopine.

FIGURE 5. DFG (A) and glucopine (B) bound to the binding site of SocA are shown in grey/orange and grey/deep-blue sticks respectively and in their annealing Fo-Fc omit map contoured at 4σ. Hydrogen bonds between SocA and each ligand are shown as dashed lines in black (distance below 3.2 Å) and in green (distance between 3.2 and 3.4 Å). (C) Superposition of both ligands in the SocA binding site. The residues in orange interact with DFG and in deep-blue with glucopine.

FIGURE 6. MotA phylogeny and mannopine-binding signature. The displayed tree was rooted with AttC sequence. For each protein or protein cluster, the residues which are identical to (black) and different from (red) those involved in the binding of the glutamine part (purple box) and sugar part (green box) of mannopine are indicated.

FIGURE 7. SocA phylogeny and DFG-binding signature. The branches are collapses when the clade is composed of proteins from a same genus and are colored in red for α-proteobacteria, purple for β-proteobacteria, blue for γ-proteobacteria and green for Actinobacteria. For each protein or protein cluster, the residues which are identical to (black) and different from (red) those involved in the binding of DFG *via* their main chain (orange box) and *via* their side chain (purple box) are indicated.

TABLE 1. Crystallization conditions, crystallographic data and refinement parameters

Protein	MotA-mannopine	MotA-DFG	MotA-glucopine	MotA	SocA-DFG		SocA-glucopine	AttC
Crystallization conditions	28 % PEG 4K, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $CaCl_2$	24 % PEG 4K, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M $CaCl_2$	30 % PEG 4K, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $CaCl_2$	2.08 M $(NH_4)_2SO_3$, 0.1 M sodium acetate pH 4.6, 1.25% isopropanol	30 %PEG 4K	30 % PEG 4K, 0.1 M Tris pH 8.5	36 % PEG 4K, 0.1 M HEPES pH 7.5	40 % PEG 4K, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M ammonium acetate
PDB code	**5L9G**	**5L9I**	**5L9L**	**5L9P**	**5L9M**	**5LOM**	**5L9O**	**5L9S**
Space group Cell parameters (Å,°)	$P4_1$ *a* = 71.2 *b* = 71.2 *c* = 134.8	$P4_1$ *a* = 71.4 *b* = 71.4 *c* = 134.1	$P4_1$ *a* = 70.8 *b* = 70.8 *c* = 133.2	$P2_12_12$ *a* = 64.4 *b* = 119 *c* = 111.2	$P2_1$ *a* = 39.7 *b* = 62.3 *c* = 43.4 *β* = 105.6	$P2_1$ *a* = 39.6 *b* = 62 *c* = 84.9 *β* = 101.3	$P2_1$ *a* = 39.6 *b* = 62.3 *c* = 84.2 *β* = 101.4	$P2_12_12$ *a* = 48.0 *b* = 118.4 *c* = 121.0
Resolution (Å)	50-1.75 (1.91-1.75)	50-1.9 (2.01-1.9)	50-1.8 (1.9-1.8)	50-2.55 (2.69-2.55)	50-1.93 (2.05-1.93)	50-1.5 (1.59-1.5)	50-1.84 (1.95-1.84)	50-2.49 (2.64-2.49)
No. of observed reflections	305979 (45863)	236219 (37573)	269966 (42154)	163732 (24714)	45521 (7095)	431996 (66626)	163279 (17975)	124479 (18717)
No. of unique reflections	67490 (10824)	52621 (8407)	60610 (9499)	28729 (4446)	14862 (2278)	64331 (10179)	33762 (4597)	24641 (3745)
R_{sym} (%)	8.3 (68)	6.4 (88.8)	9.3 (72.1)	17 (119.8)	6.1 (51)	10.4 (70.6)	7.2 (53)	11.5 (125.9)
Completeness (%)	99.8 (99.5)	99.7 (99)	99.4 (96.6)	99.3 (96.7)	96.5 (92.2)	99.2 (97.2)	96.3 (81.4)	99 (95.2)
I/σ	9.4 (1.7)	11.9 (1.3)	8.6 (1.2)	7.3 (1.1)	11.1 (2.4)	11.5 (2.1)	12.7 (1.9)	11.6 (1.4)
$CC_{1/2}$	99.5 (67.2)	99.8 (57.6)	99.4 (60.4)	99.3 (82.4)	99.7 (77.7)	99.7 (85.6)	99.7 (90.2)	99.7 (60.6)
R_{cryst} (%)	17.7	17.7	20.5	19.2	16.2	19	21.8	19
R_{free} (%)	20.8	20.6	24.	22.9	19.5	22.3	25.2	23.3
rms bond deviation (Å)	0.01	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.009	0.01
rms angle deviation (°)	0.96	1.0	1.06	1.14	1.04	1.0	1.02	1.15
Average B ($Å^2$) protein ligand solvent	 46.9 31.5 50.6	 52.6 44.7 52.6	 38.9 33.6 43	 60.2 71.8	 42.4 29.5 53.9	 18.7 10.8 30.2	 42.8 35.7 44.1	 64.9 33.6

Values for the highest resolution shell are in parentheses

$CC_{1/2}$ = percentage of correlation between intensities from random half-dataset (P. A. Karplus, K. Diederichs, Science 2012, 336, 1030–1033).

Figure 1

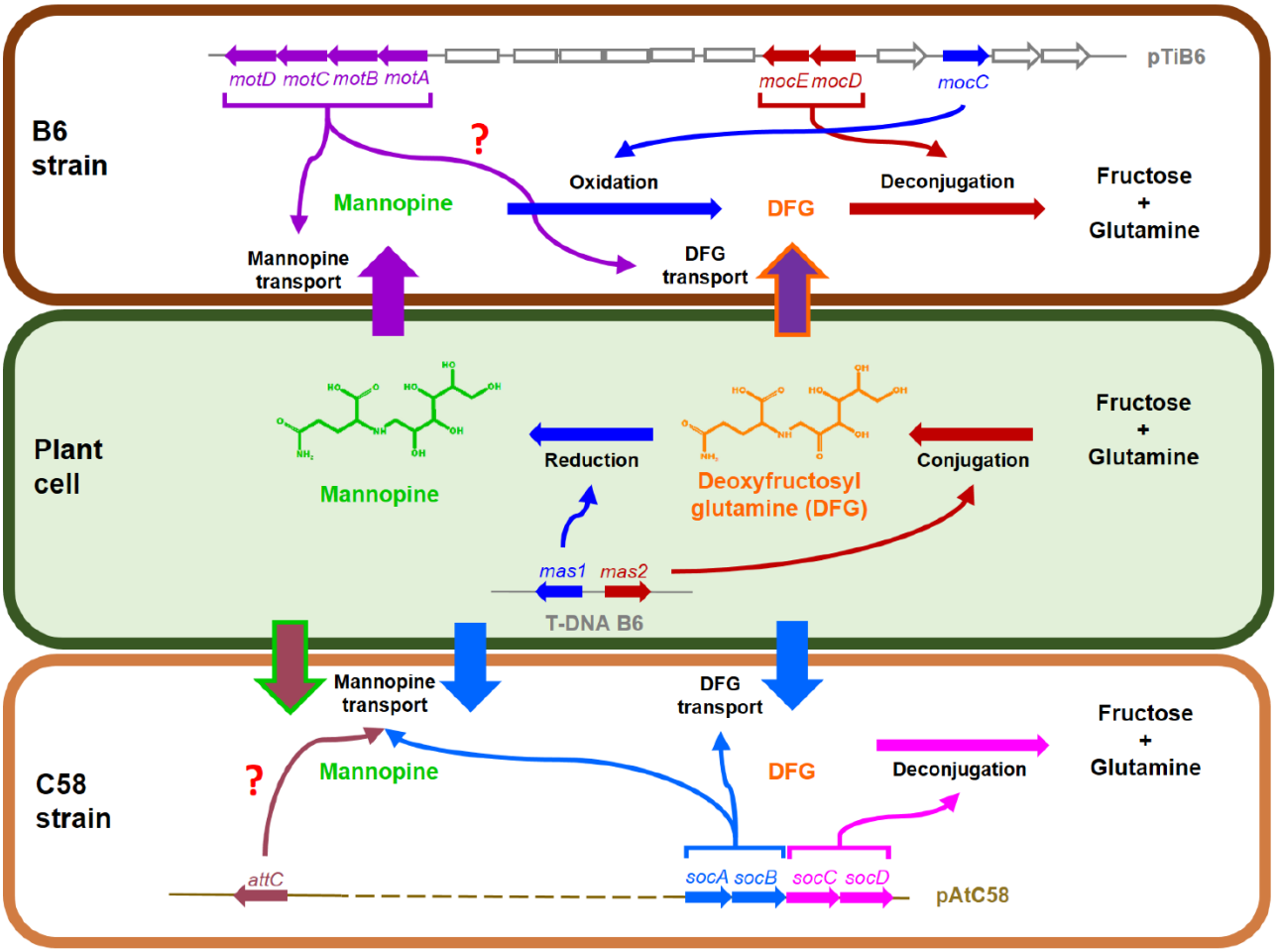
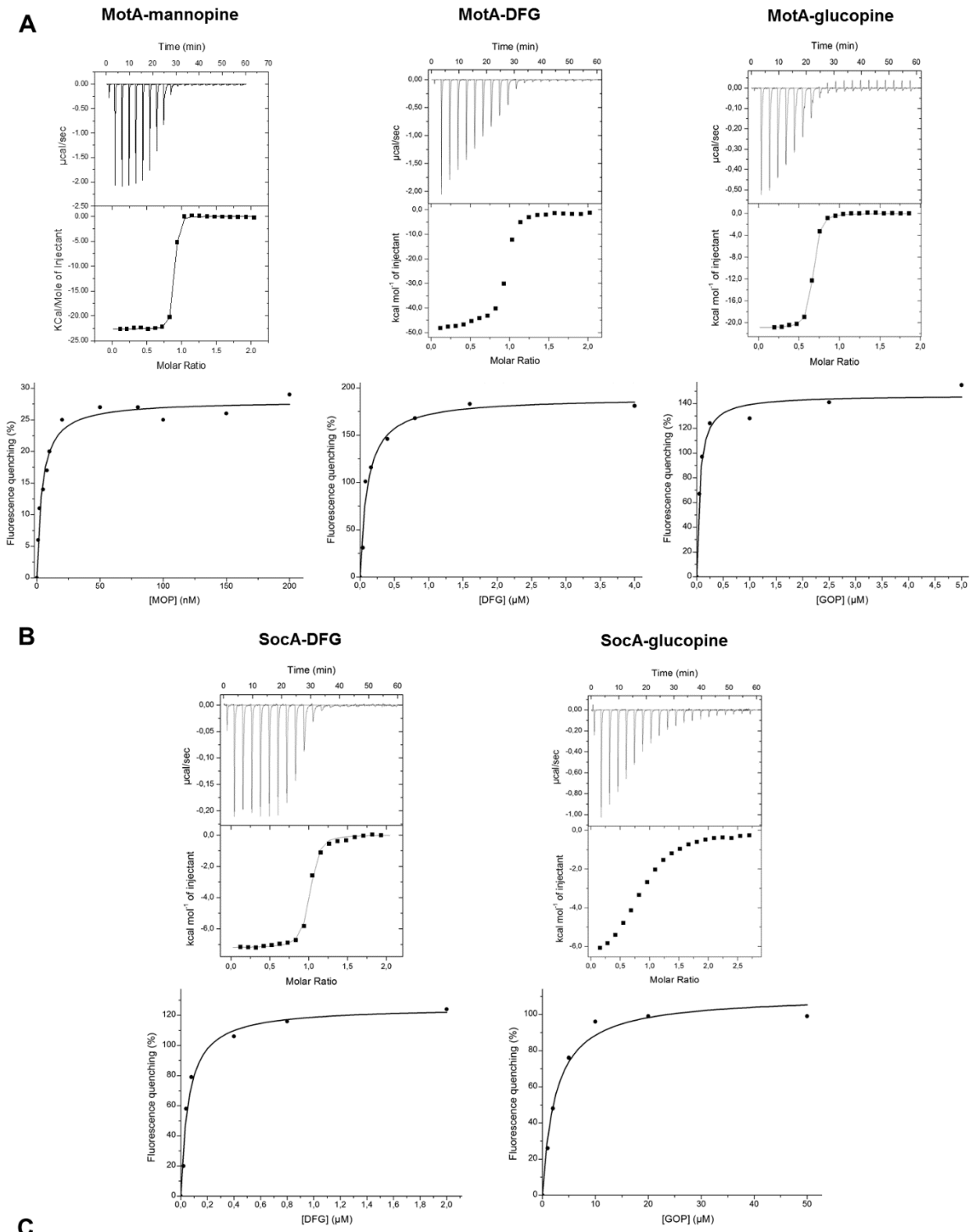

B6
strain
motD motC motB motA
mocE mocD
mocC
pTiB6
?
Mannopine
Oxidation
DFG
Deconjugation
Fructose
+
Glutamine
Mannopine
transport
DFG
transport
Plant
cell
Mannopine
Reduction
Deoxyfructosyl
glutamine (DFG)
Conjugation
Fructose
+
Glutamine
mas1 mas2
T-DNA B6
Mannopine
transport
DFG
transport
C58
strain
?
Mannopine
DFG
Deconjugation
Fructose
+
Glutamine
attC
socA socB socC socD
pAtC58

Figure 2



C

	FLUORESCENCE			ITC					
	Kd (nM)	Bmax	R²	Kd (nM)	N	Enthalpy (ΔH) (cal/mol)	Entropy (ΔS) (cal/mol/deg)	Entropic contribution (TΔS) (cal/mol)	Free enthalpy (ΔG) (cal/mol)
MotA-MOP	4 ±0.5	28	0.98	19.8 ±3	0.845	-22620 ±78.3	-41.9	-12282.9	-10337
MotA-DFG	104.5 ±20	189.8	0.974	99.0 ±13	0.916	-47350 ±463.6	-129	-37816.3	-9533.6
MotA-GOP	55.5 ±9.1	146.9	0.985	79.4 ±3	0.963	-13780 ±31.7	-14.5	-4250.6	-9529.3
SocA-DFG	56.9 ±10	125.5	0.982	74.1 ±13	0.972	-7208 ±62.9	8.03	2353.9	-9562
SocA-GOP	2485 ±410	110.5	0.986	4000 ±200	0.849	-12250 ±130.8	-17.1	-5012.8	-7237.1

Figure 3

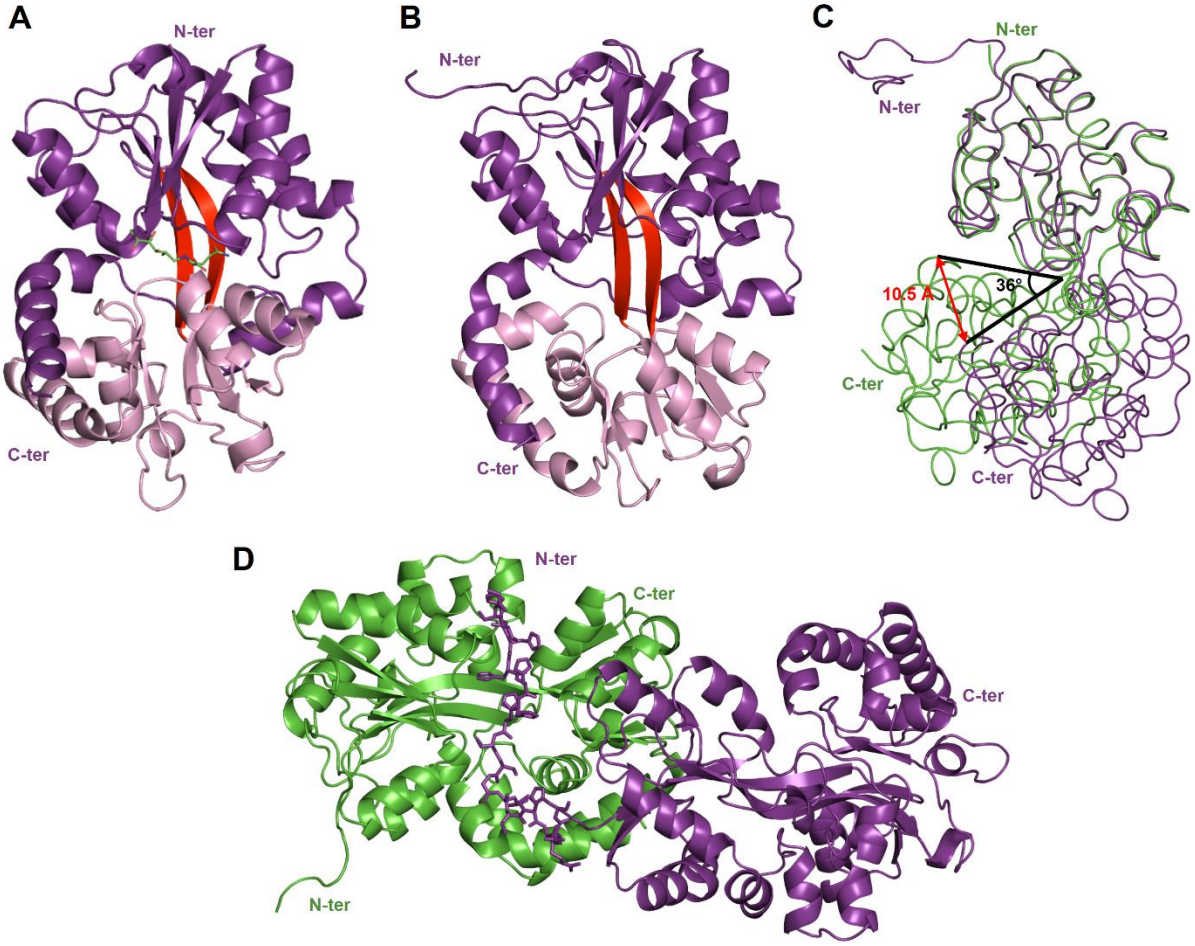

A
N-ter
C-ter
B
N-ter
C-ter
C
N-ter
N-ter
10.5 Å
36°
C-ter
C-ter
D
N-ter
C-ter
C-ter
N-ter

Figure 4

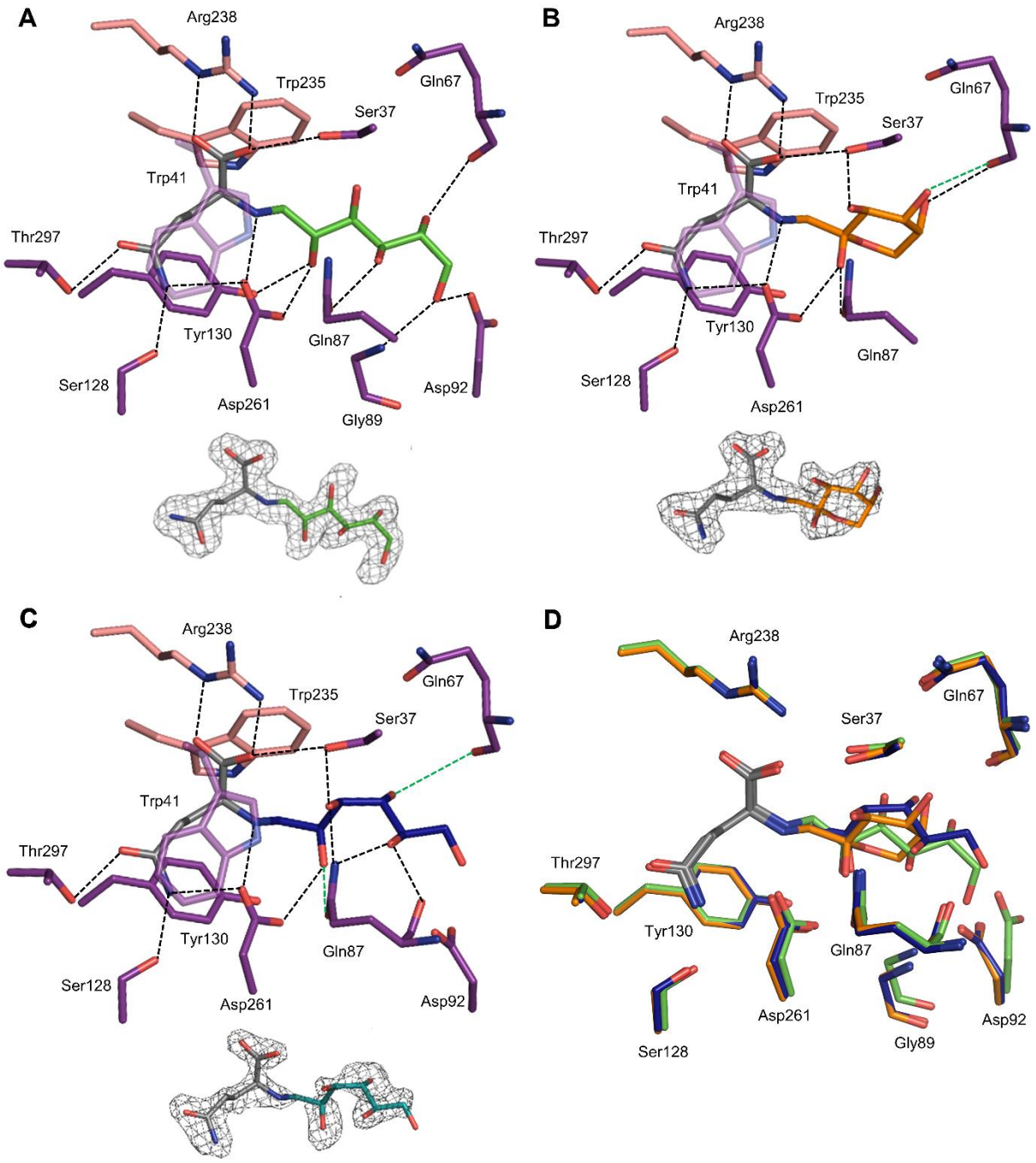

A
Arg238
Trp235
Gln67
Ser37
Trp41
Thr297
Tyr130
Gln87
Ser128
Asp261
Asp92
Gly89
B
Arg238
Trp235
Gln67
Ser37
Trp41
Thr297
Tyr130
Gln87
Ser128
Asp261
C
Arg238
Trp235
Gln67
Ser37
Trp41
Thr297
Tyr130
Gln87
Ser128
Asp261
Asp92
D
Arg238
Gln67
Ser37
Thr297
Tyr130
Gln87
Asp261
Asp92
Gly89
Ser128

Figure 5

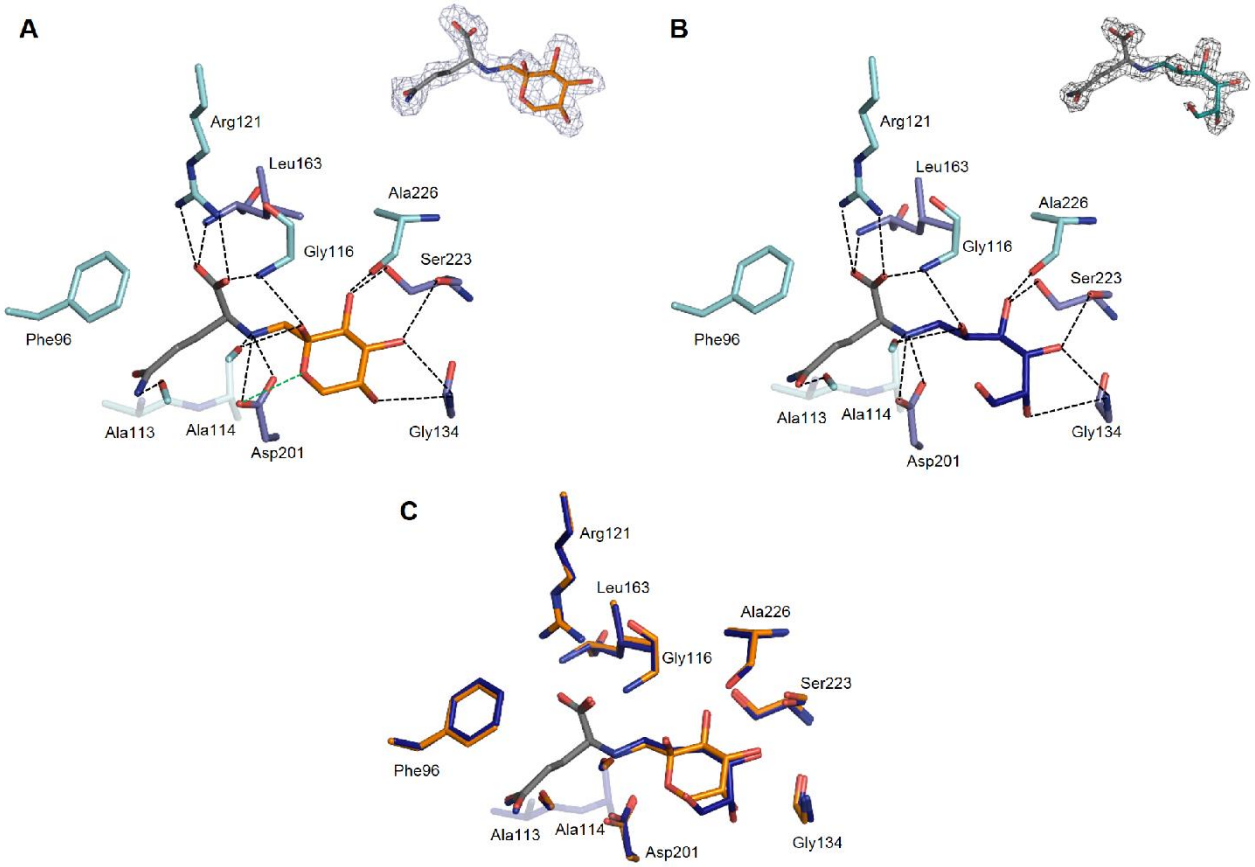

A
Arg121
Leu163
Ala226
Gly116
Ser223
Phe96
Ala113
Ala114
Asp201
Gly134
B
Arg121
Leu163
Ala226
Gly116
Ser223
Phe96
Ala113
Ala114
Asp201
Gly134
C
Arg121
Leu163
Ala226
Gly116
Ser223
Phe96
Ala113
Ala114
Asp201
Gly134

Figure 6

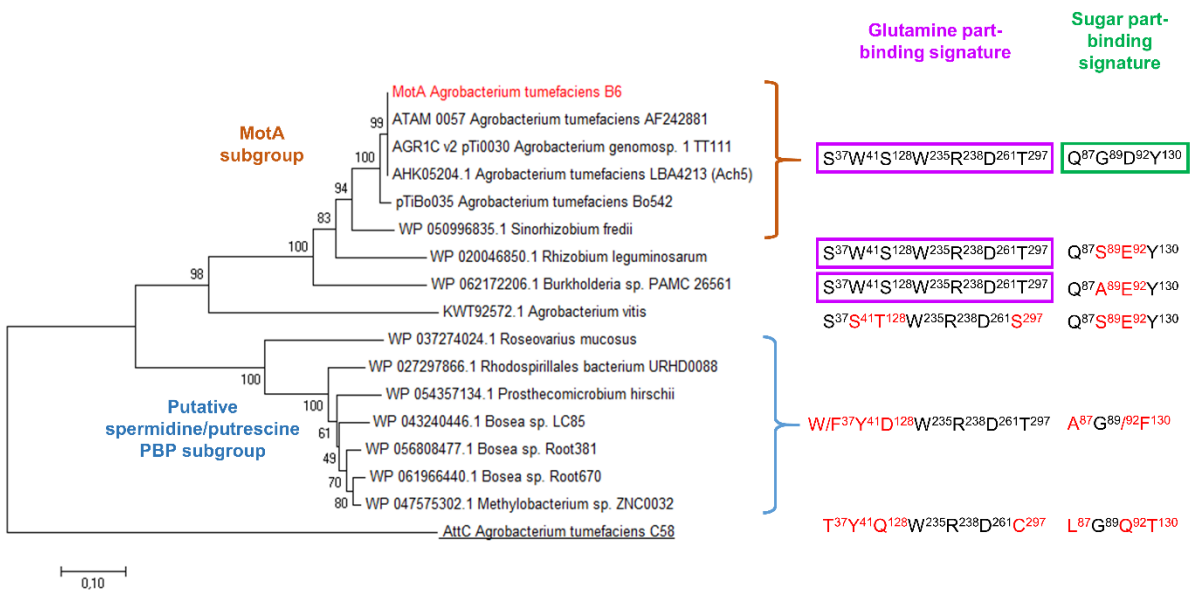
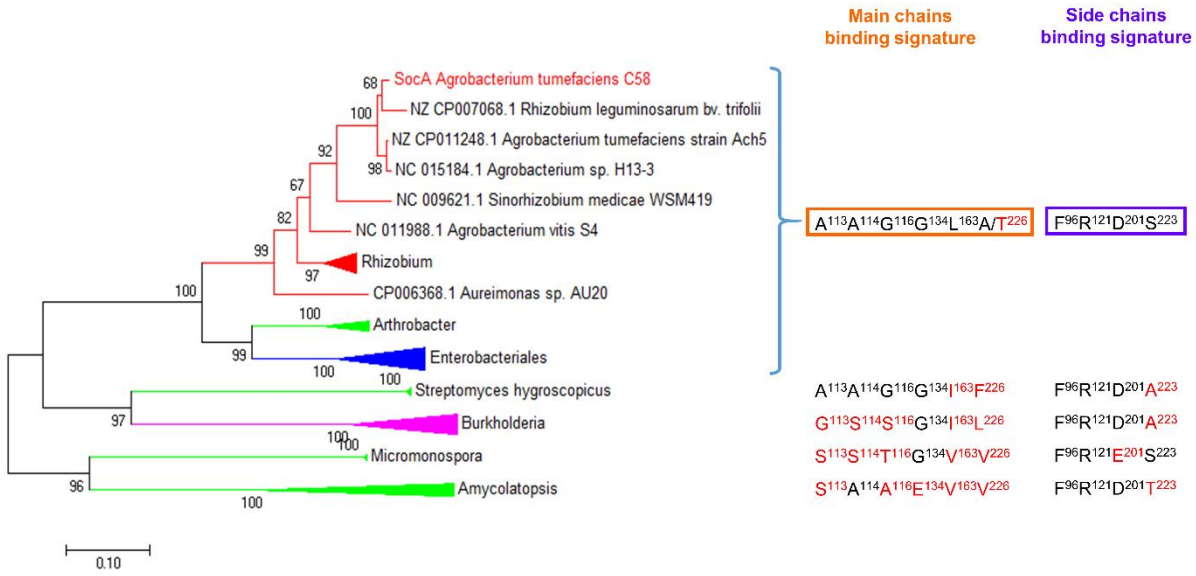


Figure 7



SUPPLEMENTARY FIGURES

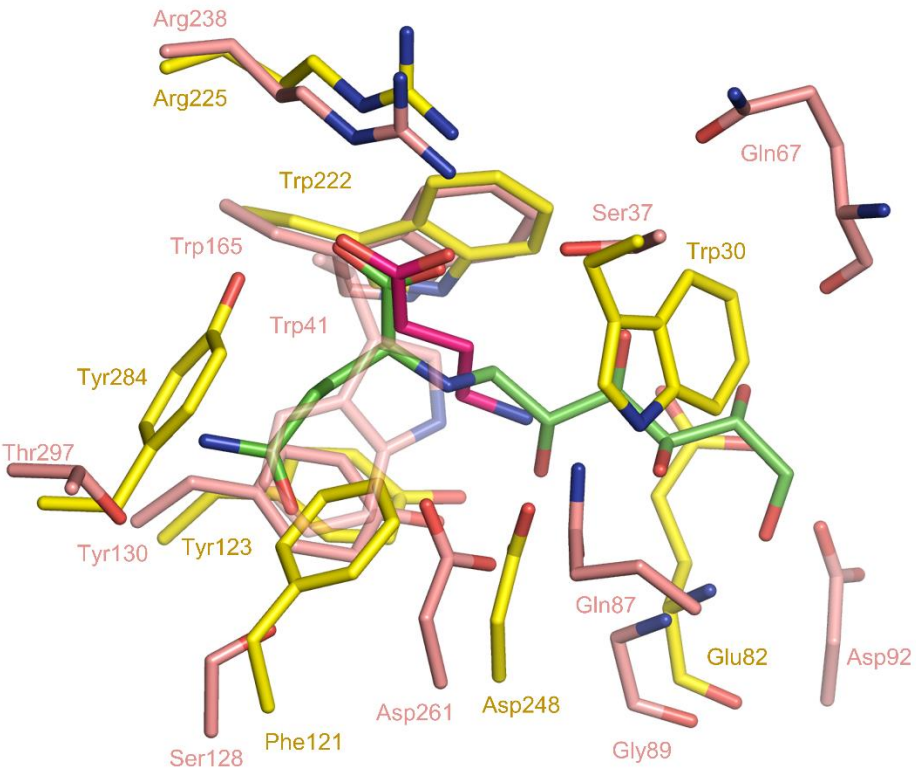
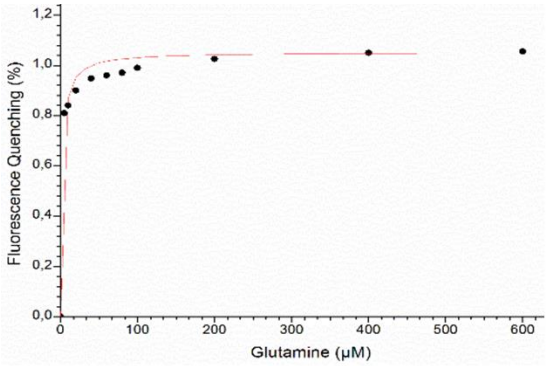
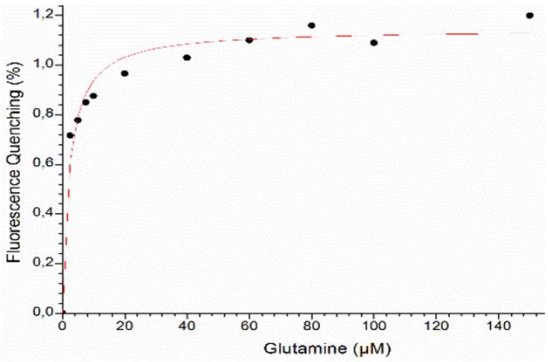


Figure S1. Structural comparison between the binding sites of MotA (pink) in complex with mannopine (green) and Atu4243 (yellow) in complex with GABA (magenta) (PDB code: 4EUO).



MotA-Glutamine



SocA-Glutamine

	Kd (µM)	Bmax	R^2
MotA-Gln	2.19 ± 0.26	1.14	0.97
SocA-Gln	2.13 ± 0.32	1.05	0.98

Figure S2. Fluorescence measurements of MotA (left panel) and SocA (right panel) with glutamine, and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicates.

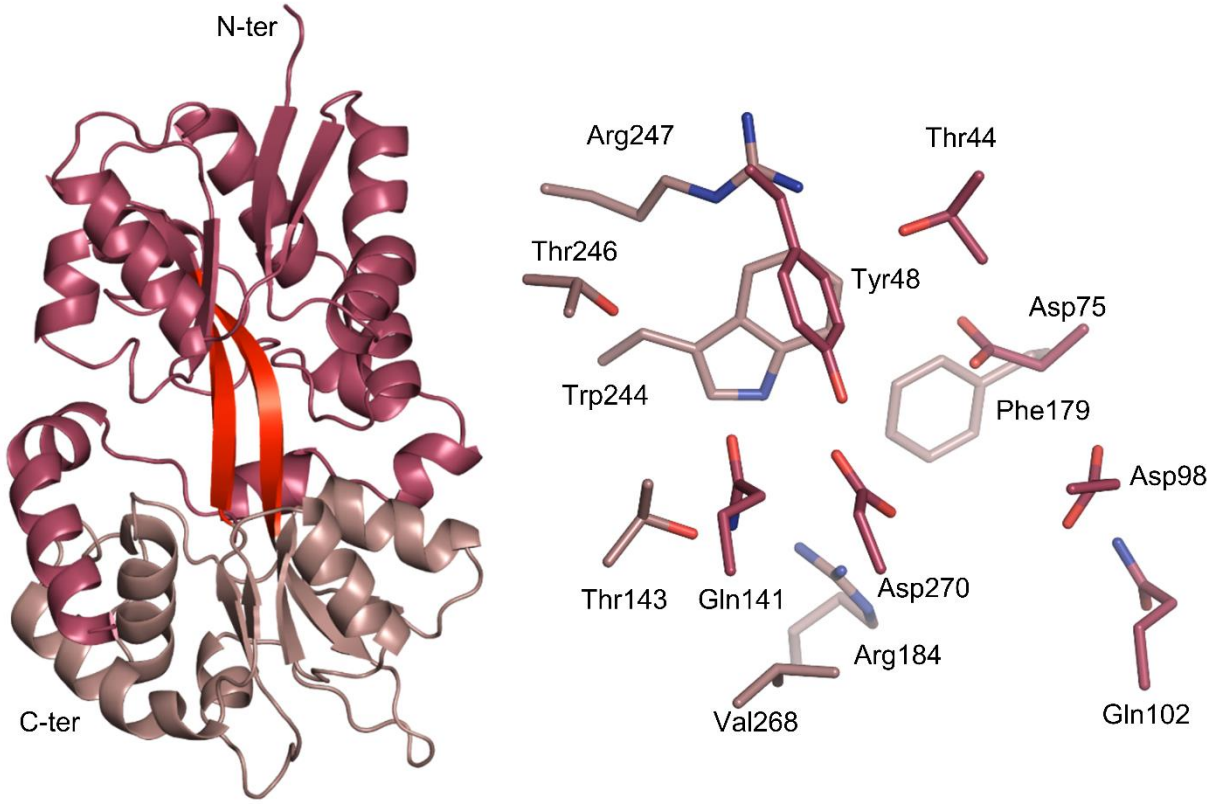


Figure S3. (Left) Ribbon representation of AttC structure in open conformation. (Right) A model of its ligand binding site in the closed form based on the MotA-mannopine structure.

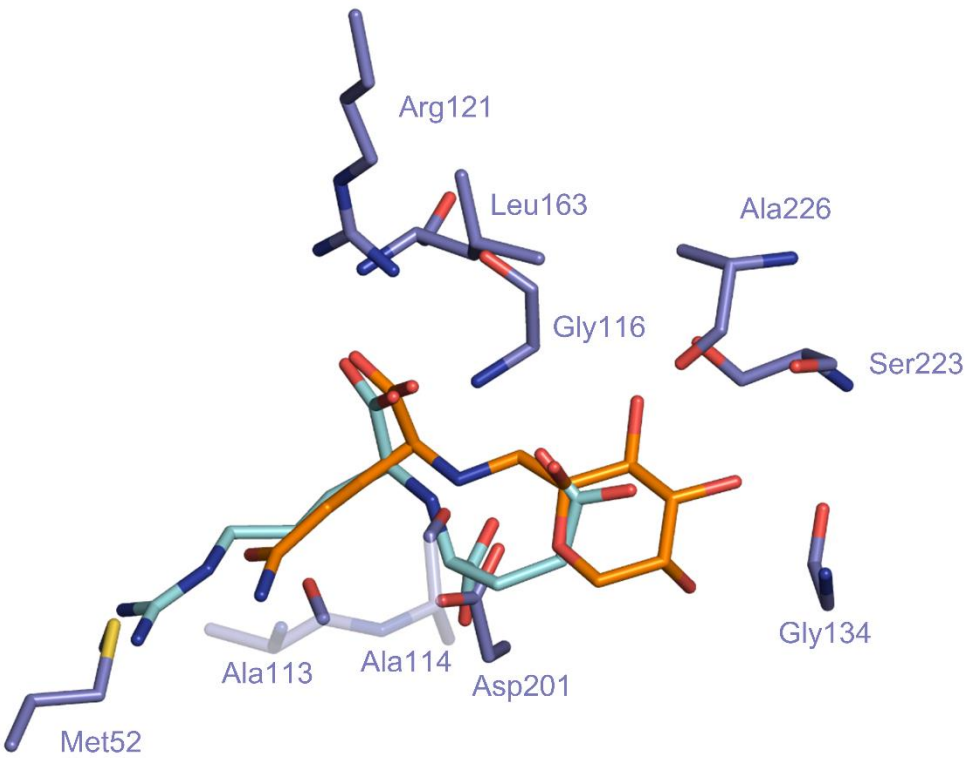


Figure S4. Nopaline (cyan) and DFG (orange) in the ligand binding site of SocA (slate) after the superposition of SocA-DFG and NocT-nopaline (PDB code: 4POX) structures.

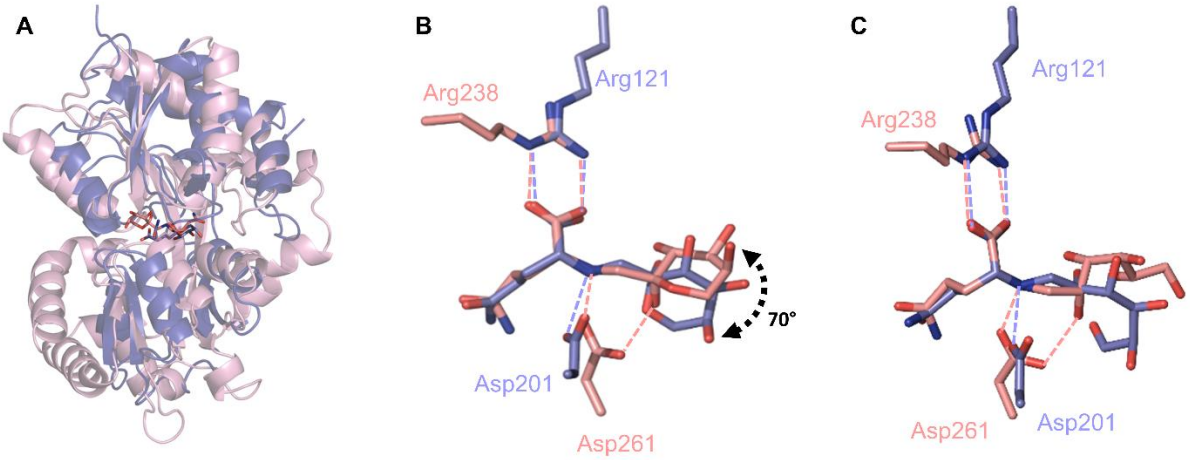


Figure S5. Comparison of MotA and SocA in complex with DFG and glucopine. (A) Superposition of ribbon representations of MotA (pink) and SocA (slate). DFG bound to MotA and SocA is shown as pink and slate stick respectively. (B) Superposition of the bound DFG in MotA (pink) and in SocA (slate) showing functionally conserved residues. A 70° rotation between both sugar moieties of DFG is observed. (C) The same comparison as in B with glucopine.

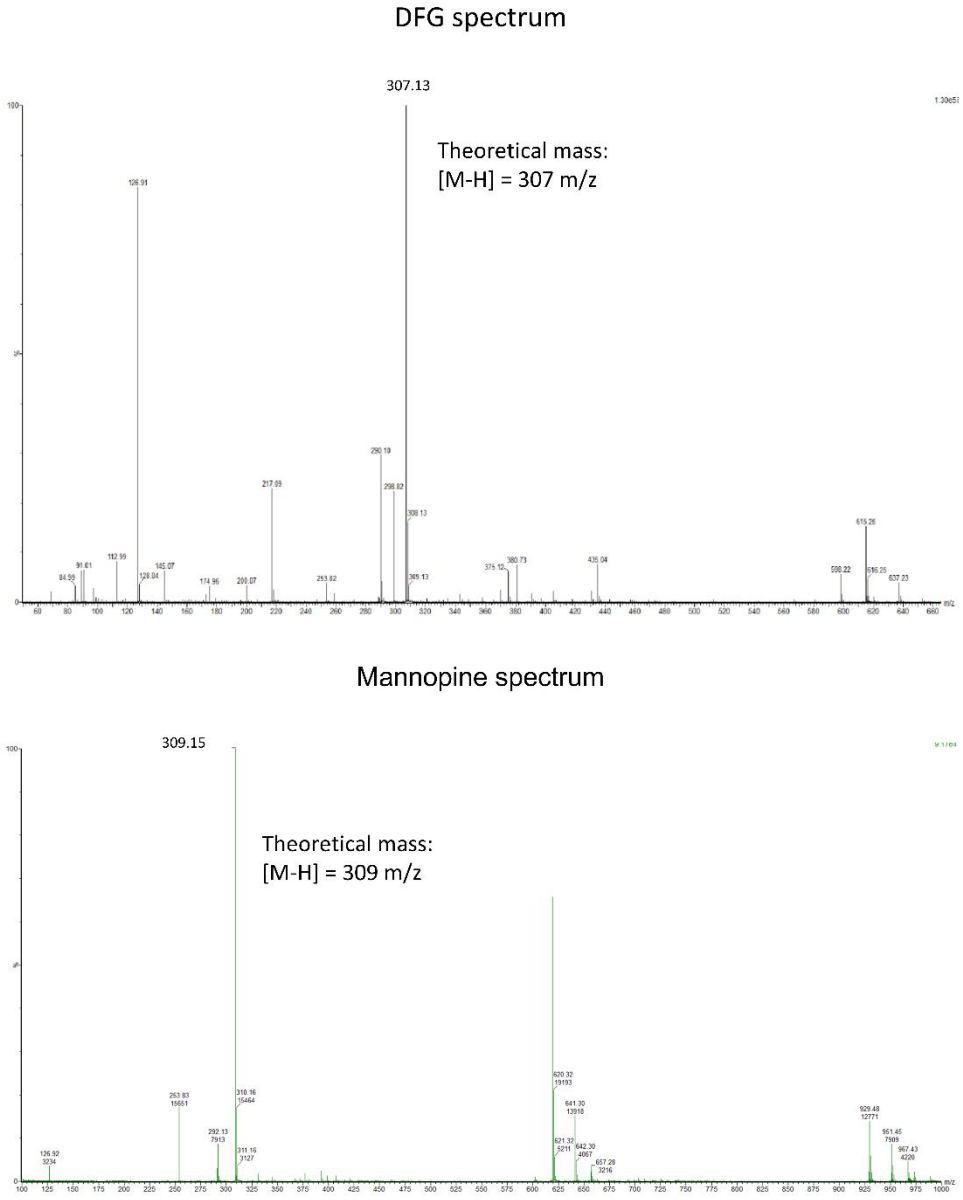


FIGURE S6. ESI-TOF Mass spectrometry of DFG (top) and mannopine (bottom). The calculated molecular weight is indicated as MWc. Mass spectrometry measurements were performed in negative mode with an electrospray Q/TOF mass spectrometer (Q/TOF Premier, Waters) equipped with the Nanomate device (Advion). Compounds were diluted in 50% acetonitrile and 1% formic acid. The Mass Lynx 4.1 software was used for acquisition and data processing. External calibration was performed with NaI clusters (2 µg/µL, iDFGropanol/H2O 50/50, Waters) in the acquisition m/z mass range and the estimated mass accuracy is ± 0.01 Da (at 309 Da for Mannopine and 307 Da for DFG).

2.3 SOCA CAN BIND GLUTAMATE

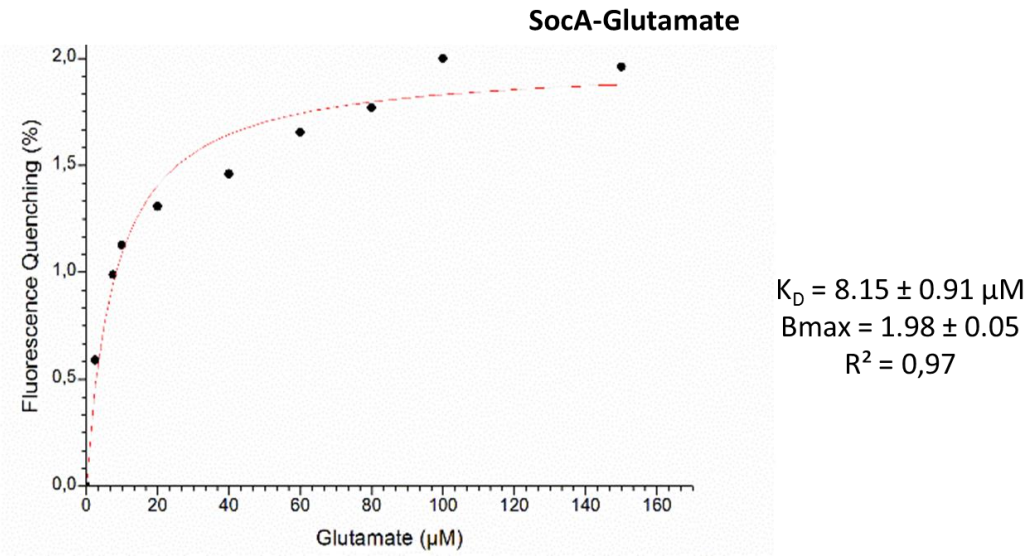


Figure 23 : SocA fluorescence upon glutamate concentration and fit (red line) to a one-binding-site model using Origin 7. Measurements were done in triplicates.

Affinity measurements between SocA and glutamine show a nonamolar-range interaction, suggesting that SocA could bind other amino acids. Therefore interaction experiments were undergone between SocA and glutamate by fluorescence and between SocA and arginine by microcalorimetry. They revealed an affinity of 8.15 ± 0.9 µM between SocA and glutamine (Figure 22) while no interaction was observed with arginine, which suggets that SocA can only accomodate a type of amino acid in its binding site.

Similar experiments between MotA and glutamate or arginine were performed and no interaction was observed between the PBP and both amino acids.

2.4 CONCLUSION

J'ai montré dans ce chapitre, par deux méthodes biophysiques, que la mannopine est fixée efficacement par la PBP MotA chez B6, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, tandis qu'elle n'interagit pas avec SocA, contrairement aux résultats obtenus par des approches génétiques sur une souche modifiée de C58. J'ai déterminé la structure du complexe MotA-mannopine et montré que le mode de fixation de MotA est conservé chez un nombre restreint de bactéries, possédant pour la plupart un pTi ou un pRi de type octopine, agropine ou mannopine. Ces résultats suggèrent que les bactéries induisant la production de mannopine dans la plante infectée sont majoritairement celles qui peuvent l'assimiler dans une tumeur, ce qui va dans le sens du concept d'opine.

J’ai également montré que SocA chez C58 et MotA chez B6 peuvent fixer la DFG avec une bonne affinité, ce qui suggère que cette molécule peut être importée efficacement par deux systèmes de transport différents. J’ai résolu la structure du complexe SocA-DFG et montré que la signature de fixation de SocA est conservée chez une grande diversité de bactéries, ce qui est en accord avec la présence naturelle répandue de la DFG et le fait que de nombreux organismes sont capables de l’assimiler.

Enfin, j’ai montré que la PBP AttC chez C58, annotée comme mannopine binding-like, ne pouvait pas fixer la mannopine. La résolution de sa structure ne permet pas de déterminer le type de ligand qu’elle pourrait fixer.

CHAPITRE 3 : COMPARAISONS STRUCTURALE ET BIOPHYSIQUE DE DEUX PBP CAPABLES DE FIXER L'ACIDE MANNOPINIQUE CHEZ LA SOUCHE B6.

3.1 INTRODUCTION

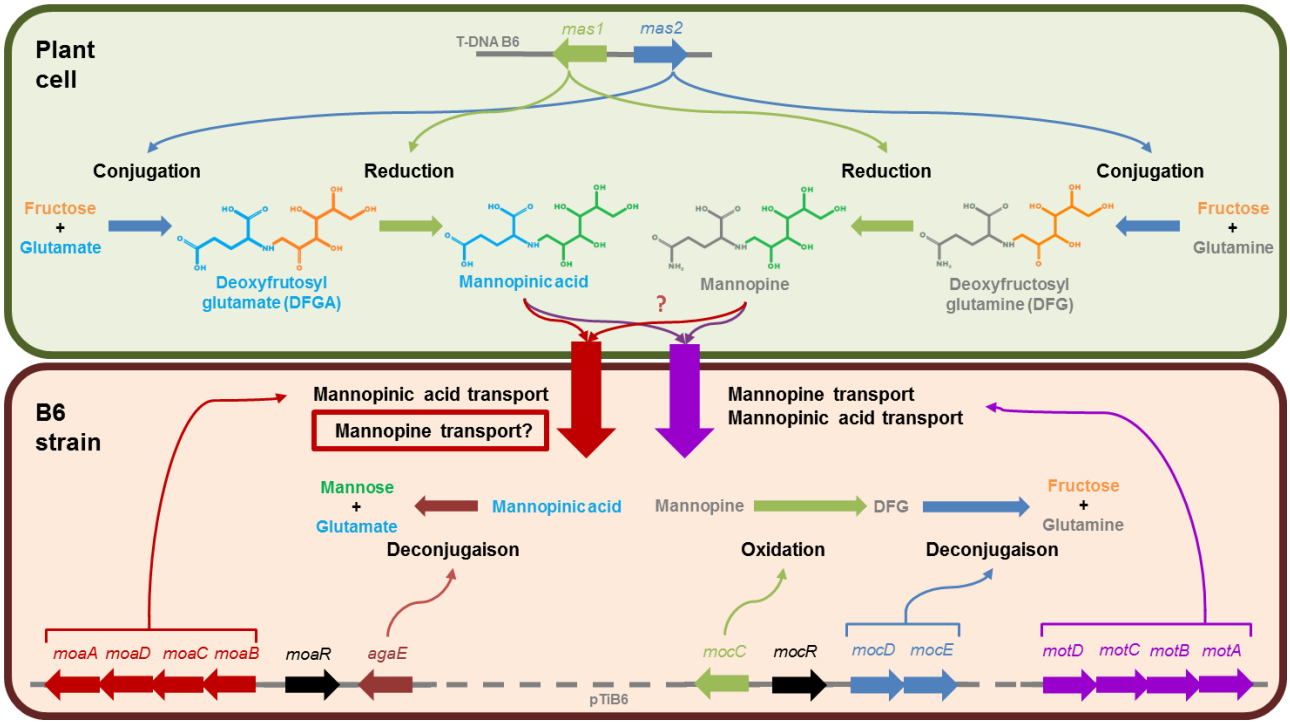


Figure 24: Métabolisme de la mannopine (gris/vert) et de l'acide mannopinique (cyan/vert) dans les cellules de plantes transformées et la souche *Agrobacterium tumefaciens* B6. Dans les cellules tumorales de la plante, les gènes *mas2* (bleu) et *mas1* (vert foncé) responsables de la biosynthèse en deux étapes de la mannopine et de l'acide mannopinique sont situés sur l'ADN-T transféré à partir du plasmide Ti. Chez *A. tumefaciens* B6, les gènes (*motABCD*) codant pour le transport non spécifique de l'acide mannopinique et la mannopine sont en violet. La mannopine est dégradée par les deux réactions inverses de sa synthèse. Les gènes (*moaABCD*) codant pour le transport supposé spécifique de l'acide mannopinique est en rouge. L'acide mannopinique est dégradée par une déconjugaison en une seule étape assurée par l'enzyme AgaE en marron. L'incapacité du transporteur MoaABCD à importer la mannopine n'a pas été démontrée de manière biochimique.

J'ai montré dans le chapitre précédent que la PBP MotA est capable de transporter la mannopine et la DFG dans la souche à octopine *A. tumefaciens* B6. MotA est également décrite comme capable de transporter l'acide mannopinique, dont la seule différence avec la mannopine réside dans la partie acide aminé qui est un glutamate au lieu d'une glutamine. La PBP MoaA de la souche à octopine *A. tumefaciens* 15955 a été décrite comme fixant spécifiquement l'acide mannopinique (Lyi, Jafri and Winans 1999).

MotA fait partie de la voie de transport non spécifique des mannityl-opines, dont le mode de régulation n'est pas encore identifié. Seules les gènes codant les enzymes de dégradation de la mannopine importée par le système de transport Mot seraient régulés par

les facteurs de transcription MocR et MocS, eux-mêmes contrôlés par l'agropine comme montré par des études génétiques (Jung *et al.* 1999). MoaA fait en revanche partie de la voie de transport spécifique de l'acide mannopinique. La transcription des protéines de cette voie est réprimée par MoaR qui est inhibée par l'acide agropinique et l'acide mannopinique, comme montré par des études génétiques (Lyi, Jafri and Winans 1999).

Comme vu dans le chapitre précédent, MotA fait partie du groupe D dans la classification des PBP, tandis que l'alignement de MoaA avec des homologues montrent que MoaA appartient au cluster C. Ces deux PBP apparaissent donc structuralement différentes, ce qui pourrait expliquer la spécificité de l'une et pas de l'autre.

L'objectif de ces travaux a été de confirmer cette hypothèse en déterminant les affinités de MoaA et MotA pour la mannopine et l'acide mannopinique ainsi que les structures des complexes MotA-opine et MoaA-opine.

Pour cela, j'ai purifié les deux PBP MotA et MoaA et nous avons mené leur étude biophysique par microcalorimétrie et par fluorescence intrinsèque, et l'étude structurale par cristallographie aux rayons X du complexe MotA-acide mannopinique.

J'ai résolu la structure de MotA en complexe avec l'acide mannopinique par remplacement moléculaire. Nous avons constaté que le mode de fixation de l'acide mannopinique chez MotA est le même que celui de la mannopine. Les constantes de dissociation de MotA-mannopine et MotA-acide mannopinique mesurées par microcalorimétrie et autofluorescence étaient du même ordre de grandeur, ce qui confirmé le résultat obtenu en structure.

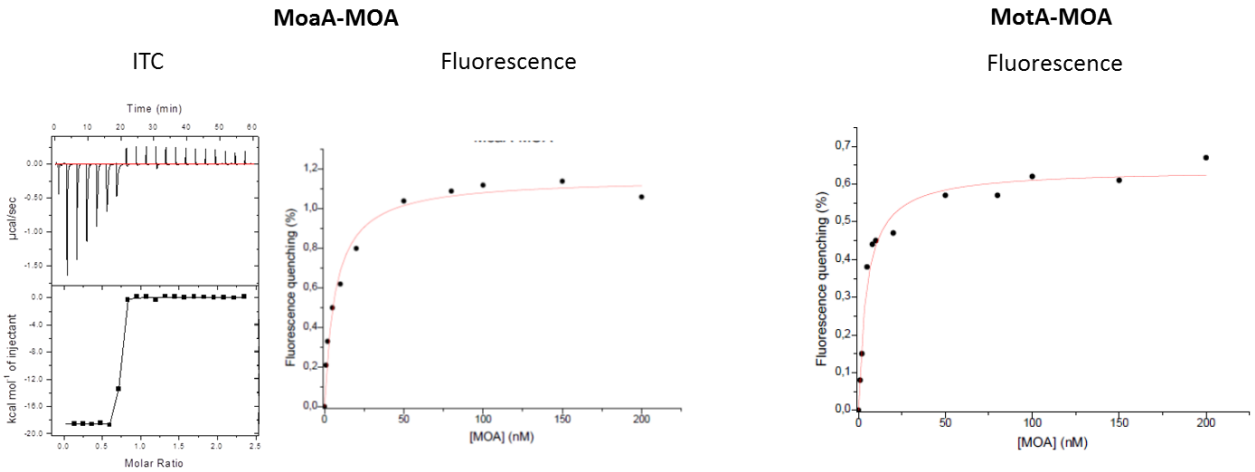
Nous avons ensuite entrepris les études biophysiques de MoaA avec les quatre mannityl-opines. Ces études ont montré que MoaA est spécifique de l'acide mannopinique avec une constante de dissociation du même ordre de grandeur que MotA-acide mannopinique.

Pour comprendre ces résultats, j'ai tenté d'obtenir la structure de MoaA en complexe avec l'acide mannopinique par cristallographie aux rayons X. Tous les cristaux que j'ai obtenus se présentaient sous forme de plaques très fines, ou d'empilement de plaques les unes sur les autres. Leur diffraction était faible ou montrait un réseau cristallin multiple, rendant le phasage par diffraction anomale difficile. Le remplacement moléculaire n'a pas

fonctionné non plus à cause de la faible identité de séquence entre MoaA et les protéines dans la PDB. J'ai donc modélisé MoaA à l'aide de différents programmes pour avoir une idée du mode de fixation de l'acide agropinique.

3.2 RESULTS

3.2.1 AFFINITY OF MOTA AND MOAA TO MANNOPINIC ACID



K_D = 3.2 ± 1.8 nM
N = 0.683
ΔH = -18610 ± 69 cal/mol
ΔS = -24.4 cal/mol/deg

K_D = 6.82 ± 1.05 nM
Bmax = 1.15 ± 0.03
R^2 = 0.99

K_D = 4.61 ± 0.66 nM
Bmax = 0.64 ± 0.02
R^2 = 0.98

Figure 25 : ITC and fluorescence K_D measurements. The left graphs of MoaA microcalorimetry experiments show heat differences upon injection of mannopinic acid (top panel) and integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single binding model using Microcal Origin® (low panel). The right graphs show MoaA and MotA fluorescence monitoring upon titration with mannopinic acid and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicates.

By intrinsic protein fluorescence titration, the measured dissociation constant (K_D) value between MotA and mannopinic acid of 4.61 ± 0.66 nM (Figure 24) indicates that MotA is very efficient for mannopinic acid binding as well as for mannopine binding as previously shown. No interaction was observed between MotA and agropine in both fluorescence and ITC measurements, neither between MotA and agropinic acid with fluorescence.

For MoaA, autofluorescence and ITC displayed a K_D value of 6.82 ± 1.05 nM, and 3.2 ± 1.8 nM, for mannopinic acid respectively (Figure 24). The ITC data confirmed the 1:1 binding stoichiometry for MoaA and showed a negative enthalpy change for all ligands, suggesting that the binding was enthalpy driven. No interaction could be measured between MoaA and mannopine, both with fluorescence and microcalorimetry, neither between MoaA and agropinic acid and agropine by fluorescence.

3.2.2 MotA Recognizes mannopinic acid

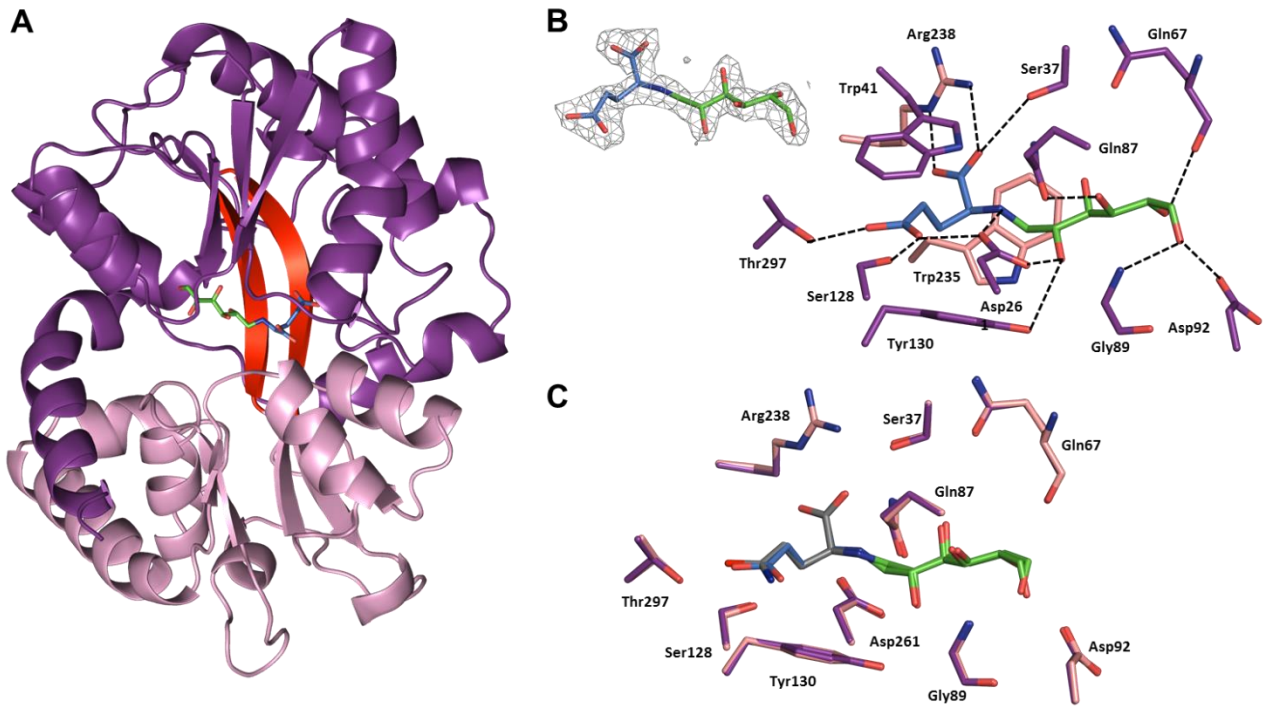


Figure 26: (A) Ribbon representation of MotA-mannopinic acid structure. Lobes I and II are shown in purple and pink respectively and the hinge region in red. (B) Mannopinic acid bound to the binding site of MotA is shown in marine/green sticks and in its annealing Fo-Fc omit map contoured at 3σ. Hydrogen bonds between MotA and mannopinic acid are shown as dashed lines in black (distance below 3.2 Å). (C) Superimposed residues of the binding site of MotA in complex with mannopine (grey/green) and mannopinic acid (marine/green) are shown in purple and pink respectively.

The X-ray structure of the monomeric liganded MotA with mannopinic acid was determined at 2.2 Å. The crystal structure adopts the same closed conformation as previously observed in MotA-mannopine structure (overall RMSD of 0.32 Å for all Cα, Figure 25A). Mannopinic acid and mannopine fully overlap when the structures of MotA-mannopine and MotA-mannopinic acid are superimposed making identical interactions with MotA as previously described: its side chain moiety interacts with the protein side chains of Ser128, Thr297 and Asp261, its carboxylate part is maintained by the guanidinium group of Arg238 and its amino group makes a hydrogen bound with the carboxyl group of Asp261 (Figure 25B). The sugar moiety interacts with Ser37, Gln67, Gln87, Gly89, Asp92 and Asp261 residues (Figure 25C). Remarkably, a hydrogen bond is formed between the glutamate side chain of the mannopinic acid and the side chain of Asp261 due to a favorable environment where both oxygens of each carboxylate are involved in polar interactions which neutralize any negative charge. No interaction between MotA and glutamate as ligand was observed by fluorescence titration, whereas a micromolar-range interaction was observed with

glutamine, which suggests that an electrostatic repulsion may occur between Asp261 and the ligand glutamate.

3.2.3 TRIALS TO OBTAIN MOAA STRUCTURE

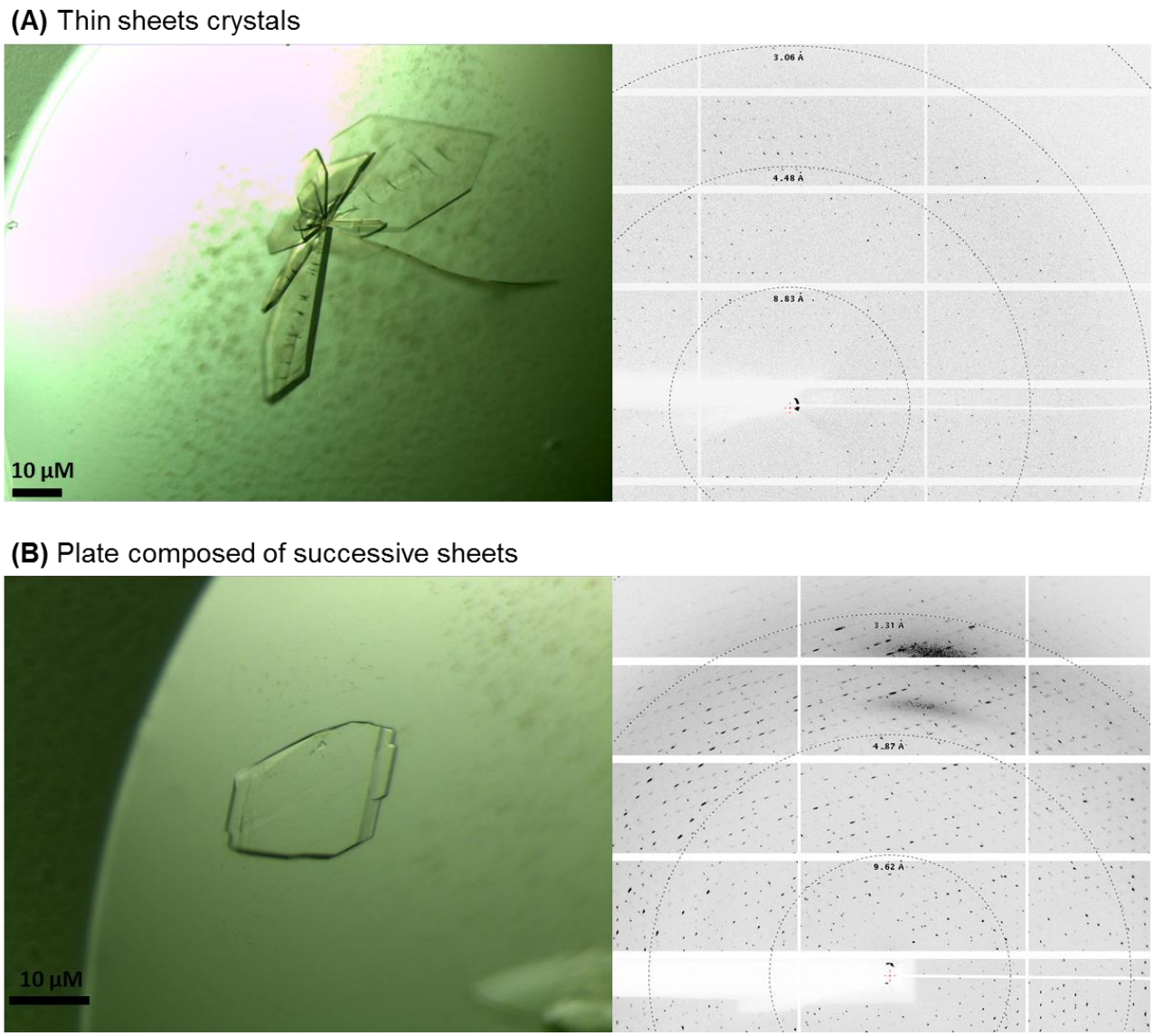


Figure 27: Crystals of MoaA (left panel) and their diffraction pattern at Proxima1 beamline (SOLEIL) (right panel). The resolution of the diffraction patterns is 3 Å on a Pilatus detector. (A) Because of the crystal thinness, the spots intensity is low. (B) A multiple network can be observed in the diffraction pattern of the crystal forming a plate which is not unique.

After its production and purification, the PBP MoaA was cocrystallized with mannopinic acid. The first crystals obtained were thin plates (Figure 26A), in PEG 4K, PEG 6K and PEG 8K as precipitant, MES pH 6.5, HEPES pH 7.5, and Tris-HCl pH 8.5 as buffer and ammonium sulfate as salt. I optimized these conditions to obtain thicker crystals and the best one (Table 2 Crystal 1) diffracted at 2.2 Å at Proxima1 (PX1) beamline (SOLEIL

synchrotron). I tried to determine the phases by molecular replacement (MR) using PHASER (McCoy *et al.* 2007), MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010) and MRage (Krissenel and Hendrick 2004; McCoy *et al.* 2007) softwares with structures of homologous proteins from the Protein Data Bank (PDB) and models built with several softwares described below. No protein in PDB shared over 27% sequence identity with MoaA.

Table 2: Crystallisation conditions and crystallographic data of MoaA crystals.

Crystal number	**1**	**2**		**3**		**4**
Beamline	PX1	PX1		PX1		PX1
Crystallisation conditions	28% PEG 4K, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M AmSO4	29% PEG 4K, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M AmSO4		26% PEG 8K, 0.1 M MES pH 6.5, 50 mM AmSO4		24% PEG 4K, 0.1 M Na Acetate pH 6
Metal		Hg				
Spacegroup	C2221	C2221		P21		P1
Cell parameters	61.4/193.7/78.6 90/90/90	122.6/388.6/78.4 90/90/90	122.8/390/78.7 90/90/90	102.4/78.9/123.5 90/107.5/90	102.6/79.1/124 90/107.6/90	97.2/103.8/104.4 99.5/100.3/104.7
Mol/UA	1	4		4		8
Resolution (outer shell) (Å)	50-2.2 (2.33-2.2)	50-2.59 (2.75-2.59)	50-2.98 (3.16-2.98)	50-2.2 (2.33-2.2)	50-2.49 (2.65-2.49)	50-2.79 (2.96-2.79)
Total reflections	151019 (17147)	756065 (120586)	492059 (73468)	355319 (56250)	197088 (30106)	223215 (34632)
Unique reflections	24247 (3767)	111588 (17552)	38876 (5913)	180297 (30395)	121799 (18844)	90453 (13943)
Redondancy	6,2	6,8	12,7	2	1,6	2,5
Completeness (%)	99.6 (97.7)	99.5 (97.3)	99.1 (94.8)	95.8 (94.3)	94.1 (89.9)	96 (91.7)
I/σi	12.1 (1.24)	7.62 (1.66)	8.66 (1.55)	4.47 (0.69)	5.38 (0.84)	8.22 (2.27)
CC1/2	99.8 (54.4)	99.7 (81.2)	99.7 (77.9)	98.9 (43.7)	99.3 (53.9)	99.3 (76.1)
Rsym	10.2 (107.2)	17.1 (108.5)	27.5 (169)	13.8 (101.9)	10.9 (83.4)	9 (41.4)
Comments	MR failed	pseudo-translation and twin, merged for phasing		pseudo-translation, no twin, merged for phasing		pseudo-translation or twin

MoaA and selenomethionyl-MoaA crystals were grown with mercury chloride ($HgCl_2$), potassium gold chloride ($KAuCl_4$), potassium platinum chloride ($KPtCl_4$) or Tris(pyridine-2,6-dicarboxylate)-Europium (DAP_3-Eu) in order to determine the phases by Single-wavelength Anomalous Diffusion (SAD) or Multiple-wavelength Anomalous Diffusion (MAD). Thirty-nine crystals were tested and only four of them were collected because the diffraction pattern could be indexed leading to three space groups with four different cell parameters (Table 2). Some of the processed data were from twinned crystals, and/or showed a pseudo-translational symmetry in the cell (Table 2), complicating the phase determination process. Moreover, the anomalous signal of the crystals was too weak. These results are likely due

to the fact that crystals were not perfect, since they grew as multi-plates composed of successive sheets one on the other (Figure 26B). Thus, crystal growth needs to be improved by optimizing crystallization conditions.

3.2.4 MoaA models

Several MoaA models were built by different structure prediction softwares, using homology (3D-Jigsaw (https://bmm.crick.ac.uk/~3djigsaw/), SwissMODEL (Biasini *et al.* 2014)), threading (Muster (Wu and Zhang 2008), I-Tasser (Zhang 2008), Phyre2 (Kelley *et al.* 2015), Lomets meta-server (Wu and Zhang 2007)), both (@TOME meta-server (Pons and Labesse 2009)) and *ab initio* (Robetta (http://robetta.bakerlab.org/)) methods. Models were either in open or closed conformation. At the binding site level, models can present some variability in residue composition, depending on the structures used to make the model (for homology and threading models) or the used method. However, few residues such as Arg388 seems conserved in the putative ligand binding site of the different models. As the presence of an arginine is recurrent in the amino-acid-containing opine binding PBPs (MotA, SocA, NocT), this arginine may play the same role which is to lock the carboxylate group of the amino acid in the opine. Two more arginines (Arg375 and Arg29) at each extremity of the putative binding site could bind the sugar part of the mannopinic acid on one side and the side chain of the glutamate part on the other side. Trp370, Tyr384 and Phe399 residues could be involved in opine stacking.

3.3 Methods

Synthesis and purification of opines

Mannopinic acid was synthesized using L-glutamate and D-mannose as precursors in the presence of cyanoborohydride as described by Petit et al (Petit *et al.* 1983). Solution of mannopinic acid was checked by mass spectrometry (Figure 27). Mass spectrometry measurements were performed in negative mode with an electrospray Q/TOF mass spectrometer (Q/TOF Premier, Waters) equipped with the Nanomate device (Advion). Compounds were diluted in 50% acetonitrile and 1% formic acid. The Mass Lynx 4.1 software was used for acquisition and data processing. External calibration was performed with NaI clusters (2 µg/µL, iDFGropanol/H2O 50/50, Waters) in the acquisition m/z mass range and the estimated mass accuracy is ± 0.01 Da, at 310 Da for mannopinic acid.

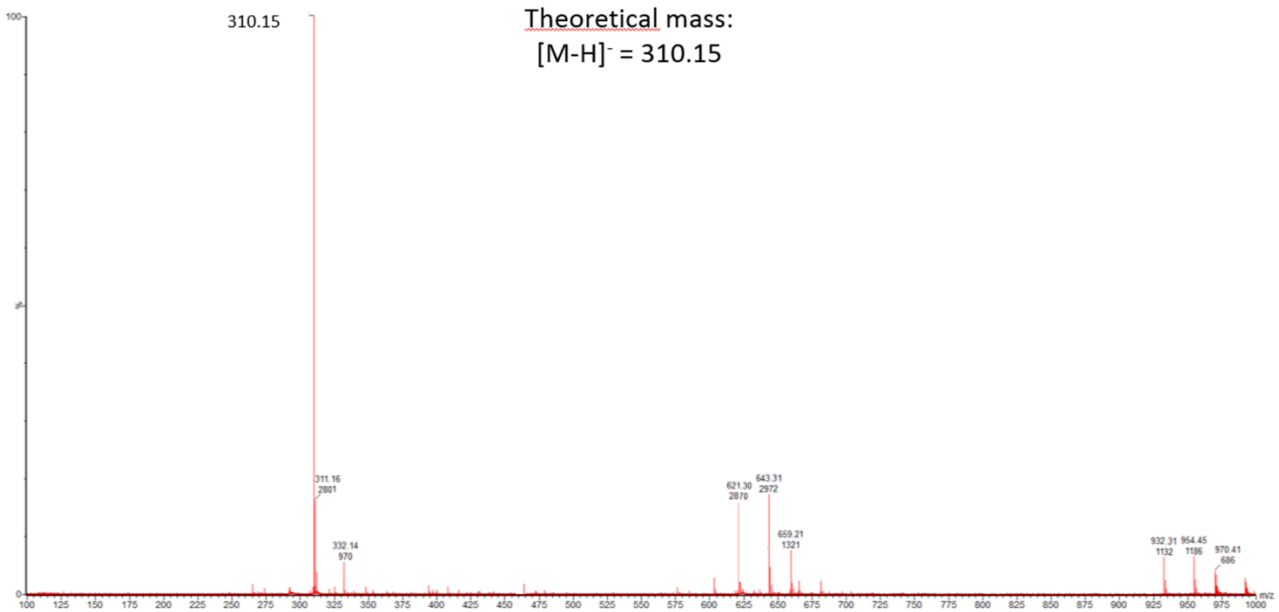


Figure 28 : ESI-TOF Mass spectrometry of mannopinic acid. The calculated molecular weight is indicated as MWc.

Expression and purification of MotA and MoaA

MotA was expressed and purified as described in chapter 2. The synthetic gene (Genscript) coding for the mature MoaA was inserted into pET-29b. *E. coli* BL21 pLysS were transformed by pET-29b-*moaA*. Cells were grown in LB broth at 37°C then at 16°C when supplemented with 0.5 mM IPTG for protein production. Cells were centrifuged, resuspended in a buffer of 50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole and 500 mM NaCl, and disrupted by sonication. After centrifugation at 25 000 g for 30 min at 4 °C, the supernatant was loaded onto a 5 mL His-Trap column (GE Healthcare). Protein elution was performed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. Protein fractions were loaded onto a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl.

Crystallization and structure determination of MotA

Crystallization conditions (Table 2) for MotA in complex with mannopinic acid (molar ratio of protein:ligand used was 1:5) were screened using the QIAGEN kits. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (22% PEG 400 or 25% Glycerol) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA I beamline at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France). Data collection and processing statistics are given in Table 3. Structure determination was performed by molecular replacement with

PHASER. Structure determination of MotA-mannopinic acid was performed using the coordinates of MotA-mannopine. Refinement was performed with BUSTER-2.10 (Blanc *et al.* 2004) with NCS restraints and TLS groups. Electron density maps were evaluated using COOT. Refinement details are shown in Table 3. Molecular graphics images were generated using PYMOL (http://www.pymol.org).

Table 3: Crystallization conditions, crystallographic data and refinement parameters

Protein	MotA-mannopinic acid
Crystallization conditions	28% PEG 4K, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $CaCl_2$
PDB code	
Space group Cell parameters (Å,°)	$P2_1$ *a* = 67.9 *b* = 132.1 *c* = 69.5 *β* = 91.2
Resolution (Å)	50-2.2 (2.34-2.2)
No. of observed reflections	182317 (28269)
No. of unique reflections	60300 (9388)
R_{sym} (%)	16.4 (110.4)
Completeness (%)	97.8 (94.4)
I/σ	6.31 (1.27)
$CC_{1/2}$	99 (51)
R_{cryst} (%)	19.6
R_{free} (%)	21.9
rms bond deviation (Å)	0.01
rms angle deviation (°)	1.01
Average B ($Å^2$) protein ligand solvent	 42.5 36 44.8

K_D measurements by fluorescence titration and microcalorimetry

The binding of each ligand to MotA and MoaA was monitored by autofluorescence by excitating the proteins at a 295-nm wavelength and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophans at 330 nm. All experiments were performed at 24°C in triplicates in 50 mM Tris-HCl pH 8 and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (5 µM) and increasing concentrations of ligand using a Tecan infinite M1000 PRO microplate reader (Tecan Group SA). Each ligand has no emission signal at 330 nm. The data were analyzed using Origin 7 software (ORIGIN®) and fitted to the equation $f=\Delta Fluorescence_{max}*abs(x)/(KD+abs(x))$.

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal Llc (Northampton, MA). The experiments were carried out at 20°C. Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) was 50 µM. 19 injections of 2 µl of the ligand solution at 500 µM, were performed at 180 s intervals while stirring at 1000 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with the software supplied by MicroCal (ORIGIN®). This software uses the relationship between the heat generated by each injection and ΔH (enthalpy change in $Kcal.mol^{-1}$), Ka (the association binding constant in M^{-1}), n (the number of binding sites), total protein concentration and free and total ligand concentrations.

3.4 CONCLUSION

J'ai montré dans ce chapitre, par une approche biophysique, que la PBP MotA n'est pas sélective pour la mannopine ou l'acide mannopinique et qu'elle est capable de fixer ces deux opines avec les mêmes affinités de l'ordre du nanomolaire. Ceci est confirmé par l'analyse structurale du complexe MotA-acide mannopinique qui montre que le mode de fixation de l'acide mannopinique est identique à celui de la mannopine.

Enfin, bien que la mannopine soit similaire chimiquement à l'acide mannopinique, j'ai montré que MoaA n'est pas capable de la fixer. Au contraire, j'ai montré que MoaA est spécifique de l'acide mannopinique et présente une affinité de l'ordre du nanomolaire. Par conséquent, cette opine peut être importée par deux systèmes de transport différents avec la même efficacité. Ces résultats posent la question de l'utilité de posséder deux systèmes de transport pour une même molécule pour la bactérie. Comprendre le mode de fixation de cette PBP pour l'acide mannopinique en caractérisant sa structure permettrait d'expliquer sa spécificité. Les cristaux du complexe MoaA-acide mannopinique que j'ai obtenus donnent une mauvaise diffraction ou un signal anomal faible. Ils sont donc à optimiser pour obtenir une meilleure diffraction et un signal anomal plus fort.

CHAPITRE 4 : ASPECTS STRUCTURAUX ET BIOCHIMIQUES DES PBP PERMETTANT LE TRANSPORT DE L'ACIDE AGROPINIQUE CHEZ B6.

4.1 INTRODUCTION

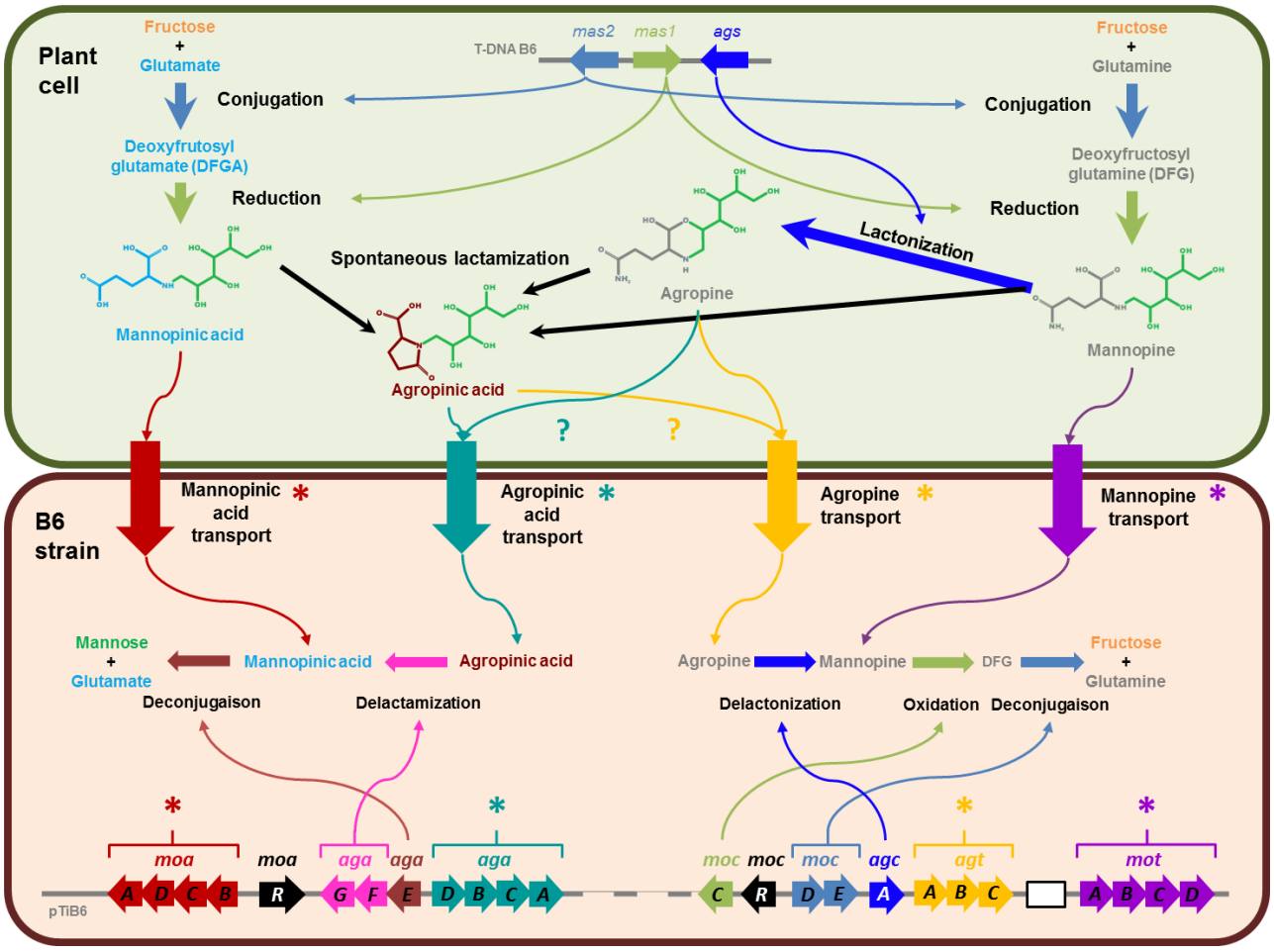


Figure 29 : Métabolisme des mannityl-opines dans les cellules de plantes transformées et la souche *Agrobacterium tumefaciens* B6. Dans les cellules tumorales de la plante, les gènes *mas2* (bleu foncé), *mas1* (vert foncé) et *ags* (bleu vif) responsables de la biosynthèse de la mannopine (gris/vert), l'acide mannopinique (cyan/vert) et l'agropine (gris/vert) sont situés sur l'ADN-T transféré à partir du plasmide Ti. L'acide agropinique (marron foncé/vert) est issu de la lactamisation spontanée des trois autres mannityl-opines. Chez *A. tumefaciens* B6, les gènes (*motABCD*) codant pour le transport non spécifique de la mannopine sont en violet. Les gènes (*agtABC*) codant pour le transport de l'agropine sont en jaune. L'agropine et la mannopine sont dégradées par les réactions inverses de leur synthèse. Les gènes (*moaABCD*) codant pour le transport spécifique de l'acide mannopinique sont en rouge. Les gènes (*agaABCD*) codant pour le transport supposé spécifique de l'acide agropinique sont en turquoise. L'acide agropinique est délactamisé par AgaEF (rose) en acide mannopinique à son tour déconjugué par AgaE (marron clair). Les spécificités des transporteur AgaABCD et AgtABC pour l'acide agropinique et l'agropine respectivement n'ont pas été démontrées de manière biochimique.

Les mannityl-opines sont importées dans le cytoplasme des souches possédant un pTi de type octopine ou agropine *via* quatre transporteurs différents. Les PBP qui sélectionnent les ligands sont MotA, capable de reconnaître la mannopine et l'acide

mannopinique, MoaA, fixant spécifiquement l'acide mannopinique, AgtB, décrite comme liant l'agropine, et AgaA, capable de fixer l'acide agropinique.

Bien que MotA et MoaA soient capables de fixer une même opine, leur structure et leur mode de fixation semblent complètement différents. Les alignements des séquences d'AgtB et d'AgaA contre les structures déposées à la Protein Data Bank (PDB) montrent que la première appartient au cluster D contenant MotA, avec laquelle elle partage 31% d'identité, et que la seconde appartient au cluster C, le même que MoaA, avec laquelle elle partage 26% d'identité de séquence.

Le fait que MotA, dont le gène se trouve sur l'opéron *mot* dans la partie non transférée du pTi de B6, soit capable de fixer plusieurs opines et qu'elle soit impliquée dans la voie de transport non spécifique des mannityl-opines interpelle sur la spécificité d'AgtB, homologue située sur l'opéron *agt* voisin, également impliqué dans la voie de transport non spécifique.

L'objectif de ces travaux a donc été de vérifier les spécificités des deux PBP AgtB et AgaA pour l'agropine et l'acide agropinique, et de comparer les structures des complexes AgtB-agropine et AgaA-acide agropinique ainsi que le mode de fixation de chaque protéine avec son ligand.

Pour cela, j'ai purifié les deux PBP AgtB et AgaA et nous avons mené leur étude biophysique par microcalorimétrie et par fluorescence intrinsèque, et structurale par cristallographie aux rayons X. Pour cette étude, la plateforme HPLC/SFC « petites molécules »/Spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie et des Substances Naturelles (ICSN) a mis au point un protocole de purification de l'agropine.

J'ai tout d'abord résolu la structure d'AgtB cocristallisée avec l'agropine par remplacement moléculaire en utilisant MotA comme modèle. De manière surprenante, la molécule observée dans le site de fixation était de l'acide agropinique. La présence de cette molécule dans la solution d'agropine a pu être expliquée par le fait que l'agropine subit une lactamisation spontanée en acide agropinique au cours du temps. Les mesures d'affinité en microcalorimétrie et autofluorescence ont bien montré une interaction entre AgtB et l'acide agropinique, mais aucune interaction n'a été observée avec l'agropine purifiée par les chimistes de l'ICSN, la mannopine et l'acide mannopinique. Ces résultats, en contradiction avec ce qui avait été décrit précédemment, suggèrent qu'AgtB est spécifique pour l'acide agropinique. Nous avons ensuite entrepris les études structurale et biophysique d'AgaA

avec les quatre mannityl-opines. Ces études ont montré qu'AgaA est spécifique de l'acide agropinique.

Ces résultats suggèrent que B6, et les souches possédant un plasmide de type octopine ou agropine, possèdent deux transporteurs de l'acide agropinique et aucun transporteur dans la région de transport de catabolisme des mannityl-opines. Pour vérifier si les souches de type octopine sont capables de transporter et cataboliser l'agropine, j'ai réalisé des tests de croissance de la souche à octopine R10 sur agropine comme seule source de carbone. Cette expérience a montré que R10 croissait en présence d'agropine et qu'elle est donc capable de l'assimiler. Ce résultat confirme la présence d'un transporteur à agropine.

Pour étudier le transport de l'agropine chez B6 et R10 *in vivo*, j'ai tenté de générer un mutant KO du transporteur AgtBC par insertion de Campbell dans le gène *agtB*, mais aucune transformation n'a généré de mutant.

4.2 RESULTS

4.2.1 AGTB FOLD BELONGS TO CLASS D

The mature AgtB expression plasmid was obtained by cloning the *agtB* gene lacking the first twenty-nine signal sequence residues that serve for the localization to the bacterial periplasm. Nonetheless, the expressed protein contains a long N-terminal sequence of 20 residues including a His-tag. The X-ray structure of the liganded AgtB with agropinic acid was determined at 1.74 Å resolution (Table 5) by molecular replacement. The liganded crystal contains five very similar molecules in the asymmetric unit as indicates the average root mean square deviation (RMSD) of 0.39 Å for all Cα atoms. The liganded form adopts a closed conformation (Figure 30A).

The monomeric AgtB possesses a typical fold of cluster D within the PBP structural classification. Indeed, a structural comparison to all entries in the PDB using SSM-EBI (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm) showed that the most similar overall structures were PBPs from the same cluster D, *ie* the liganded structure of *A. tumefaciens* C58 Atu4243 with GABA (PDB code: 4EUO; RMSD of 1.65 Å over 301 Cα atoms and 33% sequence identity), the two unliganded PBPs of unknown function (PDB codes: 3RPW from *Rhodopseudomonas palustris*, RMSD of 2.02 Å over 302 Cα atoms and 28% sequence identity; and 4I1D from *Bradyrhizobium japonicum,* RMSD of 2.33 Å over 290 Cα atoms and

30% sequence identity) and the *E.coli* spermidine/putrescine-binding PotD with spermidine (PDB code: 1POT; RMSD of 2.09 Å over 267 Cα atoms and 22% sequence identity). The PBP MotA from *A. tumefaciens* B6 in complex with mannopine displays with AgtB a RMSD of 1.56 Å over 283 Cα atoms with 31% identity sequence.

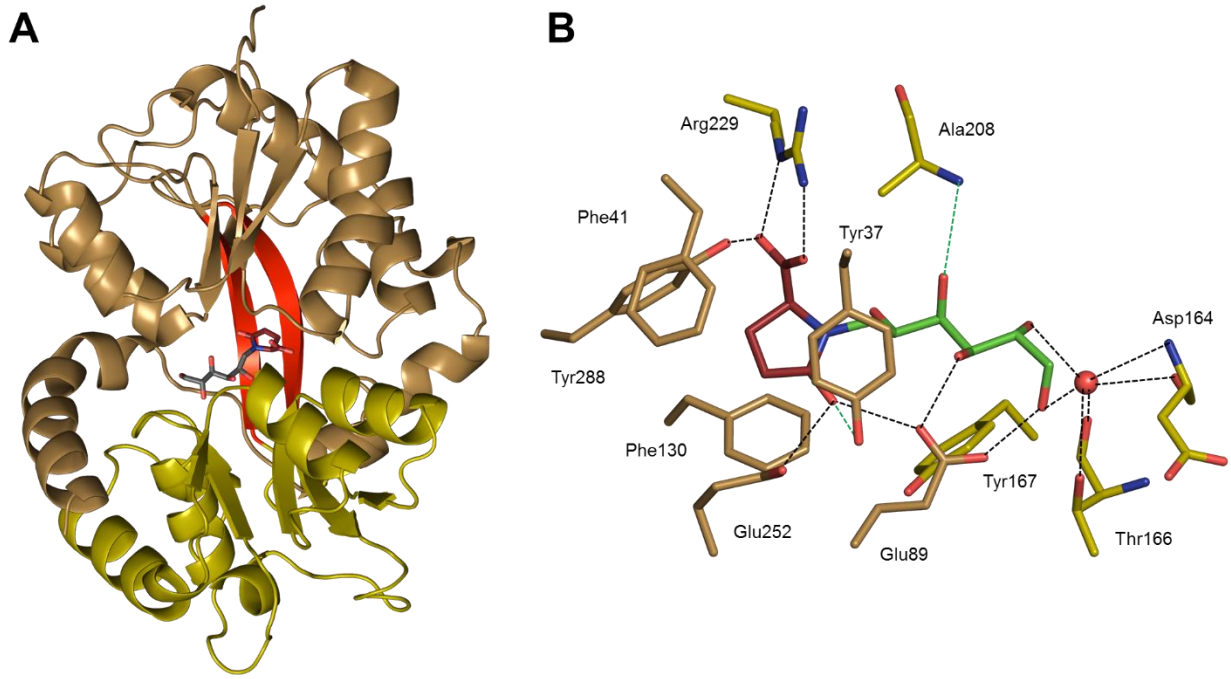


Figure 30: (A) Ribbon representation of the AgtB-agropinic acid structure. Lobes I and II are shown in sand and yellow respectively and the hinge region in red. (B) Agropinic acid bound to the binding site of AgtB is shown in ruby/green sticks. Hydrogen bonds are shown in dashed lines in black (distance below 3.2 Å) and in green (distance between 3.2 and 3.4 Å).

4.2.2 AGTB RECOGNIZES AGROPINIC ACID ONLY: THE AGROPINIC ACID-BINDING SIGNATURE

Because the opine bound between the two closed lobes of AgtB is very well defined in its electron density maps, we were able to identify an agropinic acid molecule with its oxoproline ring instead of an agropine (Figure 30B). The agropine solution was thus analyzed by mass spectrometry which revealed the presence of agropine and agropinic acid. The ligand-binding site of AgtB is defined by Tyr37, Phe41, Glu89, Phe130, Tyr167, Ala208, Arg229, Glu252 and Tyr288 residues. The oxoproline ring of the agropinic acid is wedged between Tyr37, Phe41, Phe130 and Tyr288 aromatic residues and forms six interactions involving its carboxyl group and the side chains of Tyr37, Glu252 and Glu89 residues as well as its carboxylate group and the side chains of Arg229 and Tyr288.

The sugar moiety of the bound agropinic acid makes a hydrophobic stacking with Tyr167 residue and three hydrogen bonds with the side chain of Glu89 and the main chain

amino group of Ala208. Two hydroxyl groups of the sugar moiety establish a hydrogen bond with a water molecule which interacts with the carbonyl and amino groups of the main chains of Thr166 and with the carbonyl of the main chain and the carboxylate of the side chain of Asp164. Glu89 is a critical protein residue as it maintains both the oxoproline ring and the mannose part of the ligand through three hydrogen bonds. We were thus able to propose the agropinic acid binding signature for the PBP AgtB: $Y^{37}F^{41}E^{89}F^{130}Y^{167}A^{208}R^{229}E^{252}Y^{288}$.

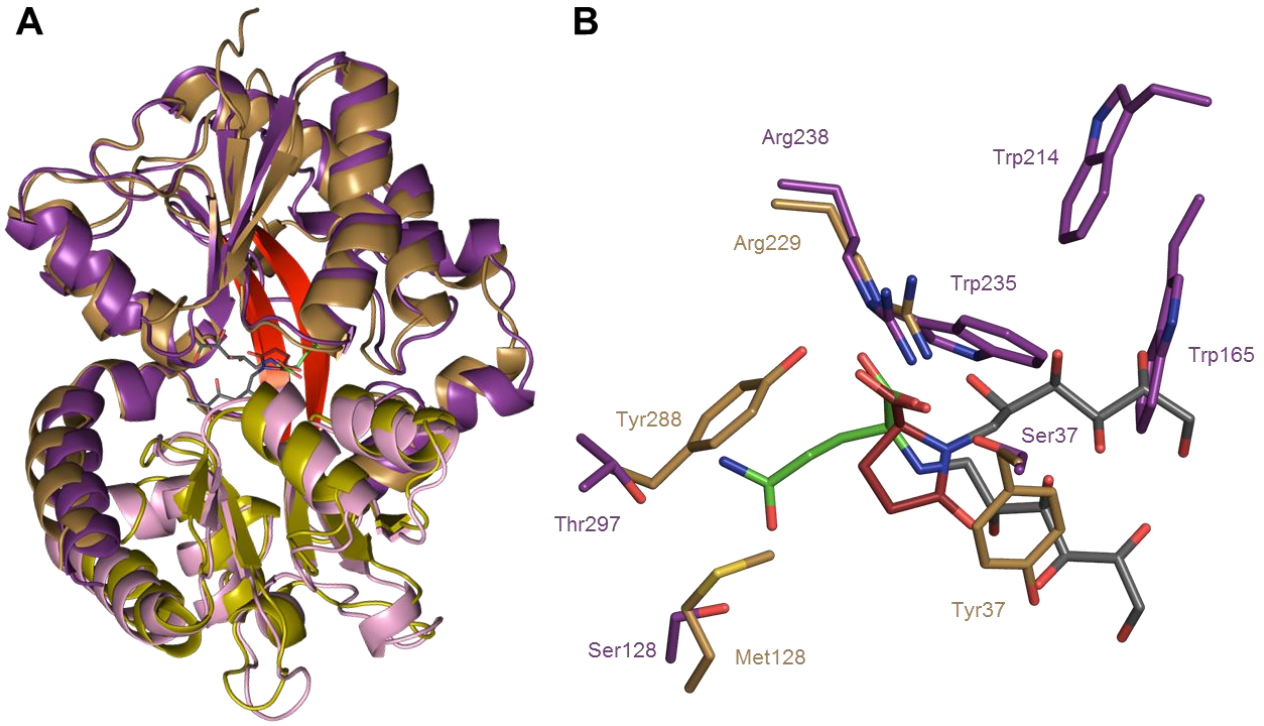


Figure 31 : (A) Superposition of ribbon representations of AgtB-agropinic acid (sand/yellow) and MotA-mannopine (purple/pink). (B) Structural comparison between agropinic acid (ruby/green) and mannopine (grey/green) in the ligand binding sites of AgtB (sand) and MotA (purple) respectively. The conserved arginine and residues making clashes with a ligand are shown.

The ligand binding sites between AgtB and the GABA-binding Atu4243 share three strictly conserved residues: Glu89, Arg229 and Tyr288 in AgtB, which are Glu82, Arg225 and Tyr284 in Atu4243. Atu4243 presents a narrow pocket adapted for a selective GABA-binding due to the presence of numerous aromatic residues making Van der Waals contacts and restricting the size of the ligand binding site to accommodate a GABA. AgtB possesses a larger binding site compared to Atu4243 enabling GABA binding as observed for MotA.

Although AgtB and its closest structural homolog MotA bind opines from the same opine family, their ligand binding sites display only one conserved residue corresponding to Arg229 in AgtB and Arg238 in MotA which locks the carboxylate group of the ligand. Upon superposition of both liganded MotA and AgtB structures, the presence of the cluster of

tryptophans at positions 165, 214 and 235 in MotA would prevent the binding of agropinic acid to MotA due to steric hindrance with the deoxymannosyl moiety (Figure 31B). AgtB could not bind ligand with amino acid moiety such as glutamine due to clashes between the side chain of this moiety and the protein side chains of Met128 and Tyr288 which correspond to Ser128 and Thr297 in MotA respectively. The presence of Tyr37 in AgtB (Ser37 in MotA) would also create a steric clash with the deoxymannosyl moiety of mannopine. Because agropine possesses a side chain moiety, this ligand cannot be accommodated in the ligand binding site of AgtB (Figure 32). Moreover, agropine does not contain the carboxylate group required to be locked by the conserved arginine.

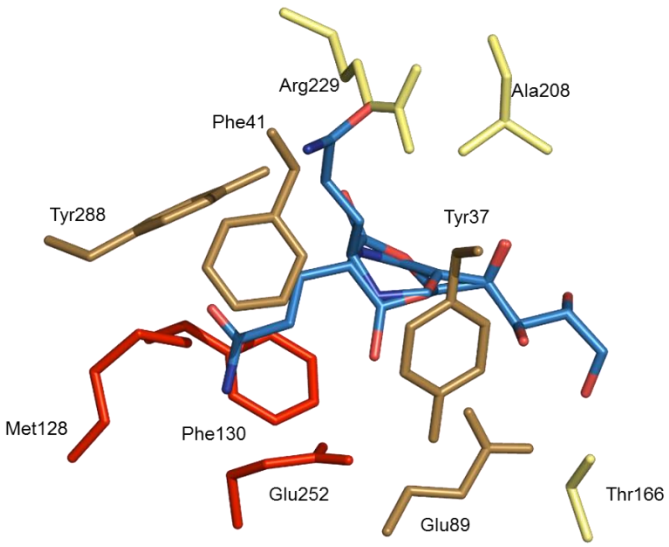


Figure 32 : Modelled agropine (blue) in two possible conformations in the binding site of AgtB by superimposing its common sugar-part upon that of agropinic acid.

4.2.3 AFFINITY OF AGTB AND AGAA TO AGROPINE, AGROPINIC ACID AND THE OTHER MANNITYL-OPINES

By intrinsic protein fluorescence titration, no interaction was surprisingly measured between AgtB and agropine. In contrast, the apparent dissociation constant (K_D) value between AgtB and agropinic acid, was 65 ± 17 nM (Figure 33), showing that AgtB is very efficient for agropinic acid binding. Using isothermal titration calorimetry (ITC), the mean K_D value is the same as fluorescence titration with no interaction observed for AgtB-agropine and 51 ± 8.7 nM for AgtB-agropinic acid (Figure 33). The ITC data showed the 1:1 binding stoichiometry and a negative enthalpy change upon the ligand fixation, suggesting that the binding is enthalpy driven.

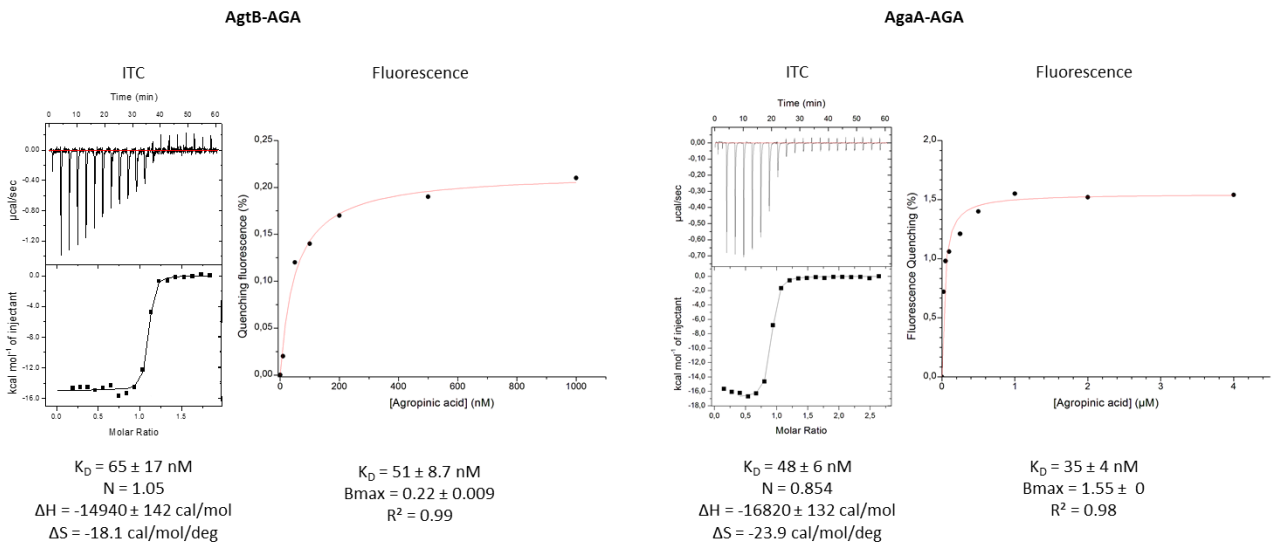


Figure 33 : ITC and fluorescence K_D measurements. The left graphs of AgtB and AgaA microcalorimetry experiments show heat differences upon injection of agropinic acid (top panel) and integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single binding model using Microcal Origin® (low panel). The right graphs show AgtB and AgaA fluorescence monitoring upon titration with agropinic acid and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicates.

For AgaA, intrinsic protein fluorescence titration showed a K_D value of 35 ± 4 nM for agropinic acid (Figure 33) and no interaction for agropine. The mean K_D value obtained using ITC was 48 ± 6 nM AgaA-agropinic acid, in the same magnitude than that from fluorescence, and no interaction was observed between AgaA and agropine. The ITC data confirmed the 1:1 binding stoichiometry and showed a negative enthalpy change for agropinic acid, suggesting that the binding was enthalpy driven.

With both fluorescence titration and ITC techniques, no interaction could be measured between AgtB or AgaA and mannopine or mannopinic acid, and between AgtB and DFG or glucopine. The fluorescence titrations performed between the PBPs MotA and MoaA from strain B6 with agropine showed no interaction.

4.2.4 AgaA fold is a PBP from class C

The mature AgaA expression plasmid was obtained by cloning the AgaA gene lacking the first twenty-four signal sequence residues that serve for localization to bacterial periplasm. The X-ray structure of the liganded AgaA with agropinic acid was determined at 1.65 Å resolution (Table 5) by molecular replacement. The liganded crystal contained one molecule in the asymmetric unit. The mature AgaA structure is a monomer of 493 residues composed of two lobes, each formed by a central β-sheet flanked by α-helices. The biggest lobe (lobe 1) consists of residues 25–258 and 479–515 and the smallest (lobe 2) comprises

the residues 264–473. The two lobes are connected by a very short hinge region of 10 residues defining two short segments (Figure 34A). AgaA fold belongs to the cluster C within the PBP structural classification.

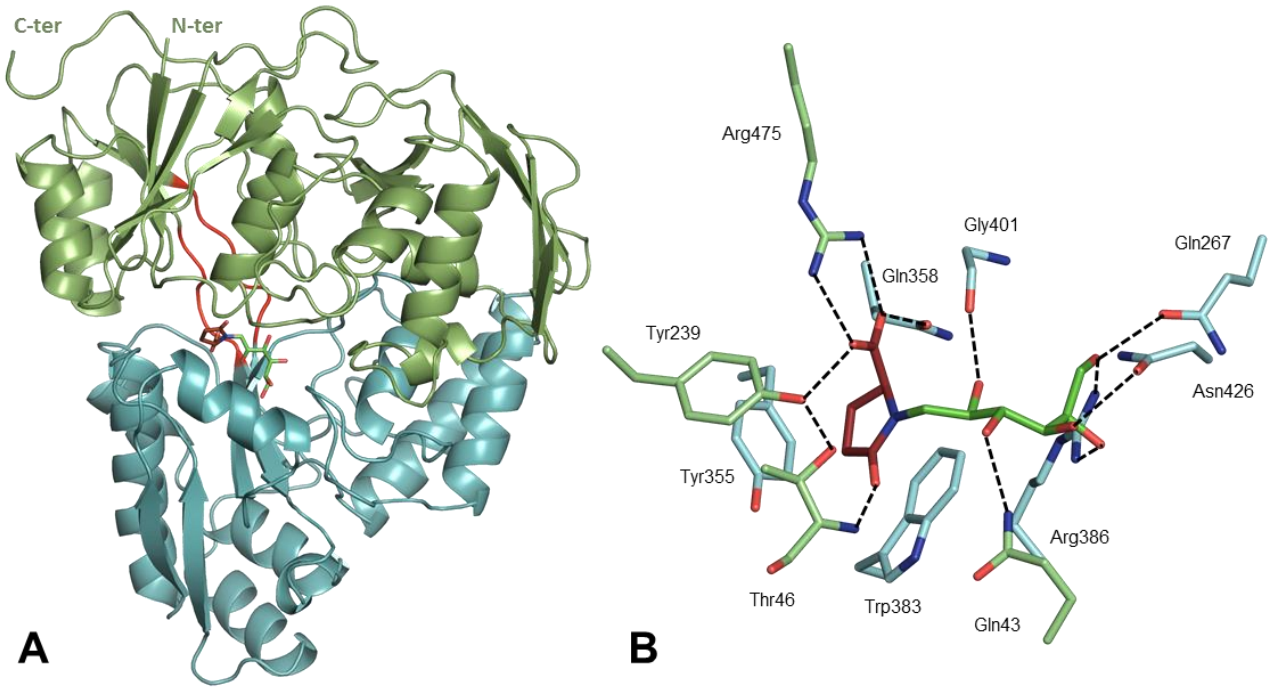


Figure 34 : (A) Ribbon representation of the AgaA-agropinic acid structure. Lobes I and II are shown in forest and cyan respectively and the hinge region in red. (B) Agropinic acid bound to the binding site of AgaA is shown in ruby/green sticks. Hydrogen bonds are shown in dashed lines in black (distance below 3.2 Å).

A structural comparison to all entries in the PDB using SSM-EBI (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm) showed that the most similar overall structures were PBPs from the same cluster C (Table 4), *ie* dipeptide-bound DppA from *E. coli* (PDB: 1DPP), *Yersinia pestis* (PDB: 5F1Q) and *Pseudoalteromonas sp.* (PDB: 4QFN), *E. coli* OppA with a bound tripeptide (PDB: 3TCG), *Bacillus subtilis* AppA with a bound nonapeptide (PDB: 1XOC), *Staphyloccoccus aureus* protein NikA with a two-histidines- chelated nickel (PDB: 4XKN), *Haemophilus parasuis* HbpA in complex with a gluthatione disulfide (PDB: 3M8U), *Vibrio cholere* chitin oligosaccharide binding protein in complex with a diacetyl-glucosamine (PDB: 1ZU0), *Thermotoga maritima* TM1223 complexed with mannobiose (PDB: 4PFT), *A. tumefaciens* AccA complexed with agrocinopine A (PDB: 4ZE8) and *Campilobacter jejuni* NikZ with an bound oxalate-chelated nickel (PDB: 4OEV). The values of RMSD range from 1.85 to 2.6 Å over 423 to 456 residues. Superposition with other PDB-entries results in an RMSD of over 2.6 Å for less than 410 Cα atoms. Therefore, the most similar PBPs bind either oligopeptides or nickel ions or oligosaccharides.

Table 4 : SSM-EBI structural comparisons between AgaA, AgtB and their respective homologous PBPs from the PDB.

PDB code	Sequence identity (%)	RMSD (Å) (number of aligned residues)	Organism	Ligand
AgaA				
5F1Q	27	1.85 (447)	*Yersinia pestis*	Dipeptide
1DPP	27	1.86 (457)	*E. coli*	Dipeptide
3M8U	26	2 (434)	*Haemophilus parasuis*	Gluthatione disulfide
1XOC	24	2.08 (444)	*Bacillus subtilis*	Nonapeptide
4QFN	23	2.12 (453)	*Pseudoalteromonas sp.*	Dipeptide
3TCG	25	2.19 (447)	*E. coli*	Tripeptide KGE
4XKN	24	2.32 (424)	*Staphylococcus aureus*	Ni^{2+}+2 histidines
1ZU0	22	2.34 (422)	*Vibrio cholere*	Di-acetyl-glucosamine
4PFT	21	2.43 (427)	*Thermotoga maritima*	Mannobiose
4ZEB	24	2.61 (433)	*A. tumefaciens*	Agrocinopine A
AgtB				
4EUO	33	1.65 (301)	*A. tumefaciens*	GABA
3RPW	27	2.02 (302)	*Rhodopseudomonas palustris*	Empty
4I1D	31	2.3 (290)	*Bradyrhizobium japonicum*	Empty
1POT	22	2.11 (268)	*E. coli*	Spermidine

4.2.5 AGAA SPECIFICALLY RECOGNIZES AGROPINIC ACID

The agropinic acid bound between the two closed lobes of AgaA is well defined in the electron density maps and is surrounded by Gln43, Thr46, Tyr239, Gln267, Tyr355, Gln358, Trp383, Arg386, Gly401, Asn426 and Arg475 residues (Figure 34B).

The oxoproline part of the ligand wedged between the aromatic residues Tyr239, Tyr355 and Trp383 interacts *via* its carboxylate group with the guanidinium group of Arg475 and the side chains of Gln358 and Tyr239, and *via* its carboxyl group with Thr46. Each hydroxyl group of the ligand deoxymannosyl moiety makes at least a hydrogen bond involving the side chains of Gln43, Gln267, Arg386 and Asn426, and the main chain carbonyl of Gly401.

Although the agropinic acid oxoproline part is well maintained in the bonding site, no interaction was measured by fluorescence between AgaA and a single oxoproline residue, suggesting the necessity of the sugar part for the ligand binding. Thus, we were able to propose the agropinic acid binding signature $Q^{43}T^{46}Y^{239}Q^{267}Y^{355}Q^{358}W^{383}R^{386}G^{401}N^{426}R^{475}$ for the PBP AgaA.

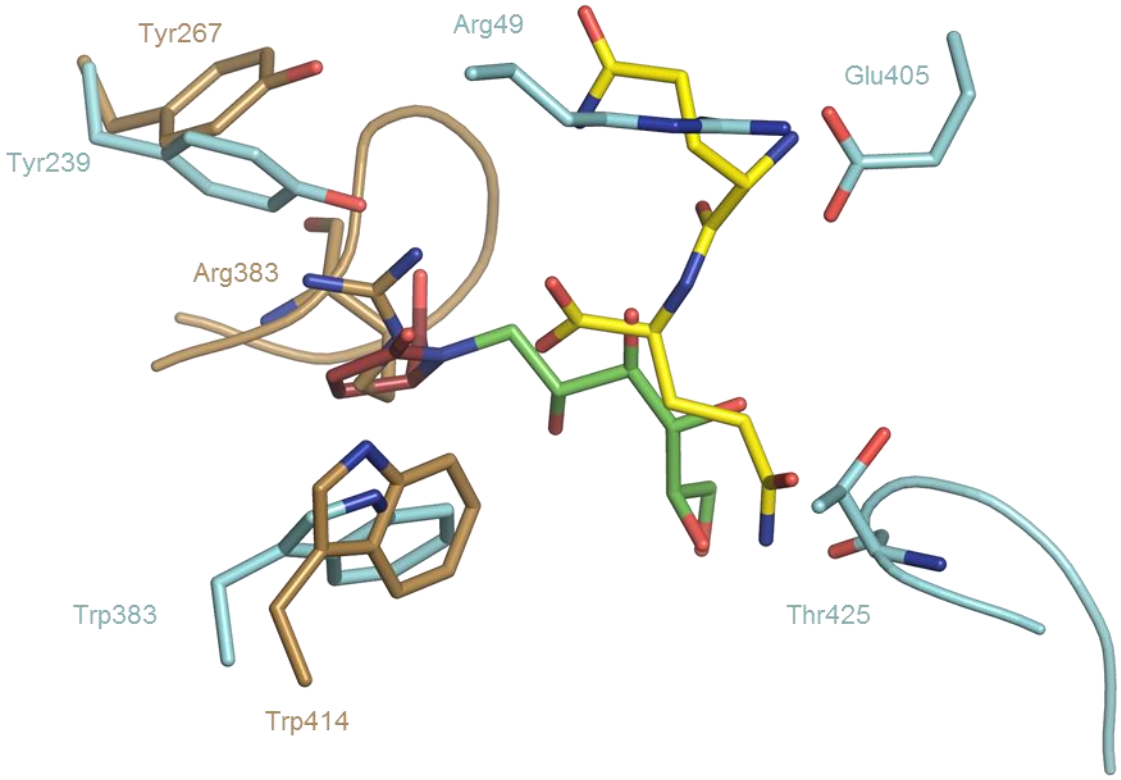


Figure 35 : Structural comparison between agropinic acid (ruby/green) and Gln-Gln dipeptide (yellow) in the ligand binding sites of AgaA (cyan) and YPN3652 (sand, PDB code 5F1Q) respectively. The conserved residues and residue making clash with a ligand are shown.

The ligand binding sites between AgaA and its closest structural homolog (*Y. pestis* YPN3652 complexed with Gln-Gln dipeptide, PDB code 5F1Q) share only two conserved residues: Tyr239 and Trp383 in AgaA, which are Tyr239 and Trp414 in YPN3652 (Figure 35). YPN3652 possesses an additional six-residues loop (382-387) compared to AgaA which constrains the ligand dipeptide in a position and an orientation different from that of the agropinic acid in AgaA. Structural comparison shows that this loop in YPN3652 which enters the binding site of AgaA contains the Arg383 that would clash with the bound agropinic acid. Furthermore, the region 423-427 in AgaA would make steric hindrance with a bound dipeptide.

4.2.6 COMPARISON BETWEEN AGTB AND AGAA STRUCTURES

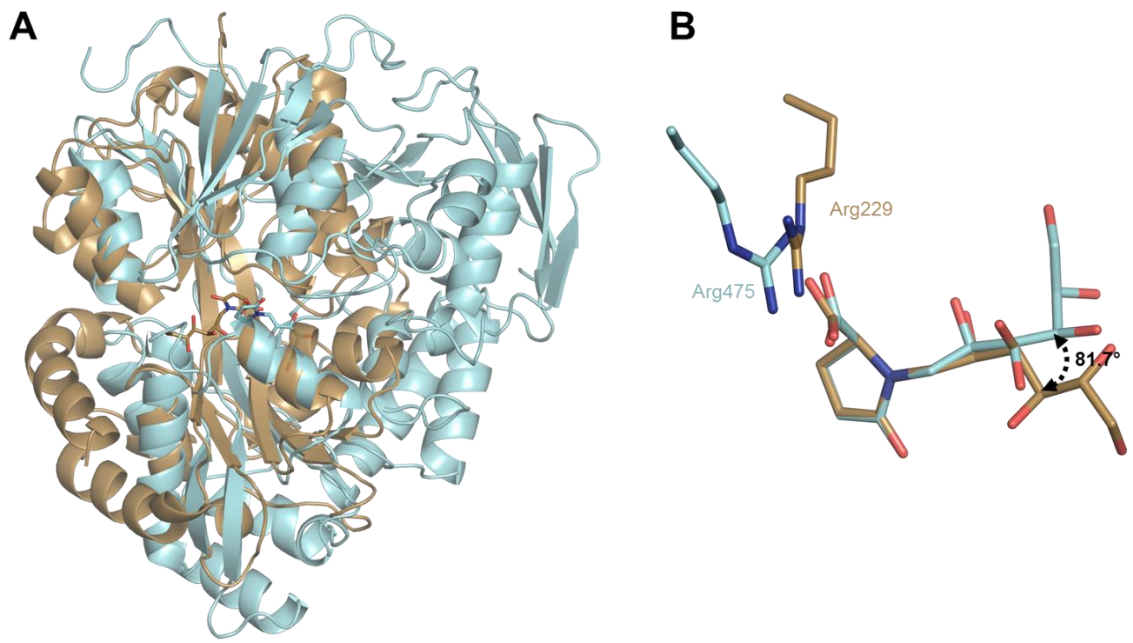


Figure 36: Comparison of AgtB and AgaA in complex with agropinic acid. (A) Superposition of ribbon representations of AgtB (sand) and AgaA (cyan). Agropinic acid bound to AgtB and AgaA is shown as sand and cyan sticks respectively. (B) Superposition of the bound agropinic acid in AgtB (sand) and in AgaA (cyan) showing functionally conserved residues. A 81.7° rotation between both sugar moieties of agropinic acid is observed.

Superimposed AgtB and AgaA overall structures show no similarity (RMSD value of 19.55 Å), as both PBPs belong to two different clusters (Figure 36A). Hence, the ligands bound in the binding site exhibit different conformations and opposite orientations.

Superimposed AgtB-agropinic acid and AgaA-agropinic acid structures according to their ligand show no structurally conserved residue in the binding site. However, Arg228 residue in AgtB, and Arg475 in AgaA conserved the same function in both proteins: their guanidinium group makes two interactions with the carboxylate group of the agropinic acid (Figure 36B). The curvature of the sugar moiety of agropinic acid in AgtB differs in AgaA by a rotation of a 81.7°around the C3 position, while the oxoproline moiety of the ligand adopts a similar conformation in both PBPs.

4.2.7 AGTB IS BRANCHED WITH A FEW BACTERIA

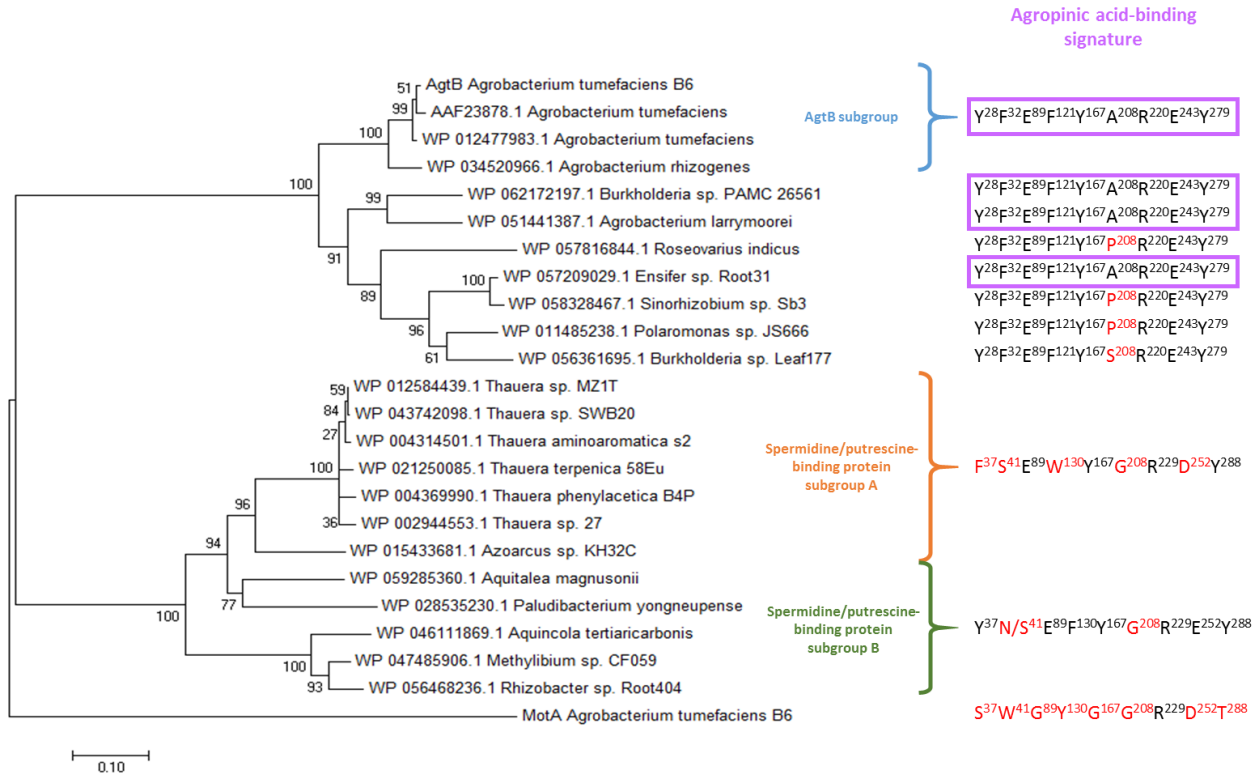


Figure 37 : AgtB phylogeny and agropinic acid-binding signature. The displayed tree was rooted with MotA sequence. For each protein or protein cluster, the residues which are identical to (black) and different from (red) those involved in the binding of agropinic acid part (purple box) are indicated.

One hundred bacterial AgtB-homologous PBPs with a threshold set at least 40% of identity were recovered using blastP from NCBI. The relation tree constructed from these 100 sequences revealed different subgroups. The closest AgtB relatives and MotA were used to build a novel relation tree (Figure 37). This analysis revealed a clade with a solid bootstrap value of 100% containing the highly AgtB-similar PBPs that share more than 93% identity. All of them are described as agropine-binding proteins and possess the agropinic acid-binding signature $Y^{37}F^{41}E^{89}F^{130}Y^{167}A^{208}R^{229}E^{252}Y^{288}$. They belong to two *A. tumefaciens* octopine/mannityl-opine strains and *A. rhizogenes* whose the genomes exhibited a strong synteny with respect of the *agt* operon region of *A. tumefaciens* B6. The α-proteobacteria *Agrobacterium larrymoorei*, *Roseseovarius indicus*, *Ensifer sp.* Root 31 and *Sinorhizobium sp.* Sb3, and remarkably the β-proteobacteria *Burkholderia sp.* PAMC 26561 and Leaf177, and *Polaromonas sp.* JS666 (73 to 66% identity sequence with AgtB) are agropinic acid-assimilating bacteria. Indeed, their binding site only differs by P/S^{208} instead of A^{208}, and modelling revealed that this would not affect the agropinic acid binding. All members of the other subgroups in which agropinic acid-signature is degenerated are

annotated as putative putrescine/spermidine-binding PBPs. The binding signature is also strongly degenerated in MotA in line with 31% sequence identity with AgtB.

4.2.8 THE AGAA PHYLOGENETICAL CLUSTER IS BRANCHED WITH PEPTIDE BINDING PROTEINS

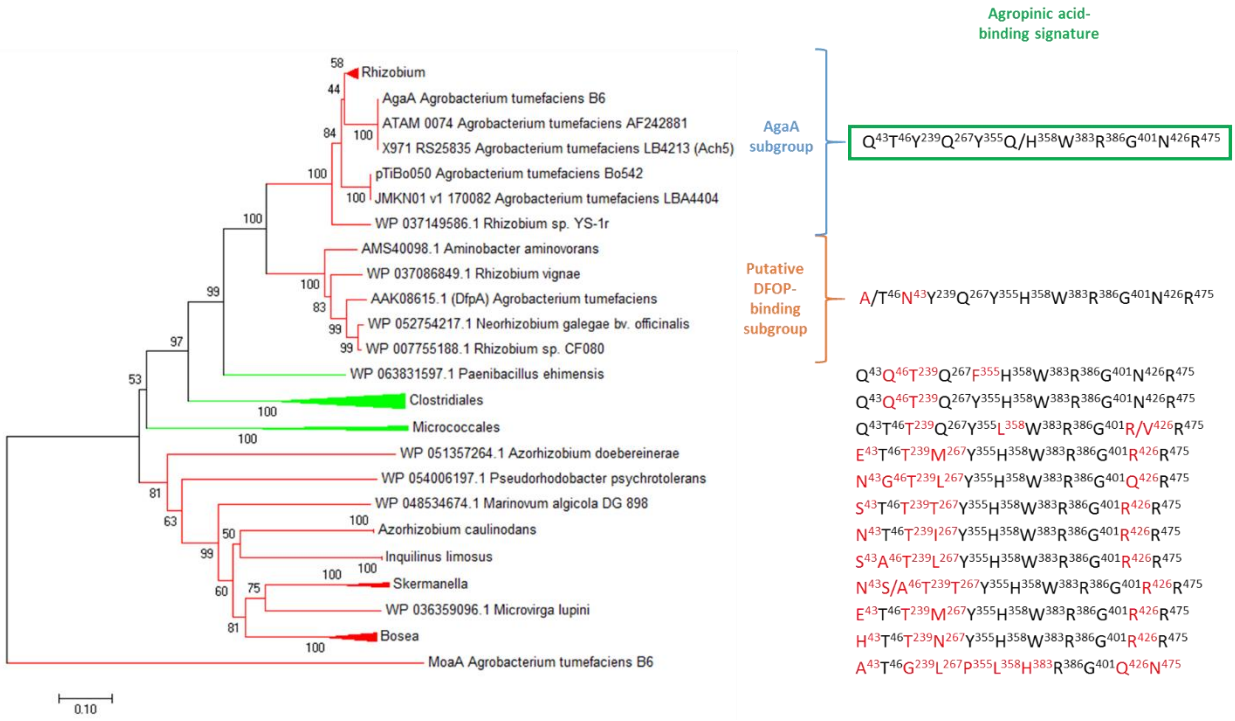


Figure 38 : AgaA phylogeny and agropinic acid-binding signature. The displayed tree was rooted with MoaA sequence. The branches are collapses when the clade is composed of proteins from a same genus and are colored in red for α-proteobacteria, and green for Actinobacteria and Firmicutes. For each protein or protein cluster, the residues which are identical to (black) and different from (red) those involved in the binding of agropinic acid (green box) are indicated.

One hundred bacterial AgaA-homologous PBPs with a threshold set at least 40% of identity were recovered using blastP from NCBI. To these were added four other homologous sequences found in the Agrobacterium genomes of the AgrobacterScope genome library (Genoscope, France). The relation tree constructed from these 104 sequences revealed different subgroups. The closest AgaA relatives and MoaA were used to build a novel relation tree (Figure 38). This analysis revealed a clade with a solid bootstrap value of 100% containing the highly AgaA-similar PBPs that share more than 84% identity. All of them are described as agropinic acid-binding proteins but only three of them (*Agrobacterium tumefaciens* AF242881, Ach5 and Bo542 octopine/agropine type strains) possess an identical agropinic acid-binding signature $Q^{43}T^{46}Y^{239}Q^{267}Y^{355}Q^{358}W^{383}R^{386}G^{401}N^{426}R^{475}$. The other proteins of the subgroup exhibit H^{267} instead of Q^{267}, which would not affect agropinic acid binding, as modelling revealed.

They all belong to Rhizobiales containting four *Agrobacterium* and six *Rhizobium* species. In the nearest subgroup, only T^{46} is replaced by A^{46} in *Rhizobium sp.* CF080 homolog and N^{43} is replaced by Q^{43} in the binding signature. These two changes would not alter the binding of agropinic acid, as modelling revealed. Among this clade, containing proteins sharing between 68 and 70% identity with AgaA, is found *Agrobacterium tumefaciens* DfpA sequenced from chrysopine-type pTiChry5 which allows the metabolism of opines of the chrysopine family. One of this opine, deoxyfructosyloxoproline (DFOP), which is chemically similar to agropinic acid, might be bound by AgaA-homolog DfpA. The other PBPs of this clade are annotated as peptide binding proteins but as the potential DFOP-binding signature is conserved, these PBPs could bind DFOP.

Other homologs, sharing less than 60% identity with AgaA, belong to α-proteobacteria (*Bosea*, *Skermanella*, *Inquilinus*, *Azorhizobium*), actinobacteria (*Pseudoarthrobacter*, *Microbacterium*) and firmicutes (*Clostridium*, *Paenibacillus*). They possess a degenerated agropinic acid-binding signature and modelling indicates that the the Q^{46} instead of T^{46} and R^{426} instead of N^{426} would forbid the binding of agropinic acid. The binding signature is also strongly degenerated in MoaA in line with 27% sequence identity with AgaA.

4.2.9 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* R10 STRAIN IS ABLE TO IMPORT AGROPINE

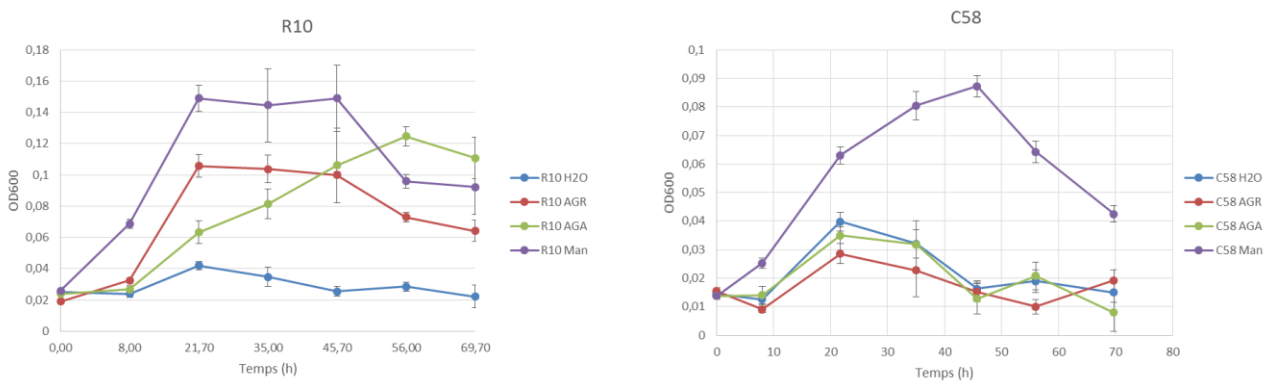


Figure 39 : OD monitoring (600 nm) of *Agrobacterium tumefaciens* R10 (left) and C58 (right) strains cultures in presence of agropine (red), agropinic acid (green) and mannitol (purple) as carbon source and in absence of any carbon source (blue) in AB minimum medium.

Agrobacterium tumefaciens R10 strain exhibits an octopine-type pTi like B6 strain. R10 strain was used for growth experiments with agropine and agropinic acid. When present as the sole carbon source for *A. tumefaciens* R10, agropinic acid is used as nutrient by the bacteria as indicated by bacterial growth (Figure 39). A faster growth is observed with pure

agropine used as a sole carbon source for R10 confirming the agropine importation and degradation abilities of R10 strain. No significant growth is observed for C58 on both agropine and agropinic acid.

4.2.10 CONSTRUCTION OF AN *AGT*-OPERON MUTANT

In order to validate the inability of Agt transport system to uptake agropine in B6, a Campbell construction was built by the insertion of a fragment of *agtB* gene followed by a gentamycin resistance cassette in pGEM-T-Easy plasmid. However, despite several trials varying gentamicine concentrations, DNA quantities, electroporation parameters and on the different strains B6, R10 and C58 pTiA6 (octopine-type), no Campbell insertion was observed.

4.3 METHODS

Synthesis and purification of opines.

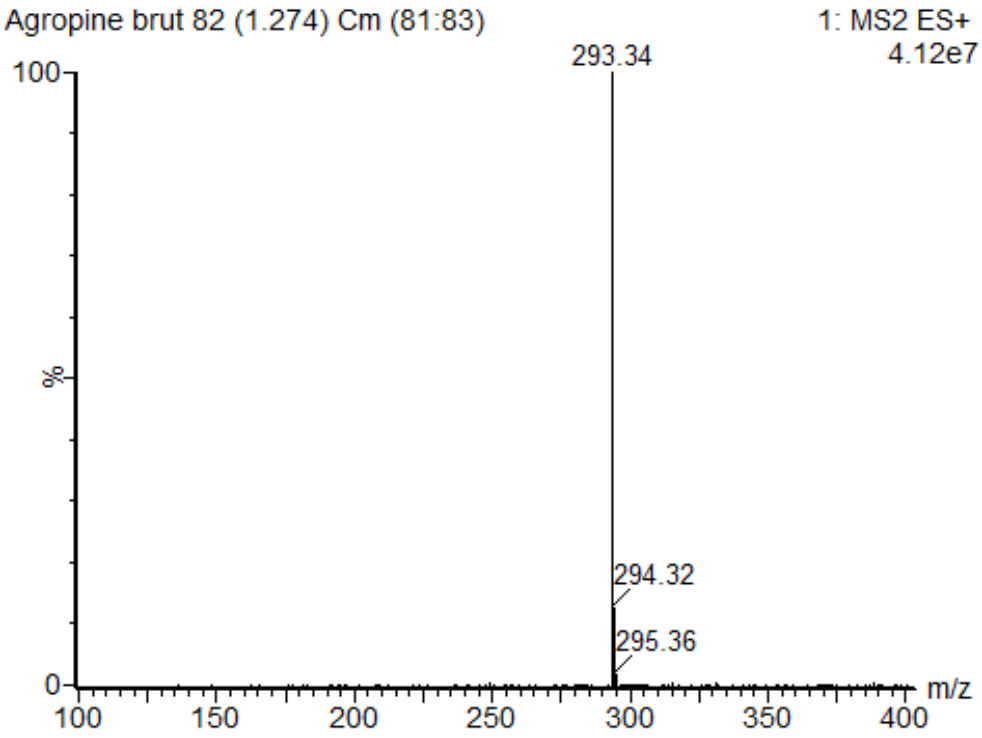


Figure 40 : Mass spectrum of agropine after purification.

Agropine and agropinic acid were synthesized from mannopine as previously described (Petit *et al.* 1983). After having seen that a proportion of agropine spontaneously lactamized, 100 µL agropine was injected in a HPLC 2695 system using a Atlantis Hilic Silica column, washed with 10 mM ammonium formate pH 3 (A) and eluted by gradient with

acetonitrile (B) at a 4-mL/min flow. Pure agropine was eluted at 25%/75% A/B ratio. Acetonitrile was then evaporated and agropine was frozen in liquid nitrogen. The purity of agropine was checked by mass spectrometry (Figure 40).

Expression and purification of AgtB and AgaA

The synthetic genes (Genscript) coding for the mature AgtB and AgaA were inserted into pET-28b and pET-29b, respectively. *E. coli* BL21 pLysS were transformed either by pET-28b-*agtB* and *E. coli* Rosetta pLysS by pET-29b-*agaA*. Cells were grown at 37°C in LB broth supplemented with 0.5 mM IPTG for protein production. Cells were centrifuged, resuspended in a buffer of 50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole and 500 mM NaCl, and disrupted by sonication. After centrifugation at 25 000 g for 30 min at 4 °C, the supernatant was loaded onto a 5 mL His-Trap column (GE Healthcare). Protein elution was performed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. Protein fractions were loaded onto a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl.

Crystallization and structure determination

Crystallization conditions (Table 5) for liganded AgtB and AgaA (molar ratio of protein:ligand used was 1:5) were screened using the QIAGEN kits. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (22% PEG 400 or 25% Glycérol) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA I and II beamlines at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France). Data collection and processing statistics are given in Table 1. All structure determinations were performed by molecular replacement with PHASER. The coordinates of the N-terminal (residues 29 to 128 and 253 to 310) and the C-terminal (residues 131 to 250 and 324 to 341) domains of a AgtB model from @TOME-2 meta-server was used for AgtB-agropinic acid structure. Structure determination of AgaA-agropinic acid was performed using the coordinates of the N-terminal (residues 30 to 255 and 480 to 499) and the C-terminal (residues 262 to 473) domains of an AgaA model from @TOME-2 (Pons and Labesse 2009). Refinements were performed with BUSTER-2.10 (Blanc *et al.* 2004) with NCS restraints when necessary and TLS groups. All electron density maps were evaluated using COOT. Refinement details are shown in Table 5. Molecular graphics images were generated using PYMOL (www.pymol.org).

Table 5 : Crystallization conditions, crystallographic data and refinement parameters.

Protein	AgtB-agropinic acid	AgaA-agropinic acid
Crystallization conditions	28% PEG 4K, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $CaCl_2$	24% PEG 4K, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M $CaCl_2$
PDB code		
Space group Cell parameters (Å,°)	P1 *a* = 40.6 *b* = 86.3 *c* = 106.5 *α* = 71.1 *β* = 81 *γ* = 76.3	P622 *a* = 89.3 *b* = 89.3 *c* = 285.8
Resolution (Å)	50-1.74 (1.85-1.74)	50-1.65 (1.74-1.65)
No. of observed reflections	451101 (64995)	2274669 (341154)
No. of unique reflections	129664 (19223)	82437 (12777)
R_{sym} (%)	11.6 (89.7)	13.2 (205.2)
Completeness (%)	95.6 (87.3)	99.6 (97.6)
I/σ	7.58 (1.3)	19.2 (1.73)
$CC_{1/2}$	99.4 (52.8)	99.9 (60.5)
R_{cryst} (%)	18.2	16.5
R_{free} (%)	21.0	18.0
rms bond deviation (Å)	0.01	0.01
rms angle deviation (°)	1.01	0.95
Average B (Å^2) protein ligand solvent	 32.0 24.7 32.0	 27.6 40.9 42.9

Values for the highest resolution shell are in parentheses

K_D measurements by fluorescence titration and microcalorimetry

The binding of each ligand to AgtB and AgaA was monitored by autofluorescence by excitating the proteins at a 295-nm wavelength and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophans at 330 nm. All experiments were performed at 24°C in triplicates in 50 mM Tris-HCl pH 8 and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (5 µM) and increasing concentrations of ligand using a Tecan infinite M1000 PRO microplate reader (Tecan Group SA). Each ligand has no emission signal at 330 nm. The data were analyzed using Origin 7 software (ORIGIN®) and fitted to the equation $f=\Delta Fluorescence_{max}*abs(x)/(KD+abs(x))$.

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal Llc (Northampton, MA). The experiments were carried out at 20°C. Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) was 50 µM. 19 injections of 2 µl of the ligand solution at 500 µM, were performed at 180 s intervals while

stirring at 1000 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with the software supplied by MicroCal (ORIGIN®). This software uses the relationship between the heat generated by each injection and ΔH (enthalpy change in $Kcal.mol^{-1}$), Ka (the association binding constant in M^{-1}), n (the number of binding sites), total protein concentration and free and total ligand concentrations.

Phylogenetic analysis

Sequences were analyzed using blastP from NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Alignments of AgtB and AgaA and related sequences were conducted using the ClustalW software. Relationship tree was build using the MEGA software, 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.

Agropine and agropinic acid uptake assays

A single colony of Agrobacterium tumefaciens R10 was grown overnight at 28°C in AB media supplemented with mannitol (2 g/L). 100 µL of AB media in presence of a carbon source (agropine, agropinic acid or mannitol at a final concentration of 1 mM) or in absence of any carbon source were inoculated at an initial OD600 of 0.03 and the OD was monitored for 72 hours on 96-well plates, with 4 repetitions. The same treatment was done with C58 strain, which is not able to grow on agropine and agropinic acid, as a control.

Construction of the pGEM-Agt-Gen plasmid

The primers 5'-CAACGTGACCTGGGATGTGA-3' and 5'-AAAAAGCTTAAGCCTGGATATCGGAAGCG-3' containing HindIII restriction site were used to PCR-amplify a 404-nucleotides sequence of *agtB* gene from *A. tumefaciens* B6 strain genome. The amplicon and the linear pGEM®-T Easy plasmid (Promega) were ligated with the Promega pGEM® kit. The obtained plasmid, named pLMH-A, and a p34S-Gentamycine-cassette were digested with HindIII, and the obtained then purified gentamycine cassette was ligated into pLMH-A, giving the pLMH-AG plasmid. The sequence was checked by GATC Biotech.

4.4 CONCLUSION

Dans ce chapitre, je présente les structures des deux PBP AgtB et AgaA en complexe avec de l'acide mannopinique. Je montre qu'elles possédent toutes deux un mode de fixation différent pour cette opine, dont la signature est conservée essentiellement chez les bactéries possédant un pTi ou pRi de type octopine ou agropine. J'ai également montré par deux méthodes biophysiques qu'elles sont toutes deux spécifiques de cette mannityl-opine et présentent la même affinité de l'ordre du nanomolaire, ce qui suggère que cette opine est importée avec la même efficacité par deux transporteurs différents. Ces résultats posent la question de l'utilité pour la bactérie de posséder deux systèmes de transport différents pour une même opine.

De manière inattendue, j'ai constaté qu'AgtB ne fixe pas l'agropine, ce qui remet en question les résultats obtenus par une approche génétique. Des tests de croissance de la souche R10 (possédant, tout comme B6, un pTi de type octopine), montrent que cette opine est tout de même transportée. Ces derniers résultats suggèrent qu'une autre PBP associée au système de transport AgtAC ou un autre sytème de transport complet permet l'import de cette opine

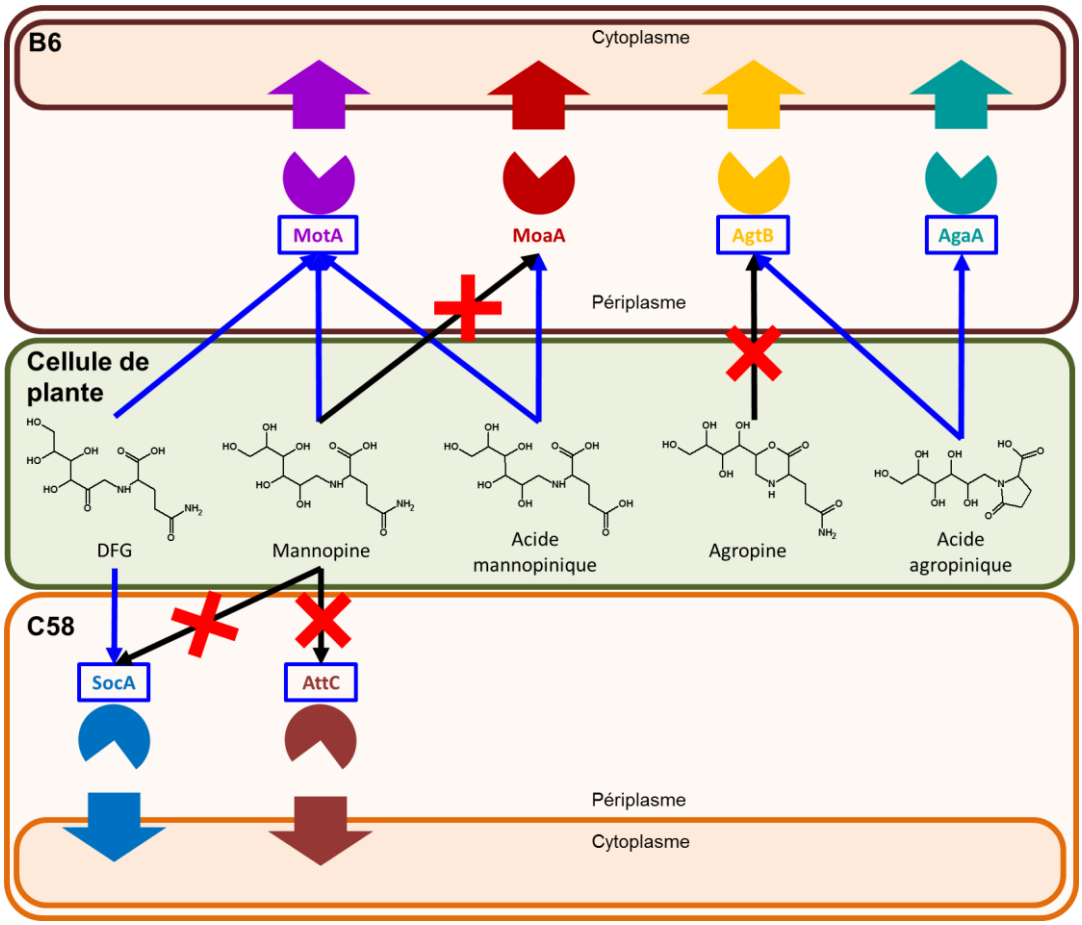


Figure 41 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de ma thèse. Les camemberts représentent les PBP étudiées et les flèches épaisses de couleur représentent les transporteurs ABC associés. Les noms des PBP sont entourés en bleu lorsque la structure a été determinée. Les flèches bleues représentent les interactions découvertes ou confirmées. Les flèches noires barrées d'une croix rouge représentent les interactions inexistantes entre opine et PBP.

Ce travail de thèse a permis de comprendre le mode de fixation des PBP impliquées dans le transport des mannityl-opines dont la mannopine, l'acide mannopinique et l'acide agropinique (Figure 41). Seul le transport de l'agropine reste encore à élucider. Le transport de la désoxy-fructosyl-glutamine (DFG), qui est un intermédiaire dans la synthèse de la mannopine, a aussi été étudié. J'ai ainsi pu montrer que MotA, décrite comme fixant la mannopine, est aussi capable de fixer la DFG et l'acide mannopinique avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. J'ai également confirmé la spécificité des PBP AgaA et MoaA pour l'acide agropinique et l'acide mannopinique respectivement. En outre, j'ai identifié l'acide agropinique comme étant le ligand spécifique de la PBP AgtB, alors que l'agropine avait été décrite comme tel. J'ai alors commencé la construction d'un mutant de la souche *A. tumefaciens* B6 pour le transporteur Agt complet afin de déterminer s'il est bien responsable

de l'import de l'agropine. Par ailleurs, j'ai pu déterminer qu'aucune mannityl-opine n'est le ligand de la PBP AttC, pourtant annotée *mannopine binding-like* chez la souche C58. Enfin, j'ai montré que la PBP SocA, décrite comme étant capable de fixer la DFG et la mannopine, est en réalité spécifique de la DFG.

Ce travail est fondé sur une combinaison d'études biophysiques, à savoir les déterminations des affinités et des structures de chaque PBP (Annexe 1), sur des études bioinformatiques par phylogénie et modélisation, et sur des études fonctionnelles, par des tests de croissance.

Les résultats décrits dans les chapitres précédents sont discutés dans ce chapitre et les travaux intéressants à réaliser à court ou long terme y sont aussi présentés.

5.1 TRANSPORT DU DFGA ET D'AUTRES COMPOSÉS D'AMADORI

Les études d'affinité et la caractérisation structurale de la PBP MotA ont montré que cette protéine peut transporter l'acide mannopinique, confirmant ce qui avait déjà été observé (Dessaux, Tempé and Farrand 1987; Dessaux *et al.* 1988). Le précurseur de l'acide agropinique est le désoxyfructosylglutamate (DFGA), dont la structure est similaire à celle de la DFG. En effet, la chaine latérale de la partie résidu de la DFG ne diffère de celle du DFGA que par son groupement amide, remplacé par un groupement carboxylate chez le DFGA. Il est donc possible que MotA soit capable de transporter cette opine. Sa dégradation serait alors assurée par MocE et MocD, similaire à l'enzyme Mas2 capable de synthétiser la DFG et le DFGA. MotA assurerait ainsi un rôle de transporteur de haute affinité pour un type particulier d'opines, qui pourrait par la suite être métabolisées par les produits de la région *moc* de catabolisme non spécifique des mannityl-opines. Cette capacité permettrait à la bactérie d'utiliser quatre molécules différentes (la mannopine, la DFG, l'acide mannopinique et le DFGA) pour un coût minimal en énergie, ce qui lui confèrerait un large avantage en milieu compétitif. Pour confirmer cette hypothèse, des tests d'interaction entre MotA et le DFGA par ITC et microcalorimétrie seront réalisés lorsque que nous serons en possession de cette molécule.

Nous avons montré que SocA, qui fixe la DFG, est aussi capable de fixer de la glutamine et du glutamate à des affinités de l'ordre du micromolaire. SocA pourrait donc fixer le DFGA, et peut-être même d'autres composés d'Amadori formés à partir d'un

désoxyfructose et d'un acide aminé, tels que la désoxyfructosyl-glycine, la désoxyfructosyl-alanine, ou la désoxyfructosyl-valine.

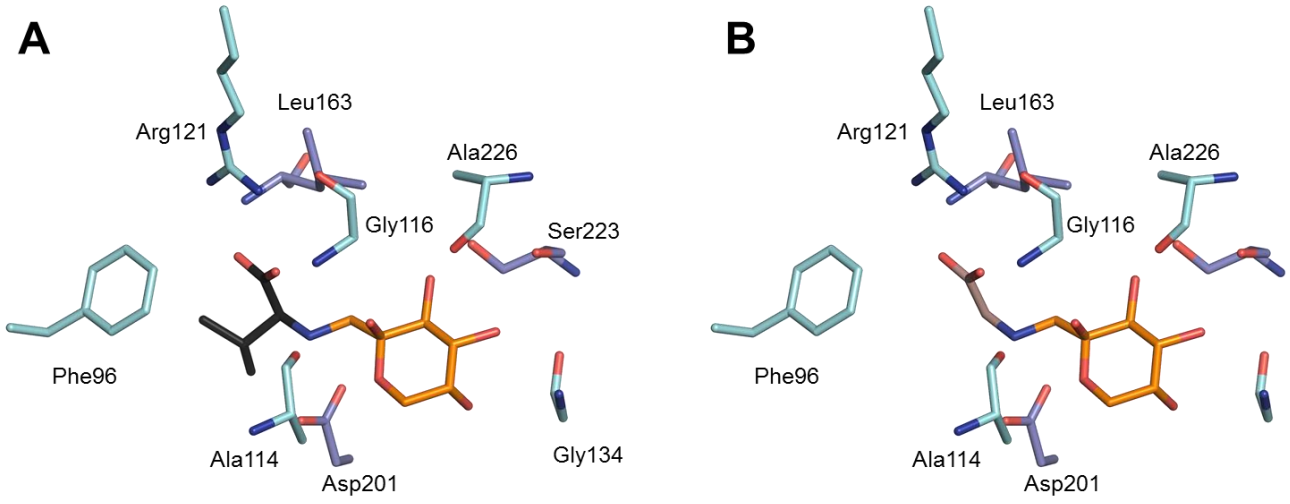


Figure 42 : Composés d'Amadori substrats de l'Amadoriase SocD modélisées dans le site de fixation de SocA par superposition avec la DFG. (A) Désoxyfructosyl-valine en noir/orange et (B) désoxyfructosyl-glycine en saumon/orange.

Cette hypothèse est renfoncée par les études de Hirokawa et Kajiyama (Hirokawa and Kajiyama 2002) qui ont montré que l'Amadoriase SocD, une des enzymes de catabolisme de l'opéron *soc*, peut dégrader au moins deux composés d'Amadori : la désoxy-fructosyl-glycine et la désoxy-fructosyl-valine. Une modélisation de ces deux molécules dans le site de fixation de SocA montre que SocA peut en effet accommoder ces deux composés (Figure 42). L'opéron *soc* permettrait donc l'utilisation par la bactérie de plusieurs composés d'Amadori formés d'une partie désoxyfructosyl et d'une partie acide aminé possédant une chaîne latérale courte. En effet, contrairement à la glutamine ou au glutamate, il n'y a pas d'interaction entre SocA et l'arginine. Ceci s'explique par modélisation où la chaine latérale de l'arginine établirait un clash stérique avec la Met52 dans le site de fixation. Ces résultats montrent que la partie acide aminé du composé d'Amadori ne peut pas être une arginine ou une lysine, trop longue pour être importée. La caractérisation biochimique d'une « Amadori compound Binding Protein » (ABP) chez une souche de *Pseudomonas sp.* isolée du sol, a montré que cette protéine peut fixer plusieurs composés d'Amadori, tels que le fructosyl-aminocaproate et la fructosyl-lysine (Gerhardinger *et al.* 1994). SocA et cette ABP ne font pas partie de la même classe structurale des PBP car leur poids moléculaire est très différent (45 kDa pour ABP *versus* 28 kDa pour SocA). Cependant, ces deux protéines peuvent toutes deux avoir pour fonction le transport non spécifique de plusieurs composés d'Amadori.

Toutes ces observations ouvrent chez *Agrobacterium tumefaciens* une nouvelle voie vers la compréhension du transport et du catabolisme des composés d'Amadori, qui sont des molécules naturellement abondantes. Des tests d'affinité entre SocA et le DFGA mais aussi avec d'autres composés d'Amadori comme la désoxy-fructosyl-glycine et la désoxy-fructosyl-valine valideraient la spécificité et le rôle de SocA chez *Agrobacterium* et également chez les nombreuses bactéries qui possèdent des homologues de SocA comme l'ont montré nos études phylogéniques. Ces homologues sont en effet retrouvés chez des α-protéobactéries, notamment des *Rhizobiaceae*, des β-protéobactéries comme *Burkholderia*, et des γ-protéobactéries, notamment les entérobactéries, ainsi que chez des bactéries à coloration de Gram positive telles que *Micromonospora*, *Arthrobacter* ou *Amycolatopsis*. Les produits de ces orthologues de *socA*, pourraient permettre à ces bactéries de transporter plusieurs types de composés d'Amadori et de se développer dans les nombreux écosystèmes ou ces composés sont présents.

5.2 LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES *MOTABCD* ET *AGTABC*

En plus de son pTi qui contient les gènes de transport MotABCD, *A. tumefaciens* B6 possède un plasmide At qui porte l'opéron *soc*. Les PBP SocA de C58 et SocA de B6 partagent 98% d'identité de séquence, ce qui signifie qu'elles assurent la même fonction de transport de la DFG et probablement d'autres composés d'Amadori. Les souches B6 ont ainsi deux transporteurs capables d'importer la DFG, SocAB et MotABCD. La synthèse de SocAB est régulée par le répresseur transcriptionnel SocR, qui est lui-même inhibé en présence de DFG (Baek *et al.* 2003). En revanche, rien n'a été montré sur la régulation de la transcription des gènes *motABCD*. Ce transporteur pourrait être exprimé de manière constitutive.

Lorsqu'une répression s'exerce sur un opéron, il y a toujours une « fuite de transcription », qui permet de maintenir une quantité basale de protéines. Chez la souche C58, la présence basale de SocAB permet de transporter une petite quantité de DFG se fixant à SocR, levant ainsi la répression et conduisant à l'expression des gènes *socAB*. En revanche, chez la souche B6, si MotABCD est exprimé constitutivement, un transport de DFG en quantité plus importante peut être effectué. La répression de la transcription de *socAB* sera alors levée rapidement, permettant par la suite un transport de DFG en quantités encore plus importantes. Ce système, avantageux pour la bactérie en présence de DFG, serait néanmoins métaboliquement couteux en l'absence de cette molécule.

Il résulte de ce qui précède que l'opéron *motABCD* doit être régulé soit par un répresseur ou un activateur transcriptionnel. MocR et MocS, dont il a été montré qu'ils régulent la transcription des opérons *mocABC* et *mocDE* (Jung *et al.* 1999), sont des candidats potentiels à la répression des gènes *motABCD*. Il n'y a pas encore de candidat connu pour un activateur. Les mesures d'activité *in vivo* d'un gène rapporteur fusionné à *motA* en présence ou non de MocR et/ou MocS, ou dans un contexte génétique dans lequel mocR et/ou mocS seraient eux-mêmes mutés, permettraient de valider l'hypothèse de régulation du transporteur MotABCD.

La régulation de l'opéron *agtABC* et du gène *agcA* n'a pas été étudiée non plus. J'ai montré au cours de mon travail qu'AgtB fixait de l'acide agropinique et non pas de l'agropine comme précédemment décrit (Hong *et al.* 1993; Kim and Farrand 1996). Le transporteur AgtABC assure donc la même fonction d'import de l'acide agropinique que le transporteur AgaABCD. Or le mode de régulation de la transcription de ce dernier a été déterminée (Lyi, Jafri and Winans 1999) : le régulateur transcriptionnel MoaR réprime l'expression d'AgaABCD et est inhibé par l'acide agropinique. Il serait donc envisageable que le transporteur AgtABC soit lui aussi contrôlé par MoaR. Les mesures d'activité *in vivo* d'un gène rapporteur fusionné à *agtA* en présence ou non de MoaR permettraient de valider ou d'infirmer cette hypothèse. Si MoaR ne régule pas cet opéron, MocR et MocS, sont également des candidats à tester.

MoaR partage 38% d'identité de séquence avec le répresseur AccR de la souche C58 et fait partie comme lui de la famille des régulateurs de type DeoR. AccR réprime plusieurs gènes du pTi de C58, notamment les gènes *acc*, permettant l'assimilation des agrocinopines A et B, *nocR*, *arc* et *TraR* permettant le transfert conjugatif du pTi (Lang *et al.* 2013). Il est donc envisageable que MoaR réprime également plusieurs opérons du pTi de la souche B6 codant pour des protéines impliquées dans différentes fonctions. MocR et MocS partagent 59% d'identité de séquence et sont aussi des homologues de SocR avec lequel ils partagent 44% et 38% respectivement. Ces trois répresseurs font partie de la famille des régulateurs de type LacI. Il serait intéressant d'établir une comparaison biochimique et fonctionnelle entre MoaR, MocR, MocS et SocS afin de connaitre les régions d'ADN sur lesquelles ils se fixent, leur spécificité pour une séquence nucléotidique de fixation et leur état d'oligomérisation. Une telle étude permettrait de mieux comprendre leur mode de régulation et de prédire les gènes dont ils répriment la transcription sur le pTi de B6 et les pAt de B6 et C58.

5.3 LA STRUCTURE DE MOAA

La PBP MoaA est décrite comme fixant l'acide mannopinique (Dessaux *et al.* 1988; Lyi, Jafri and Winans 1999). Les études d'affinité par microcalorimétrie et autofluorescence effectuées au cours de ma thèse montrent une fixation spécifique de l'ordre du nanomolaire. Aucune interaction entre MoaA et les autres mannityl-opines n'a été observée. L'acide mannopinique est pourtant structuralement très similaire à la mannopine. En effet, leur seule différence est la chaine latérale de leur partie résidu, qui est un amide chez la mannopine, et un carboxylate chez l'acide mannopinique (glutamine *versus* glutamate). Contrairement à la PBP MotA qui fixe l'une ou l'autre opine sans distinction, MoaA doit présenter une sélectivité pour l'acide mannopinique qui réside dans la structure de son site de liaison et son mode de fixation unique.

Pour caractériser cette spécificité, j'ai exprimé, purifié et cocristallisé MoaA avec l'acide mannopinique. Les cristaux obtenus ont diffracté et m'ont permis d'obtenir plusieurs jeux de données. Malheureusement, la détermination des phases par remplacement moléculaire, en utilisant différents programmes et différents modèles n'a pas fonctionné. Pour l'instant, la cocristallisation du complexe PBP-opine avec du DAP_3-Europium, du platine, du mercure ou de l'or n'a pas donné un signal anomal exploitable pour résoudre les phases par SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction) ou MAD (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction). Les cristaux ont tendance à être multiples, poussant en feuilles superposées pour former une plaque. Une optimisation des conditions de cristallisation sera donc nécessaire pour obtenir des cristaux de meilleurs qualité, et l'utilisation d'autres atomes lourds tels que l'or ou le platine est envisagée.

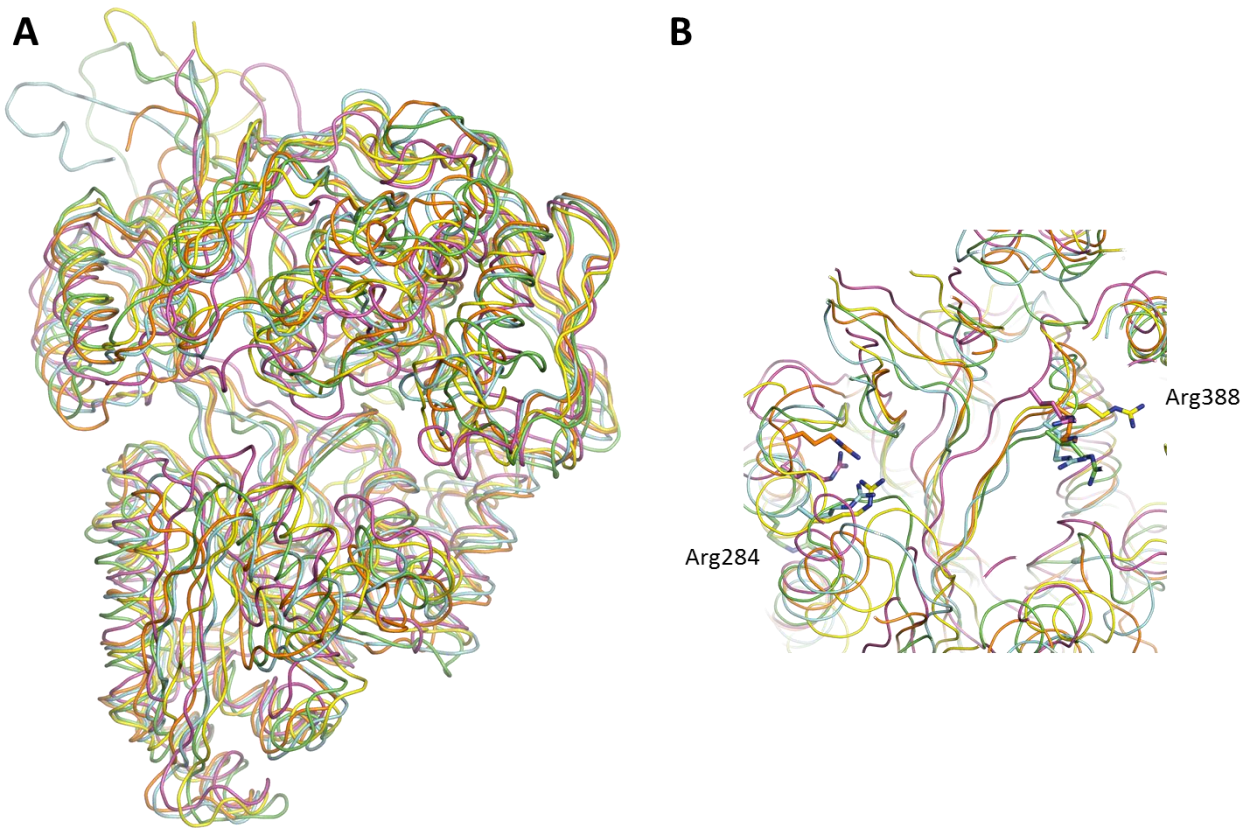


Figure 43 : (A) Superposition des modèles générés par LOMETS (vert), I-tasser (cyan), Robetta (violet), Muster (jaune) et @TOME (orange). (B) Arginines dont la position est récurrente dans le site de fixation des modèles.

Les modèles de MoaA générés par homologie, threading et *ab initio* montrent une structure générale commune (Figure 43A). Cependant, l'organisation des acides aminés au niveau du site de fixation varie d'un modèle à l'autre, malgré certains résidus récurrents (Figure 43B). Parmi eux, les arginines des extrémités de la cavité seraient des candidats potentiels à la fixation de l'acide mannopinique. En effet, la différence de groupements entre la mannopine et l'acide mannopinique implique une différence de charges. A des pH entre 6 et 8,5, où sont obtenus les cristaux, la mannopine possède une seule charge négative, au niveau du carboxylate de la chaine principale de la partie glutamine. Aux mêmes pH, l'acide mannopinique possède deux charges négatives, attribuées au même carboxylate de la chaine principale et au carboxylate de la chaine latérale. Ce dernier carboxylate pourrait établir un pont salin avec le groupement guanidinium d'une arginine, chargé positivement. S'il se trouvait en face d'un groupement guanidinium, l'amide polaire de la mannopine, très électropositif au niveau du NH_2, serait en position moins favorable pour établir des liaisons hydrogènes stables avec une des arginines. Déterminer la structure de MoaA en complexe

avec l'acide mannopinique permettrait de vérifier ces hypothèses, et expliquer la spécificité de cette PBP pour cette mannityl-opine.

5.4 LE TRANSPORTEUR DE L'AGROPINE CHEZ B6

La structure et les affinités d'AgtB m'ont permis de montrer que cette PBP ne fixait pas l'agropine, malgré ce qui a été décrit dans la littérature (Hong *et al.* 1993; Kim and Farrand 1996). En effet, elle interagit spécifiquement avec l'acide agropinique, le produit issu de la lactamisation spontanée des trois autres mannityl-opines. Le système de transport AgaABCD a été décrit plus tard comme assurant aussi cette fonction (Lyi, Jafri and Winans 1999), ce que j'ai confirmé en déterminant la structure du complexe PBP AgaA-acide agropinique et les constantes d'affinité d'AgaA avec les mannityl-opines. L'acide agropinique n'est pas l'opine la plus présente dans une tumeur induite par une souche d'*Agrobacterium* possédant un plasmide Ti de type octopine (Tate *et al.* 1982). Même si une fonction de double transporteur peut lui procurer un avantage sélectif, cet avantage n'est pas pertinent au vue de la production massive d'agropine dans les tumeurs (Tate *et al.* 1982). De plus, il a été montré que l'agropine levait la répression de l'expression des gènes *moc* (Jung *et al.* 1999). Le transport de l'agropine est donc essentiel pour la bactérie.

La souche à octopine *A. tumefaciens* R10 est capable de croître en présence d'agropine comme seule source de carbone, comme le montrent les tests de croissance réalisés au cours de mon travail. Plusieurs possibilités découlent de ce résultat. Tout d'abord, cela peut signifier que l'agropine subit une lactamisation rapide en acide agropinique qui est ensuite transporté par les systèmes AgtABC et AgaABCD. Cependant, une fois dans le cytoplasme, seules les enzymes AgaFG seraient capables de la dégrader. Dans ce dernier cas, la mannopine cyclase AgcA n'aurait pour fonction que de lactoniser la mannopine importée en agropine pour que celle-ci lève la répression de MocR. Ce système parait peu probable dans la mesure où la synthèse d'AgcA est elle-même régulée par MocR.

La deuxième possibilité est que l'agropine est bien importée dans les souches à octopine et qu'il existe un autre moyen de l'internaliser. Elle pourrait être fixée par une autre PBP interagissant avec le même transporteur AgtAC ou un autre système de transport complet pourrait permettre son passage dans le cytoplasme.

Le pTi de la souche B6 possède les gènes codant pour les transporteurs Occ, important l'octopine et ses dérivés, et les transporteurs Aga, Moa, Mot et Agt. Une étude

des gènes en fonction de leur annotation et d'alignements de séquences montre qu'il n'y a pas d'autre transporteur ABC qui serait candidat à l'import de l'agropine sur le pTi. Cette étude pourrait être étendue à l'ensemble du génome d'*A. tumefaciens* B6.

Au cours de ma thèse, j'ai tenté de générer un mutant du transporteur AgtABC par la méthode Campbell (Kalogeraki and Winans 1997). Pour cela j'ai inséré un fragment du gène *agtB* suivi d'une cassette de résistance à la gentamycine dans un vecteur pGEM-T Easy®. J'ai ensuite électrotransformé des agrobactéries compétentes de manière à ce qu'une fois le plasmide internalisé, il y ait un évènement de recombinaison homologue entre *agtB* et le plasmide. Le plasmide serait ainsi entièrement intégré dans le gène *agtB*, ce qui empêcherait la production d'une protéine complète, et bloquerait la transcription du gène *agtC*. Seule la partie NBD AgtA serait complètement traduite. Le test de croissance d'un tel mutant sur agropine comme seule source de carbone permettrait de vérifier si un autre transporteur est responsable de l'internalisation de l'agropine.

Si aucune croissance n'est observée, cela signifierait qu'AgtAC est bien le transporteur de l'agropine. Dans ce cas, une autre PBP serait capable de fixer l'agropine pour l'apporter à AgtAC. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de muter les résidus du site de fixation d'AgtB en alanines, ce qui permettrait une synthèse du transporteur AgtABC complet et sa PBP inactive. Un test de croissance de ce nouveau mutant sur agropine en seule source de carbone permettrait de déterminer s'il existe une autre PBP capable de lier l'agropine et d'interagir avec AgtAC.

Une croissance du mutant de Campbell sur agropine comme seule source de carbone montrerait en revanche la présence d'un autre système de transport pour l'agropine. Il serait alors intéressant de découvrir à quel endroit du génome de la souche B6 il se trouve et de le caractériser génétiquement et biochimiquement. Cette caractérisation serait d'autant plus intéressante que les gènes de dégradation de l'agropine se trouvent sur le plasmide Ti (Hong and Farrand 1994).

5.5 LE LIGAND D'ATTC

AttC est annotée comme mannopine-binding-like protein chez *Agrobacterium tumefaciens* C58. Les mesures d'affinité effectuées entre AttC et la mannopine ne montrent pas d'interaction entre cette PBP et la mannopine. De même, aucune interaction n'a été

observée entre AttC et l'agropine, l'acide agropinique et l'acide mannopinique. AttC ne permet donc pas le transport d'une mannityl-opine chez C58.

Il a été montré qu'un mutant par insertion d'AttC empêchait l'attachement de la bactérie à la plante (Matthysse, Jaeckel and Jeter 2008). Cependant, l'absence de pAt dans les souches pathogènes testées n'a aucun effet sur l'attachement de la plante, ce qui suggère que le mutant par insertion d'AttC inhibe lui-même cet attachement. Ces observations pourrait laisser penser qu'AttC transporte un composé de la plante ayant un rôle indirect dans l'attachement de la bactérie.

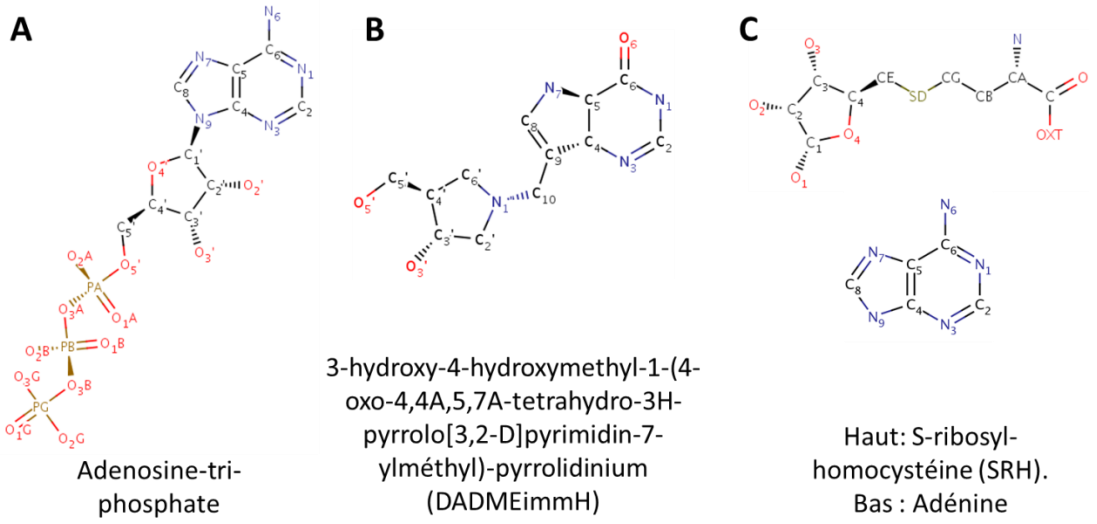


Figure 44 : Ligands potentiels d'AttC, déterminées en fonction des homologies du site de fixation théorique d'AttC avec les sites de fixation de protéines liées à un ligand.

Pour évaluer la nature de ce ligand, j'ai superposé les deux lobes de la structure d'AttC sur ceux de MotA en complexe avec la mannopine pour obtenir un modèle d'AttC en conformation fermée. J'ai ensuite utilisé ce modèle pour déterminer le site de fixation et les ligands potentiel par les serveurs COACH (Yang, Roy and Zhang 2013) et ProBiS (Konc and Janežic 2014) qui utilisent des méthodes de calcul par homologie. ProBiS modélise une adénosine-triphosphate (ATP) (Figure 44A) dans le site de fixation et les ligands avec les meilleurs scores trouvés par COACH sont le 3-hydroxy-4-hydroxymethyl-1-(4-oxo-4,4A,5,7A-tetrahydro-3H-pyrrolo[3,2-D]pyrimidin-7-ylméthyl)-pyrrolidinium (DADMEimmH) (Figure 44B) et l'adénine/S-ribosylhomocystéine (Figure 44C).

Le noyau purine de l'ATP modélisé crée des clashs stériques avec la chaine principale d'AttC. Il ne semble donc pas être le ligand de cette PBP. Le DADMEimmH est

issu de la structure d'une purine nucleoside phosphorylase de *Yersinia pseudotuberculosis* en complexe avec cette molécule (Code PDB : 3OCC). Modélisé dans le site de fixation putatif d'AttC, des encombrements stériques sont également observés à cause de la grande taille du noyau purique. Enfin, l'adénine/S-ribosylhomocystéine provient de la structure d'une 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase de *Helicobacter pylori* (Code PDB : 4OJT). L'ensemble des deux molécules (adénine et S-ribosylhomocystéine (ou SRH)) est également trop volumineux pour entrer dans le site de fixation d'AttC. Cependant, la SRH seule ne crée pas de clashs stériques avec la protéine. De plus, cette molécule comporte de nombreux groupements polaires qui pourraient établir des liaisons hydrogènes et des ponts salins avec les résidus supposés du site de fixation d'AttC.

La SRH est un précurseur de la molécule de *quorum sensing* AI-2 chez de nombreuses bactéries (Bolitho *et al.* 2014). Elle est issue de l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) dont la forme méthylée, la S-adénosylméthionine (SAM), est un précurseur des homosérine-lactones qui induisent le *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* (Lang and Faure 2014). De plus, la SRH semble avoir un rôle dans l'attachement du pathogène Gram positif *Listeria monocytogenes* à la paroi intestinale de certains animaux (Challan Belval *et al.* 2006). Même si cette molécule est le meilleur candidat des trois prédites comme ligand d'AttC, son implication dans l'attachement des agrobactéries pathogènes aux plantes n'est pas prouvé.

L'ATP, le DADMEimmH et l'adénine/SRH possèdent tous trois un cycle à cinq atomes, suggérant que le véritable ligand d'AttC comporte peut-être un cycle à 5 atomes. Pour découvrir ce ligand, un crible par fluorescence sur la chimiothèque de l'ICSN va être effectué. Les hits vont être étudiés et modélisés dans la structure d'AttC pour trouver les candidats les plus probables. L'affinité d'AttC pour ces molécules sera ensuite confirmée par ITC, et une cocristallisation PBP-molécule sera effectuée pour comprendre leur mode d'interaction. Ce travail permettra de déterminer la fonction d'AttC, et de mieux comprendre son rôle dans l'attachement des bactéries. Il ouvrira aussi la voie vers l'étude d'une voie métabolique potentiellement encore inconnue permettant l'attachement d'*A. tumefaciens* aux plantes.

5.6 GÈNES PUTATIFS DE *BURKHOLDERIA SP.* PAMC 26561 RESPONSABLES DU CATABOLISME DE MANNITYL-OPINES

Les analyses phylogénétiques de MotA et AgtB révèlent deux protéines homologues appartenant à *Burkholderia sp.* PAMC 26561 contenant une signature du site de fixation similaire à celles de MotA et AgtB. Ces deux protéines, dont les gènes sont annotés AXG89_20525 et AXG89_20495 par RefSeq, partagent 74 et 73% d'identité de séquence avec MotA et AgtB respectivement. Les deux gènes codant pour ces protéines se trouvent dans la même région du chromosome 2 de *Burkholderia sp.* PAMC 26561, ce qui laisse penser qu'ils sont liés et appartiennent à une voie potentielle de métabolisme des mannityl-opines.

Pour confirmer cette théorie, j'ai effectué des alignements de tous les gènes de cette région du génome de *B. sp.* PAMC 26561 avec les protéines impliquées dans la voie de transport et de catabolisme non spécifique des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* avec BlastX. Les gènes de *B. sp.* PAMC 26561 sont disponibles sur le site https://www.patricbrc.org/portal/portal/patric/Genome?cType=genome&cId=1795043.3. Le résultat de ces alignements est présenté dans la Figure 45.

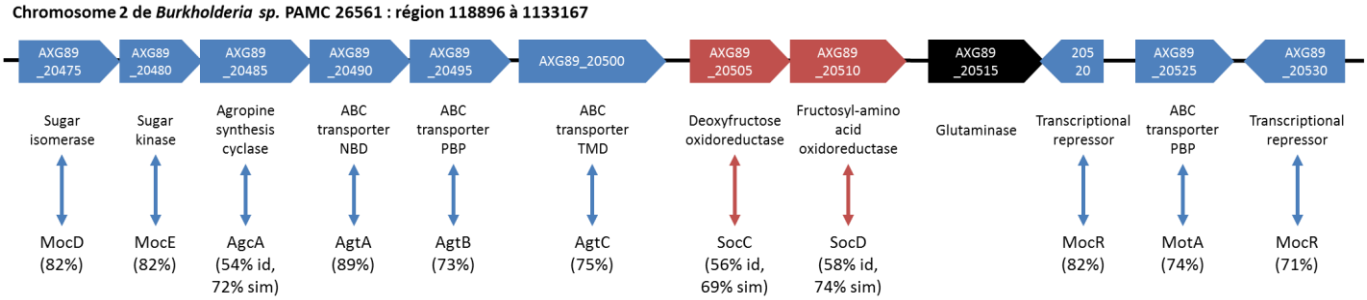


Figure 45 : Région du chromosome 2 de Burkholderia sp. PAMC 26561 contenant les gènes homologues à *motA* et *agtB*. Les gènes sont nommés selon l'annotation RefSeq et la fonction putative de leur produit est indiquée. Les gènes bleus codent pour des homologues des protéines Moc, Mot, Agt et Agc d'*A. tumefaciens* B6, les rouges pour des homologues des protéines Soc d'*A. tumefaciens* C58 et les noirs pour des protéines non homologues aux protéines Mot, Moc, Agt, Agc et Soc. Les pourcentages d'identité et de similarité en cas d'identité inférieure à 70% sont indiqués entre parenthèses.

Les gènes AXG89_20475 et AXG89_20480 codent pour des protéines homologues de MocD et MocE, responsables de la dégradation de la DFG. AXG89_20485 code pour un homologue de la mannopine cyclase AgcA, qui permet théoriquement la lactonolyse de l'agropine en mannopine. Les produits des gènes AXG89_20490, AXG89_20495 et AXG89_20500 sont des homologues du système de transport Agt qui permet le transport de l'acide agropinique. De manière surprenante, le gène AXG89_20505 code pour un

homologue de la désoxyfructose oxydoréductase SocC chez C58, et le gène AXG89_20510 code pour un homologue de la fructosyl-amino acid oxydase (ou Amadoriase) SocD chez C58. Le gène AXG89_20515 code pour une glutaminase dont un homologue n'est codé par aucun gène dans les régions du pTi de B6 et du pAt de C58 étudiées. Le gène putatif AXG89_20520, antisens et sans doute incomplet, code pour une protéine courte de 94 résidus qui partage 82% d'identité de séquence avec le répresseur transcritpionnel MocR. Le produit du gène AXG89_20525 est un homologue de la PBP MotA. Le gène AXG89_20530 antisens code pour un autre répresseur transcriptionnel homologue de MocR.

Les pourcentages d'identité élevés laissent supposer que les fonctions des protéines de *B. sp.* PAMC 26561 sont conservées. Auquel cas, ces gènes permettraient le transport de l'acide agropinique, de la mannopine et de la DFG, et le catabolisme de l'agropine et de la DFG. De manière surprenante, aucun gène ne code pour un homologue de MocC, enzyme essentielle à la conversion de la mannopine en DFG. Or l'agropine serait hydrolysée en mannopine par le produit d'AXG89_20485. En conséquence, soit cette bactérie n'est pas capable d'utiliser la mannopine et l'agropine, soit une autre protéine non homologue de MocC, et/ou située sur une autre région du génome de *B. sp.* PAMC 26561 assure cette fonction. La région étudiée comporte un gène codant une PBP homologue de MotA mais ne comporte pas d'opéron d'ABC transporteur associé.

Deux couples de protéines assurent la dégradation de la DFG chez *A. tumefaciens*, MocDE et SocCD. Les gènes codant pour des homologues de ces quatre protéines sont trouvés sur la même région génique chez *B. sp.* PAMC 26561. Si les gènes homologues des gènes *soc* permettent la dégradation de plusieurs composés d'Amadori, ces deux couples permettraient l'utilisation d'une large gamme de molécules abondantes dans la nature, ce qui confèrerait à *B. sp.* PAMC 26561 la capacité de croitre dans plusieurs environnements.

Les alignements de séquences des gènes de *B. sp.* PAMC 26561 contre la banque des séquences protéiques non redondantes (nr) avec BlastX ont révélé des identités de séquences importantes avec des protéines codées par les gènes de catabolisme et de transport de la chrysopine sur le pTi de la souche Chry5 (Tableau 6). Les protéines de *B. sp.* PAMC 26561 pourraient donc transporter et cataboliser la chrysopine et la DFG. La délactonisation de la chrysopine par AXG89_20485 aboutirait directement à de la DFG, qui

pourrait alors être dégradée par les deux couples de protéines hydrolysant la DFG. Dans ce cas, comme la mannopine ne serait pas un intermédiaire pour la dégradation d'une opine, un homologue assurant la même fonction que MocC ne serait pas nécessaire, et expliquerait l'absence d'un tel homologue dans cette région du génome.

Table 6 : Identité de séquence entre les produits des gènes de B. sp. PAMC 26561 et les protéines codées par la région du pTiChry5 impliquée dans le métabolisme de la chrysopine

Gène de *B. sp.* PAMC 26561	AXG89 _20475	AXG89 _20480	AXG89 _20485	AXG89 _20490	AXG89 _20495	AXG89 _20530
Protéine du pTiChry5	ChcD	ChcE	ChcA	ChtG	ChtH	ChcR
Identité de séquence (%)	82	87	83	81	60	74

Ces analyses portent à croire que *B. sp.* PAMC 26561 est capable d'assimiler certaines mannityl-opines ou des opines de la famille de la chrysopine. Les bactéries du genre *Burkholderia* sont des β-protéobactéries ubiquitaires. Certaines espèces peuvent être pathogènes pour les animaux, y compris l'homme, et d'autres peuvent infecter les plantes (Compant *et al.* 2008). Peu d'informations sont disponibles sur la souche PAMC 26561, sinon qu'elle a été recensée par la Polar and Alpine Microbial Collection, qui prélève des souches microbiennes d'environnements froids comme les toundras, le permafrost, les glaciers ou la banquise des pôles (Lee *et al.* 2012). Ces environnements sont peu favorables à la présence d'agrobactéries, dont les souches pathogènes induisent la production d'opines par les plantes infectées. Si la région du génome de *B. sp.* PAMC 26561 étudiée est effectivement spécialisée dans l'import et le catabolisme d'opines, alors cette bactérie pourrait croitre dans des tumeurs générées par *A. tumefaciens*. Elle ne serait d'ailleurs pas la seule souche de *Burkholderia* possédant une région génomique de ce type, comme le montrent l'analyse protéomique de la souche *B. xenovorans* LB400 et le séquençage du génome la souche *B. sp.* PAMC 28687 (Patrauchan *et al.* 2011; Han *et al.* 2016). Pourtant, ni ces deux souches, ni *B. sp.* PAMC 26561 n'ont été trouvées dans des tumeurs de plante induites par *A. tumefaciens* jusqu'à maintenant. De plus, une analyse des bactéries dans la rhizosphère de plants de *Lotus cornicolatus* modifiés pour produire de la nopaline et de la

mannopine ne révèle pas de β-protéobactérie (dont font partie les *Burkholderiales*) capable d'utiliser l'une ou l'autre de ces opines (Oger *et al.* 2004).

Il serait alors intéressant d'étudier la flore microbienne présente dans les galles induites par des souches d'agrobactérie possédant des pTi de type octopine, agropine et chrysopine afin de vérifier la présence ou l'absence de souches de *Burkholderia* possédant une région de catabolisme d'opines. L'analyse de la rhizosphère de plantes transgéniques capable de produire d'autres opines, comme l'agropine ou la chrysopine pourrait également être envisagée. De manière plus directe, observer la croissance de *B. sp.* PAMC 26561 avec chaque mannityl-opine et chaque opine de la famille de la chrysopine comme seule source de carbone permettrait de déterminer quelle(s) opine(s) cette bactérie peut utiliser. Il serait également intéressant d'étudier son génome plus en détail pour savoir s'il contient d'autres régions de métabolisme d'opine. Plusieurs autres bactéries pouvant assimiler et utiliser les opines produites par les plantes transformées ont été découvertes (Nautiyal, Dion and Chilton 1991; Mansouri *et al.* 2002; Oger *et al.* 2004). L'étude de ces capacités chez de nouvelles bactéries permettrait de mieux appréhender le microcosme que forme une tumeur de plante générée par *Agrobacterium*, et d'aboutir à une meilleure compréhension des liens de parenté entre les bactéries capables d'utiliser les opines.

L'ensemble de ces résultats a abordé l'aspect biochimique et structural du transport des mannityl-opines chez *A. tumefaciens*. Cette approche moléculaire a permis de revisiter les études génétiques effectuées il y a quelques années, et soulève actuellement de nouvelles questions sur le métabolisme de ces opines, aussi bien chez *A. tumefaciens* que chez d'autres bactéries apparemment capables de les transporter et de les cataboliser.

Au-delà de cet aspect, mes travaux démontrent tout l'intérêt de mener des études allant du niveau moléculaire au niveau écologique. De telles études peuvent mener à la précision de processus encore mal compris, à la validation de principes postulés ou à l'émergence de nouveaux concepts dans les interactions entre organismes ou entre organismes et milieu.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Arruda P, Kemper EL, Papes F *et al.* Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends Plant Sci* 2000;**5**:324–30.

Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2006;**9**:207–17.

Baek C-H, Farrand SK, Lee K-E *et al.* Convergent evolution of Amadori opine catabolic systems in plasmids of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* 2003;**185**:513–24.

Baek CH, Farrand SK, Park DK *et al.* Genes for utilization of deoxyfructosyl glutamine (DFG), an amadori compound, are widely dispersed in the family Rhizobiaceae. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;**53**:221–33.

Ballas N, Citovsky V. Nuclear localization signal binding protein from Arabidopsis mediates nuclear import of Agrobacterium VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:10723–8.

Bermejo GA, Strub M-P, Ho C *et al.* Ligand-free open-closed transitions of periplasmic binding proteins: the case of glutamine-binding protein. *Biochemistry* 2010;**49**:1893–902.

Berntsson RP a, Smits SHJ, Schmitt L *et al.* A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* 2010;**584**:2606–17.

Biasini M, Bienert S, Waterhouse A *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:W252-8.

Biemann K, Lioret C, Asselineau J *et al.* On the structure of lysopine, a new amino acid isolated from crown gall tissue. *Biochim Biophys Acta* 1960;**40**:369–70.

Bierne H, Cossart P. When bacteria target the nucleus: The emerging family of nucleomodulins. *Cell Microbiol* 2012;**14**:622–33.

Blanc E, Roversi P, Vonrhein C *et al.* Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;**60**:2210–21.

Bolitho ME, Corcoran BJ, Showell-Rouse EI *et al. Revisiting Synthetic Preparation of the Quorum Sensing Substrate S-D-Ribosyl-L-Homocysteine (SRH)*., 2014.

Brencic A, Winans SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;**69**:155–94.

Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B *et al.* T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep* 2002;**3**:1152–7.

Cangelosi GA, Hung L, Puvanesarajah V *et al.* Common loci for Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium meliloti exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J Bacteriol* 1987;**169**:2086–91.

Carlier A, Chevrot R, Dessaux Y *et al.* The assimilation of gamma-butyrolactone in Agrobacterium tumefaciens C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant Microbe Interact* 2004;**17**:951–7.

Challan Belval S, Gal L, Margiewes S *et al.* Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by Listeria monocytogenes EGD-e. *Appl Environ Microbiol* 2006;**72**:2644–50.

Chang C, Chen C, Adamst BR *et al.* Leucinopine , a characteristic compound of some crown-gall tumors. *Tetrahedron* 1983;**80**:3573–6.

Chen K, Dorlhac de Borne F, Szegedi E *et al.* Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J* 2014;**80**:669–82.

Chen L, Chen Y, Wood DW *et al.* A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* 2002;**184**:4838–45.

Chilton M-DM, Que Q. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol* 2003;**133**:956–65.

Chilton WS, Stomp A-M, Beringue V *et al.* The chrysopine family of amadori-type crown gall opines. *Phytochemistry* 1995;**40**:619–28.

Chilton WS, Tempé J, Matzke M *et al.* Succinamopine: a new crown gall opine. *J Bacteriol* 1984;**157**:357–62.

Christie PJ, Cascales E. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* 2005;**22**:51–61.

De Cleene M, De Ley J. The host range of crown gall. *Bot Rev* 1976;**42**:389–466.

Compant S, Nowak J, Coenye T *et al.* Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 2008;**32**:607–26.

Costechareyre D, Rhouma A, Lavire C *et al.* Rapid and Efficient Identification of

Agrobacterium Species by recA Allele Analysis. *Microb Ecol* 2010;**60**:862–72.

Coxon DT, Davies AMC, Fenwick GR *et al.* Agropine, a new amino acid derivative present in crown gall tumor tissue. 1980.

Davidson AL, Dassa E, Orelle C *et al.* Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;**72**:317–64, table of contents.

Davioud E, Petit A, Tate ME *et al.* Cucumopine—a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry* 1988;**27**:2429–33.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res* 2001;**11**:1156–66.

Depicker A, Stachel S, Dhaese P *et al.* Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1982;**1**:561–73.

Deppe VM, Bongaerts J, O'Connell T *et al.* Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: Mechanisms, occurrence and physiological functions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;**90**:399–406.

Dessaux Y, Guyon P, Petit a. *et al.* Opine utilization by Agrobacterium spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation. *J Bacteriol* 1988;**170**:2939–46.

Dessaux Y, Petit A, Farrand SK *et al.* Opines and opine-like molecules involved in plant-Rhizobiaceae interactions. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.). *The Rhizobiaceae*. 1998, 173–97.

Dessaux Y, Petit A, Tempe J. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry* 1993;**34**:31–8.

Dessaux Y, Tempé J, Farrand SK. Genetic analysis of mannityl opine catabolism in octopine-type Agrobacterium tumefaciens strain 15955. *MGG Mol Gen Genet* 1987;**208**:301–8.

Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H *et al.* Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 2007;**318**:453–6.

Duarte RTD, Staats CC, Fungaro MHP *et al.* Development of a simple and rapid Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae var. acridum. *Lett Appl Microbiol* 2007;**44**:248–54.

Efetova M, Zeier J, Riederer M *et al.* A central role of abscisic acid in drought stress protection of Agrobacterium-induced tumors on Arabidopsis. *Plant Physiol* 2007;**145**:853–62.

Ellis JG, Murphy PJ. Four new opines from crown gall tumours - their detection and properties. 1981.

Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;**60**:2126–32.

Firmin JL, Fenwick GR. chem_agropine-charact_firmin1978.pdf. 1978:842–4.

Flores-Mireles AL, Eberhard A, Winans SC. Agrobacterium tumefaciens can obtain sulphur from an opine that is synthesized by octopine synthase using S-methylmethionine as a substrate. *Mol Microbiol* 2012;**84**:845–56.

Fukami-Kobayashi K, Tateno Y, Nishikawa K. Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *J Mol Biol* 1999;**286**:279–90.

Fushiya S, Matsuda M, Yamada S *et al.* New opine type amino acids from a poisonous mushroom, Clitocybe acromelalga. *Tetrahedron* 1996;**52**:877–86.

Gelvin SB. Agrobacterium VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol* 1998;**180**:4300–2.

Gelvin SB. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;**67**:16–37, table of contents.

Gerhardinger C, Taneda S, Marion MS *et al.* Isolation, purification, and characterization of an Amadori product binding protein from a Pseudomonas sp. soil strain. *J Biol Chem* 1994;**269**:27297–302.

Goldman A, Thomas DW, Morel G. *Sur La Structure de La Nopaline, Metabolite Anormale de Certaines Tumeurs de Crown Gall.* Paris, 1969.

Goodner B, Hinkle G, Gattung S *et al.* Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent Agrobacterium tumefaciens C58. *Science* 2001;**294**:2323–8.

Guyon P, Petit A, Tempé J *et al.* Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading Agrobacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993;**6**:92–8.

Hack E, Kemp JD. Comparison of octopine, histopine, lysopine and octopinic acid synthesizing activities in sunflower Crown Gall Tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;**78**:785–91.

Hack E, Kemp JD. Purification and Characterization of the Crown Gall-specific Enzyme, Octopine Synthase. *Plant Physiol* 1980;**65**:949–55.

Hall LM, Schrimsher JL, Taylor KB. A New Opine Derived from. *J Biol Chem* 1983;**258**:7276–9.

Han S-R, Yu S-C, Ahn D-H *et al. Complete Genome Sequence of Burkholderia Sp. Strain*

PAMC28687, a Potential Octopine-Utilizing Bacterium Isolated from Antarctica Lichen., 2016.

Harcet M, Perina D, Pleše B. Opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Biochem Genet* 2013;**51**:666–76.

Hiei Y, Ishida Y, Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Front Plant Sci* 2014;**5**:628.

Higgins CF. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *http://dx.doi.org/101146/annurev.cb08110192000435* 2003.

Hirokawa K, Kajiyama N. Recombinant Agrobacterium AgaE-like Protein with Fructosyl Amino Acid Oxidase Activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;**66**:2323–9.

Holland IB, A. Blight M. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 1999;**293**:381–99.

Hong SB, Dessaux Y, Chilton WS *et al.* Organization and regulation of the mannopine cyclase-associated opine catabolism genes in Agrobacterium tumefaciens 15955. *J Bacteriol* 1993;**175**:401–10.

Hong SB, Farrand SK. Functional role of the Ti plasmid-encoded catabolic mannopine cyclase in mannityl opine catabolism by Agrobacterium spp. *J Bacteriol* 1994;**176**:3576–83.

Hong SB, Hwang I, Dessaux Y *et al.* A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by Agrobacterium strains. *J Bacteriol* 1997;**179**:4831–40.

Howard EA, Zupan JR, Citovsky V *et al.* The VirD2 protein of A. tumefaciens contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: Implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 1992;**68**:109–18.

Hung L-W, Wang IX, Nikaido K *et al.* Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998;**396**:703–7.

Isogai A, Fukuchi N, Hayashi M *et al.* Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced byAgrobacterium rhizogenes. *Phytochemistry* 1990;**29**:3131–4.

Jung W-H, Baek C-H, Lee JK *et al.* Analysis of trans-acting elements for regulation of moc operons of pTi15955 in Agrobacterium tumefaciens. *J Microbiol Biotechnol* 1999:637–45.

Kalogeraki VS, Winans SC. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can

simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* 1997;**188**:69–75.

Karpowich NK, Huang HH, Smith PC *et al.* Crystal Structures of the BtuF Periplasmic-binding Protein for Vitamin B12 Suggest a Functionally Important Reduction in Protein Mobility upon Ligand Binding. *J Biol Chem* 2003;**278**:8429–34.

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015;**10**:845–58.

Kemp JD. A new amino acid derivative present in crown gall tumor tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;**74**:862–8.

Kersters K, De Ley J. Genus III Agrobacterium Conn 1942. In: Krieg NR, Holt JG (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984, 244–54.

Kim H, Farrand SK. 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* 1997;**179**:7559–72.

Kim KS, Chilton WS, Farrand SK. A Ti plasmid-encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region-encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors. *J Bacteriol* 1996;**178**:3285–92.

Kim KS, Farrand SK. Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by Agrobacterium tumefaciens are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. *J Bacteriol* 1996;**178**:3275–84.

Konc J, Janežic D. ProBiS-ligands: a web server for prediction of ligands by examination of protein binding sites. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**, DOI: 10.1093/nar/gku460.

Krissenel E, Hendrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;**60**:2256–68.

Lang J, Faure D. Functions and regulation of quorum-sensing in Agrobacterium tumefaciens. *Front Plant Sci* 2014;**5**:14.

Lang J, Planamente S, Mondy S *et al.* Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the agrobacterium tumefaciens-induced plant tumour. *Mol Microbiol* 2013;**90**:1178–89.

Lang J, Vigouroux A, Planamente S *et al.* Agrobacterium uses a unique ligand-binding mode for trapping opines and acquiring a competitive advantage in the niche construction on plant host. *PLoS Pathog* 2014;**10**:e1004444.

Lassalle F, Campillo T, Vial L *et al.* Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in Agrobacterium tumefaciens. *Genome Biol Evol* 2011;**3**:762–81.

Lee YM, Kim G, Jung Y-J *et al.* Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC): a culture collection dedicated to polar and alpine microorganisms. *Polar Biol* 2012;**35**:1433–8.

Li Y, Rosso MG, Ülker B *et al.* Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in Arabidopsis thaliana reveals special features of genes without insertions. *Genomics* 2006;**87**:645–52.

Lin Z, Zheng J. Occurrence, characteristics, and applications of fructosyl amine oxidases (amadoriases). *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;**86**:1613–9.

von Lintig J, Zanker H, Schröder J. Positive regulators of opine-inducible promoters in the nopaline and octopine catabolism regions of Ti plasmids. *Mol Plant Microbe Interact* 1991;**4**:370–8.

Lyi SM, Jafri S, Winans SC. Mannopinic acid and agropinic acid catabolism region of the octopine-type Ti plasmid pTi15955. *Mol Microbiol* 1999;**31**:339–47.

Mansouri H, Petit A, Oger P *et al.* Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:2562–6.

Matthysse AG. Attachment of Agrobacterium to plant surfaces. *Front Plant Sci* 2014;**5**:252.

Matthysse AG, Jaeckel P, Jeter C. attG and attC mutations of Agrobacterium tumefaciens are dominant negative mutations that block attachment and virulence. *Can J Microbiol* 2008;**54**:241–7.

Matthysse AG, Yarnall H, Boles SB *et al.* A region of the Agrobacterium tumefaciens chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 2000;**1490**:208–12.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;**40**:658–74.

Ménagé A, Morel G. *[ON THE PRESENCE OF OCTINE IN CROWN-GALL].*, 1964.

Ménagé A, Morel G. *Sur La Presence D'un Acide Amine Nouveau Dans Les Tissus de Crown-Gall.* Paris, 1965.

Morizawa K. The extractive substances in Octopus octopodia. *Acta Sch Med Univ Imp Kyoto* 1927;**9**:285–98.

Morton ER, Merritt PM, Bever JD *et al.* Large deletions in the pAtC58 megaplasmid of Agrobacterium tumefaciens can confer reduced carriage cost and increased

expression of virulence genes. *Genome Biol Evol* 2013;**5**:1353–64.

Mougel C, Thioulouse J, Perrière G *et al.* A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;**52**:573–86.

Nair GR, Liu Z, Binns AN. Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of Agrobacterium tumefaciens strain C58. *Plant Physiol* 2003;**133**:989–99.

Nautiyal CS, Dion P, Chilton WS. Mannopine and mannopinic acid as substrates for Arthrobacter sp. strain MBA209 and Pseudomonas putida NA513. *J Bacteriol* 1991;**173**:2833–41.

Nester EW. Agrobacterium: the natural genetic engineer 100 years later. *APS net/features* 2008, DOI: 10.1094/APSnetFeatures-2008-0608.

Oger P, Kim K-S, Sackett RL *et al.* Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of traR, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol Microbiol* 1998;**27**:277–88.

Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nat Biotechnol* 1997;**15**:369–72.

Oger PM, Mansouri H, Nesme X *et al.* 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* 2004;**47**:96–103.

Oh BH, Pandit J, Kang CH *et al.* Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 1993;**268**:11348–55.

Oldham ML, Davidson AL, Chen J. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 2008;**18**:726–33.

Otten L, Burr T, Szegedi E. *Agrobacterium: A Disease-Causing Bacterium*., 2008.

Patrauchan MA, Jacob Parnell J, McLeod MP *et al.* Genomic analysis of the phenylacetyl-CoA pathway in Burkholderia xenovorans LB400. *Arch Microbiol* 2011;**193**:641–50.

Petit A, David C, Dahl G a. *et al.* Further extension of the opine concept: Plasmids in Agrobacterium rhizogenes cooperate for opine degradation. *MGG Mol Gen Genet* 1983;**190**:204–14.

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

Planamente S, Mondy S, Hommais F *et al.* Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* 2012;**86**:1085–99.

Planamente S, Vigouroux A, Mondy S *et al.* 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* 2010;**285**:30294–303.

Platt TG, Morton ER, Barton IS *et al.* Ecological dynamics and complex interactions of Agrobacterium megaplasmids. *Front Plant Sci* 2014;**5**:635.

Pons J-L, Labesse G. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res* 2009;**37**:W485-91.

Popoff MY, Kersters K, Kiredjian M *et al.* [Taxonomic position of Agrobacterium strains of hospital origin]. *Ann Microbiol (Paris)* 1970;**135A**:427–42.

Quentin Y, Fichant G, Denizot F. Inventory, assembly and analysis of Bacillus subtilis ABC transport systems. *J Mol Biol* 1999;**287**:467–84.

Quiocho FA, Ledvina PS. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: Variation of common themes. *Mol Microbiol* 1996;**20**:17–25.

Quiocho FA, Phillips GN, Parsons RG *et al.* Crystallographic data of an l-arabinose-binding protein from Escherichia coli. *J Mol Biol* 1974;**86**:491–3.

El Sahili A, Li S-Z, Lang J *et al.* A Pyranose-2-Phosphate Motif Is Responsible for Both Antibiotic Import and Quorum-Sensing Regulation in Agrobacterium tumefaciens. Ma W (ed.). *PLOS Pathog* 2015;**11**:e1005071.

Sakaguchi A, Ferri S, Sode K. SocA is a novel periplasmic binding protein for fructosyl amino acid. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**336**:1074–80.

Sanchez-Fernandez R, Davies TGE, Coleman JOD *et al.* The Arabidopsis thaliana ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *J Biol Chem* 2001;**276**:30231–44.

Savka MA, Farrand SK. Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nat Biotechnol* 1997;**15**:363–8.

Schardl CL, Kado CI. A functional map of the nopaline catabolism genes on the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens C58. *Mol Gen Genet* 1983;**191**:10–6.

Schell J, Van Montagu M, De Beuckeleer M *et al.* Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci* 1979;**204**:251–66.

Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 1998;**22**:1–20.

Schrammeijer B, Risseeuw E, Pansegrau W *et al. Interaction of the Virulence Protein VirF of Agrobacterium Tumefaciens with Plant Homologs of the Yeast Skp1 Protein*., 2001.

Shilton BH. The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1778**:1772–80.

Stamp AL, Owen P, El Omari K *et al.* Crystallographic and microcalorimetric analyses reveal the structural basis for high arginine specificity in the Salmonella enterica serovar Typhimurium periplasmic binding protein STM4351. *Proteins* 2011;**79**:2352–7.

Sutcliffe IC, Russell RR. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 1995;**177**:1123–8.

Szabados L, Kovács I, Oberschall A *et al.* Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* 2002;**32**:233–42.

Tate ME, Ellis JG, Kerr A *et al.* Agropine: a revised structure. *Carbohydr Res* 1982;**104**:105–20.

Tempé J. *Les Transferts de Gènes Chez Les Plantes.* Paris, 1987.

Tempé J, Petit A. La piste des opines. In: Pühler A (ed.). *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction.* 1983, 14–32.

Tinland B, Hohn B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of Agrobacterium tumefaciens T-DNA into the plant genome. *Genet Eng (N Y)* 1995;**17**:209–29.

Ullrich CI, Aloni R. Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot* 2000;**51**:1951–60.

Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;**66**:22–5.

Vergunst AC, van Lier MCM, den Dulk-Ras A *et al.* Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of Agrobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:832–7.

Veselov D, Langhans M, Hartung W *et al.* 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* 2003;**216**:512–22.

Vladimirov I a., Matveeva T V., Lutova L a. Opine biosynthesis and catabolism genes of Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes. *Russ J Genet* 2015;**51**:121–9.

Wächter R, Langhans M, Aloni R *et al.* Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Physiol* 2003;**133**:1024–37.

Wang L, Helmann JD, Winans SC. The A. tumefaciens transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell* 1992;**69**:659–67.

Wetzel ME, Kim K-S, Miller M *et al.* Quorum-dependent mannopine-inducible conjugative transfer of an Agrobacterium opine-catabolic plasmid. *J Bacteriol* 2014;**196**:1031–44.

Wilson M, Savka MA, Hwang I *et al.* Altered Epiphytic Colonization of Mannityl Opine-Producing Transgenic Tobacco Plants by a Mannityl Opine-Catabolizing Strain of Pseudomonas syringae. *Appl Environ Microbiol* 1995;**61**:2151–8.

Wood DW, Setubal JC, Kaul R *et al.* The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58. *Science* 2001;**294**:2317–23.

Wu S, Zhang Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:3375–82.

Wu S, Zhang Y. MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information. *Proteins* 2008;**72**:547–56.

Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. 2013;**29**:2588–95.

Yaylayan V a, Huyghues-Despointes A. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1994:37–41.

Young JM. Agrobacterium—Taxonomy of Plant-Pathogenic Rhizobium Species. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. New York, NY: Springer New York, 2008, 183–220.

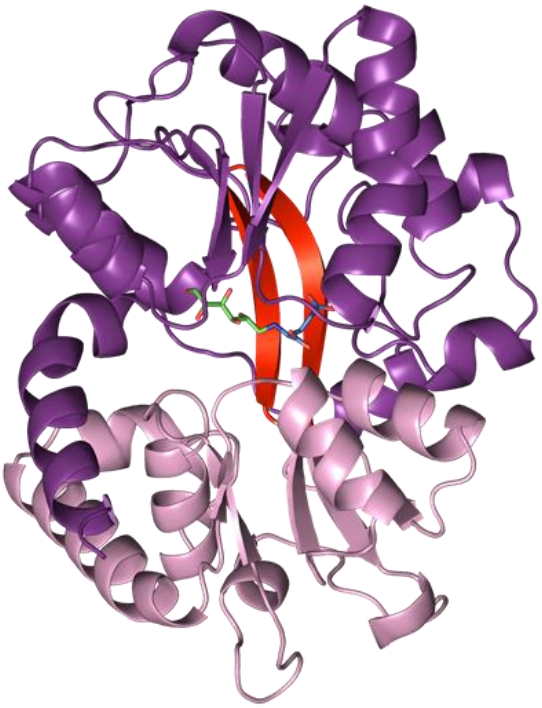
Yu J, Ge J, Heuveling J *et al.* Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:5243–8.

Zambryski P, Tempe J, Schell J. Transfer and function of T-DNA genes from Agrobacterium Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 1989;**56**:193–201.

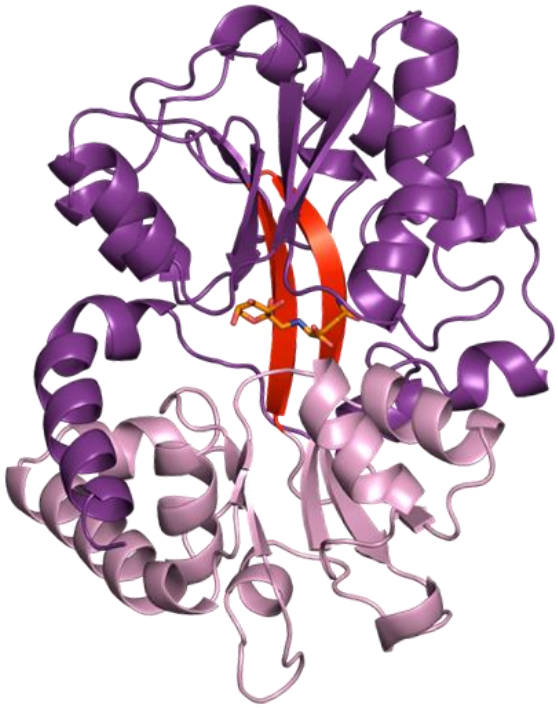
Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008;**9**:40.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B *et al.* The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *J Bacteriol* 2000;**182**:3885–95.

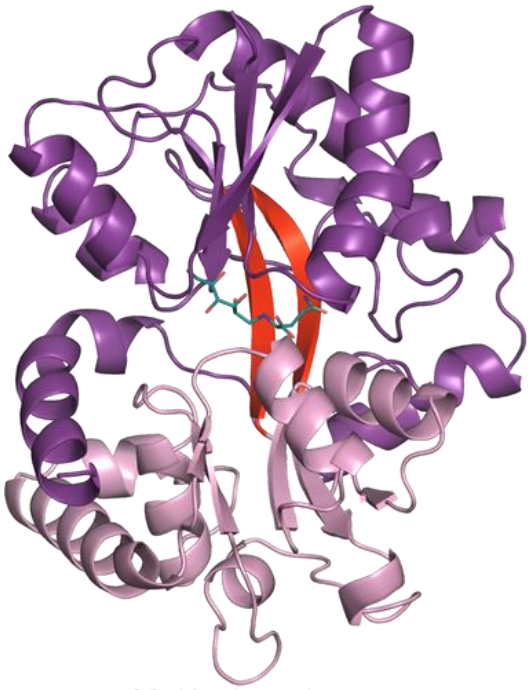
ANNEXE 1 : STRUCTURES OBTENUES



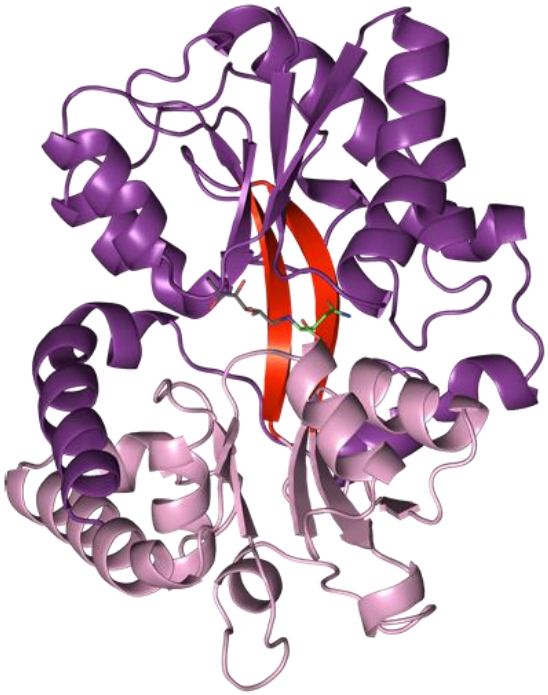
MotA-mannopine



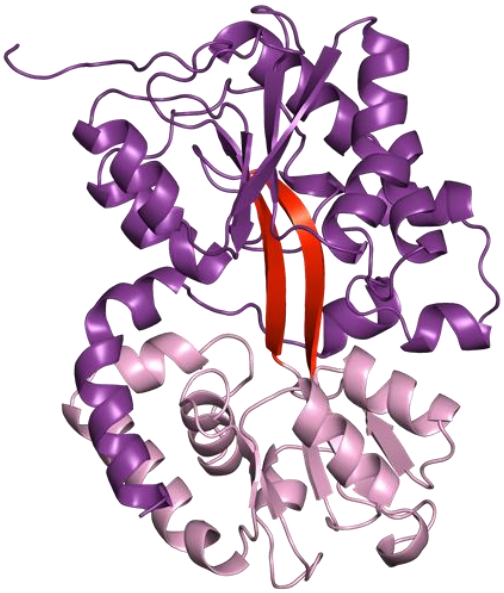
MotA-DFG



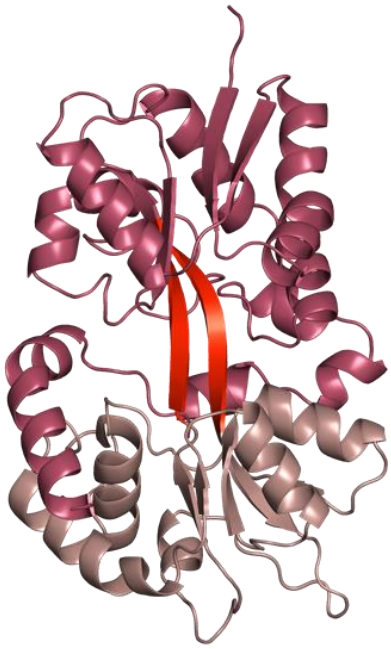
MotA-glucopine



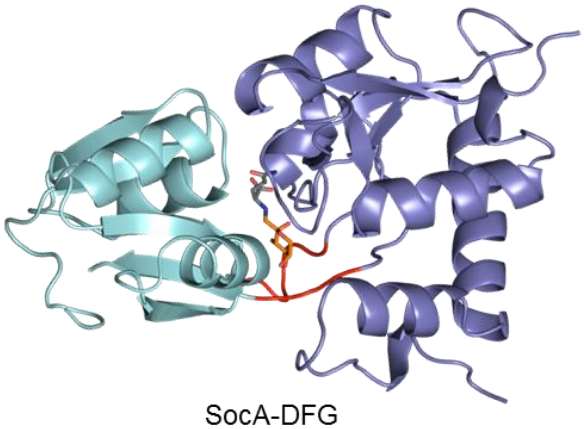
MotA-acide mannopinique



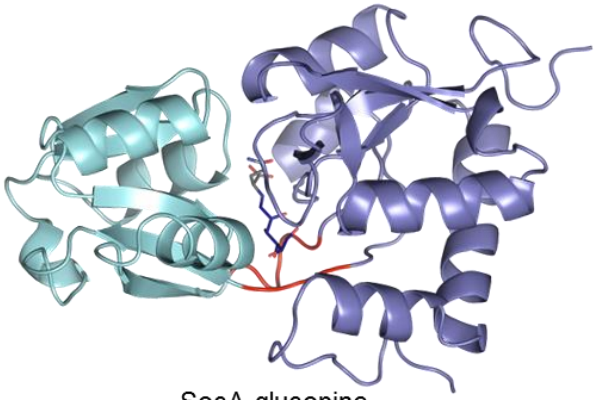
MotA



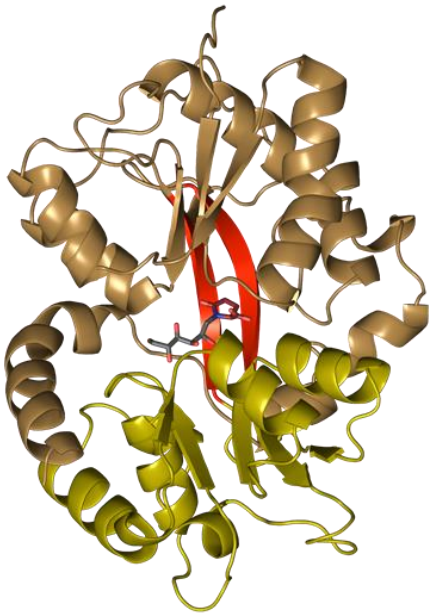
AttC



SocA-DFG



SocA-glucopine



AgtB-acide agropinique

AgaA-acide agropinique

ANNEXE 2 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCES

```
          1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
MotA      MKMRQL-KM-IQIA--AAVS-AVLIAGQVSVAYAAD-VYIASSGGGWQEAQDKALWAPAAKALNITYTQDTFQNW---AEARAQVESGSVTWDIIQIGI
AgtB      MKSNPFFKR-ISTALLAATG-VIMLSG---VASAAD-LVISSYGGSFQDAQTKAYFDPYAKASGVKVTGTTGTGY---AKVKAMVESGNVTWDVISAES
Atu4243   MRSKLV----LSTC--AA---LFALGA---AAQAND-LVFSSWGGTTQDAQKAAWAEKFMVETGINVLQDGPTDY---GKLKAMVEANGVTWDVVDVEG
AttC      MIRSDQTPKACLKSAFYVFVAFALMFALGLEKASAEQRVVIATTGGTYEKALREAWFEPFTKATGIKVVTVSGTDAEKRAKVTAMVQTGNVTWDLYLDGE

          101      110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
MotA      ADEPQAKAAGVLEKL-DP--DIVNKADFPPGSVTDSFVANSNYSTLIAWNKKTYGDNGPKSMADFFDVKKFPGKRALWN-Q-PIGMIEAAALALGTPRDK
AgtB      PAFASEVKDGLLEPI-DY--SVVKADNVPENFRTKYGVGYMVFGTNLAWNKDKF-PNGVTP-AQFFDP-NVKGRRVLPS-D-ATYSLEFALMGDGVKPAD
Atu4243   DYAAQAGPKGLLEKL-DF--SVIDKTKLDPRFVTDYSVGSFYYSFVIGCNVDSV-SACPKSWADLFDTAKFPGKRTFYKWS-APGVIEAALLADGVTADK
AttC      IQAGSDAHFAITEDLSDFCMQFINSTDLLADSCTRGGAKLQSTSTLLAYKLNENGSN-PQTWADMWDLAKFPGARSFPNFDDPWRVLAAALLADGVPREK

          201      210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
MotA      VYEFLSTEEGRKAAIAKLTELAPSVSVWWESGAQAAQLIKDGEVDMIITWGGRVQGAINDGANFAYTFNDAQLGTDGYAIVKGAPHRDAAMRFLKE-MSK
AgtB      LYP-LDVKR----ALKVIDRVKDQV-IGYKGASDIQALMQQGEADIVYAGTGRIKNAIKAGANWSYSWEGALADTEYWAVPKGAPHAAEAMKFINF-AVQ
Atu4243   LYP-LDLDR----AFKKLDTIKSDI-IWWSGGAQSQQLIASAEAPFGSVWNGRMTALEQSGVKVETSWAQNITAADSLVVPKGTKNKDAAMKFIAL-ATS
AttC      LFP-LDVDR----AFRKLDELRDSVQVWWRTGDQSVQAFRNDEYRVGQIWLTRAKALKAEGYKIGWSYDGAFLVGDRIALVRGAPNRENALKLIEFWLRN

          301      310       320       330       340       350       360       371
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
MotA      AEYQKDLPNSFATAPANMKAYDLAKYTPEKMATMASAPENVAVQYSVDPNFW-AKHAKWASEAYDNVRLSR
AgtB      AEPQAELTRVIAYGPTNVDALRLLD--PAVAKDLPSYPANAKLGAVLNSKWW-NDNYDAVKAEWTTYIMQ
Atu4243   AQAQADMATATGYAPVNIESAKLMD--PKIAKSLPDQQTESQVNADMN--YW-AQHRDEIGERWYAWQAK
AttC      PAAQAKACETLSCTPPSQKAISQMS--SEARATLPSA-ADVENRIIVPDAQWINANMGMLVQRWNSWIR
```

Alignement des séquences de MotA, AgtB, Atu4243 et AttC (cluster structural D).

```
          1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
AgaA      MK-RIL--QMALVAGL--TGLTTTS-ALAGGT-LYFGLSGEP-STLDTVVQPGTSGRTVKLAIHRGLVNYGI-DGKISP-----ELAESYEVSPDAKEFT
MoaA      MRHRAYWTSAAIVAGVLSTAVSIPSQAFAAKTELSMGVASEDVTTLDPHFATTTSDRTLVSYIYGALVRFA--PGSANPSSIEADLAESWESNADQLVWT
DppA      MR-ISLKKSGMLKLGLSLVAMTVAA-SVQAKT-LVYCSEGSPEGFNPQLFTSGTTYDASSVPLYNRLVEFKIGTTEVIP-----GLAEKWEVSEDGKTYT

          101      110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
AgaA      FHLR-QAKFHDG-----T-TVTSADVKASLER---ILDPKGKAS------FRN-ELSS-ISKIETPDEKTVKLTLSTPSVAMIDYLA-LPESVIVP--AA
MoaA      FKLRPDVKWQGG-----YGNVTADDVVFSLDK---ARDPK-RSA------FSG-DYAA-IQKVEAVDAKTVRITLTRRVPSLLALLSNFSGGFIIP--KK
DppA      FHLRKGVKWHDNKEFKPTRELNADDVVFSFDRQKNAQNPYHKVSGGSYEYFEGMGLPELISEVKKVDDNTVQFVLTRPEAPFLADLAMDFASILSKEYAD

          201      210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
AgaA      WLAKNA--DNPNAAPVGAGPFKFAGWTRGREITVKKFDDYYKKGKPDLDEVHYVFYSDENTRVNALKSGDVDIID-YVPAKDAADIAKGPETQLLRNTGP
MoaA      AFKERG--DDFKRRPVGFGPFQVESIQPGQSVTLTANAEYFR-GKPKLSKISYRFLNNEAARDLAFESGELDVEQGNQDQRWLQRLTANPEN-VVDTIEP
DppA      AMMKAGTPEKLDLNPIGTGPFQLQQYQKDSRIRYKAFDGYWG-TKPQIDTLVFSITPDASVRYAKLQKNECQVMP-YPNPADIARMKQDKSINLMEMPG-

          301      310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
AgaA      F-MGL-QFNTKFEPFSKPEVRQAIAYAVDRSAIINTAFNGLGSPIFGIAIPKGYMGYSDAKANYFSHHVEKAKALLAKAGYPNGFEVRLLATS-QYSFQQ
MoaA      AELNLLHINITKPPFNDIRVRQALAHTVNAAQIAKYRGERVNRAVPSV-IPSNNLGF-DPDAGVLNYDPAQSKKLLAEAGFPNGVTVTMVA-S-QLPGLE
DppA      LNVGYLSYNVQKKPLDDVKVRQALTYAVNKDAIIKAVYQGAGVSAKNL-IPPTMWGYND-DVQDYTYDPEKAKALLKEAGLEKGFSIDLWAMPVQRPYNP

          401      410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
AgaA      N---TAIAIQSELAKIGIKVKLDLPDWASRMAKASTGDYDFTVMGSLGEITDAD-W-LSNYYYGGDKLVRTNNSPYFNDQQINDL-LDKGRATVDKAERV
MoaA      S---LAQLIQAQVAEGGFTLNLQPVEHAA-WHQMIRKDLSPIVLYGAARFPIAD-YYLTQFYHSASEIGKPTQVVNFSHCNVADKQIEAARTETDPNKQI
DppA      NARRMAEMIQADWAKVGVQAKIVTYEWGEYLKRAKDGEHQTVMMGWTGDNGDPDNFFATLFSCAASEQG--SNYSKWCYKPFEDL-IQPARATDDHNKRV

          501      510       520       530       540       550       560 564
          |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---|
AgaA      KIY-DA---FVDRALELSPLVYFM--WREQNYAVKKGVTGFTNMPGFLTFQSGLS-IENTKIE
MoaA      ELWKEAQKLIVSNVCAI-PLTENLGTWARKN---KLG-WGF-ELKGSMP-SAPLI-TEQTYFKD
DppA      ELYKQAQVVMHDQAPAL--IIAHSTVFEPVR---K-------EVKGYVVDPLGKHHFENVSIE
```

Alignement des séquences d'AgaA, MoaA et DppA (cluster structural C).

```
       1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
       |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
SocA   MRFTEAFTSPFAKIRATAIAVTLGVLAGAATPALADNPLGLIDPTTISVGTMGDAKPYAFTTADGNFTGFDIELFLNVAGRLGFKKEQVVFTGQEFSALM
NocT           MKFFNLNALAAVVT-GVLL-AAGPTQAK------DYKSITIATEGSYAPYNFKDAGGKLIGFDIDLGNDLCKRMNIECK---FVEQAWDGII

       101      110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
       |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
SocA   PSVANGRFDVAAAAIGTTAKRKETVDFSDGYLAG---FLS-----VLTSEAGITDA----------AGL-------KGKRLGVVQGTLQEIYAEKNFAGT
NocT   PSLTAGRYDAIMAAMGIQPAREKVIAFSRPYLLTPMTFLTTADSPLLKTQVAIENLPLDNITPEQKAELDKFTKIFEGVKFGVQAGTSHEAFMKQMMPSV

       201      210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
       |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
SocA   DLVKFPDNNSAVSALNNGTVDAHFLDFEAAKDYSAR--YPALKI-AVNIPS--FDAPAGFVIRKGNDALRNALDKGLKEAMQDGTWKKLHEKWFPGTPMP
NocT   QISTYDTIDNVVMDLKAGRIDASLASVSFLKPLTDKPDNKDLKMFGPRMTGGLFGKGVGVGIRKEDADLKALFDKAIDAAIADGTVQKLSQQWFGYDASP

       301 307
       |-----|
SocA   AAYLPKQ
NocT   KQ
```

Alignement des séquences de SocA et NocT (cluster structural F).

Structures and specificity of Periplasmic Binding Proteins (PBPs) toward mannityl-opines in *Agrobacterium tumefaciens.*

Agrobacterium tumefaciens pathogenic agent confers the development of tumors in plants, in which it proliferates, integrating a fragment of its virulence Ti plasmid into its host genome. Transformed tissues synthesize original compounds, called opines, used as specific nutrients by the bacterium. More than twenty opines are known so far, and each one of them can be metabolized by *A. tumefaciens* strains possessing its associated transport and catabolism genes, which appears as a competitive advantage in the tumor colonization. The presence of these genes relies on the Ti plasmid type a pathogenic strain possesses.

A. tumefaciens B6 possesses an octopine-type pTi, which harbors the metabolism genes of the mannityl-opines, which are mannopine, mannopinic acid, agropine and agropinic acid. Mannopine and mannopinic acid are synthesized by the same enzyme, and their precursors are deoxy-fructosyl-glutamine (DFG) and deoxy-fructosyl-glutamate (DFGA) respectively, both opines of the chrysopine family. DFG is also a wide-spread Amadori compound which can be uptaken by numerous organisms. Mannopine is a precursor for agropine synthesis. Finally, mannopine, mannopinic acid and agropine can spontaneously lactamize into agropinic acid.

Despite the chemical similarity of these four opines, each one is transported by a different periplasmic binding protein (PBP) associated with an ATP-binding cassette (ABC) transporter. The PBP selects and binds one opine to bring it to the ABC transporter, which allows the passage of the opine to the cytoplasm due to two ATP molecules hydrolysis. The whole transporter specificity is determined by the PBP.

Genetic studies in strains possessing an octopine-type pTi showed that AgaABCD PBP-ABC transporter system is specific to agropinic acid, AgtABCD to agropine, MoaABCD to mannopinic acid and that MotABCD transports mannopine and also mannopinic acid. In C58 strain, which do not possess an octopine-type pTi, SocAB transport system, coded by genes located on the cryptic pAt plasmid, allows the transport of DFG as a nutrient, and seems able to import mannopine too.

My thesis work allowed, first, to characterize the strong affinities and the specificity of PBPs AgaA and AgtB to agropinic acid, PBP MoaA to mannopinic acid and PBP SocA to DFG, and also MotA unspecificity toward mannopine, mannopinique acid and DFG, which leads to a revision of the previously described affinities of AgtB and SocA. Secondly, this work brought molecular and structural basis of PBP-mannityl-opine complexes, never described before. Finally, the structure of PBP AttC, annotated as a mannopine binding-like protein in C58, was determined, and interactions experiments showed that it binds no mannityl-opines, leading to a revision of its annotation.

My work sheds light on the mannityl-opines importation in *Agrobacterium tumefaciens*. The fact that none of the studied transport system allows agropine import lets think that there is another unknown PBP or another unknown whole transport system assuming this role, opening new ways to new studies about octopine- and agropine-type pTis.

Structures et spécificité de protéines périplasmiques de fixation (PBP) pour les mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*.

L'agent pathogène *Agrobacterium tumefaciens* induit, chez les plantes, le développement de tumeurs dans lesquelles il prolifère, en intégrant un fragment de son plasmide Ti de virulence dans le génome de son hôte. Les tissus transformés synthétisent des composés originaux, appelés opines, qui sont utilisés comme nutriments spécifiques par la bactérie. Une vingtaine d'opines sont connues à ce jour, et chacune d'elles peut être métabolisée par des souches *d'Agrobacterium tumefaciens* possédant les gènes de transport et de catabolisme qui lui sont associés, ce qui apparait comme un avantage compétitif dans la colonisation de la tumeur. La présence de ces gènes dépend du type de plasmide Ti que la souche pathogène possède.

Agrobacterium tumefaciens B6 possède un pTi de type octopine, qui porte les gènes de métabolisme des mannityl-opines, qui sont la mannopine, l'acide mannopinique, l'agropine et l'acide agropinique. La mannopine et l'acide mannopinique sont synthétisés par la même enzyme, et ont pour précurseurs respectivement la désoxy-fructosyl-glutamine (DFG) et le désoxy-fructosyl-glutamate (DFGA), tous deux opines de la famille de la chrysopine. La DFG est aussi un composé d'Amadori répandu et assimilable par de nombreux organismes. La mannopine sert de précurseur pour la synthèse de l'agropine. Enfin, la mannopine, l'acide mannopinique et l'agropine peuvent toutes trois se lactamiser spontanément en acide agropinique.

Malgré la similarité chimique de ces quatre opines, chacune est transportée par une protéine périplasmique de fixation (PBP) associée à un transporteur ATP-binding Cassette (ABC) différent. La PBP sélectionne et fixe une opine pour l'apporter au transporteur ABC, qui permet le passage de l'opine dans le cytoplasme grâce à l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. La spécificité du transporteur entier est déterminée par la PBP.

Des études génétiques chez des souches possédant un pTi de type octopine ont montré que le système PBP-transporteur ABC AgaABCD est spécifique de l'acide agropinique, AgtABCD spécifique de l'agropine, MoaABCD spécifique de l'acide mannopinique et que MotABCD transporte la mannopine et également l'acide mannopinique. Chez la souche C58, qui ne possède pas un pTi de type octopine, le système de transport SocAB, codé par des gènes situés sur le plasmide cryptique At, transporte la DFG comme nutriment, et semble aussi capable d'importer la mannopine.

Mon travail de thèse a permis, dans un premier temps, de caractériser les fortes affinités et la spécificité des PBP AgaA et AgtB pour l'acide agropinique, de la PBP MoaA pour l'acide mannopinique et de la PBP SocA pour la DFG, mais aussi la non spécificité de MotA pour la mannopine, l'acide mannopinique et la DFG, ce qui remet en question les affinités précédemment décrites pour AgtB et SocA. Dans un deuxième temps, ce travail a apporté les bases moléculaires et structurales des complexes PBP-mannityl-opines, complexes jamais caractérisés auparavant. Enfin, dans un troisième temps, la structure de la PBP AttC chez la souche C58, annotée comme mannopine-like, a été déterminée, et les expériences d'interaction ont montré qu'elle n'interagit avec aucune mannityl-opine, ce qui conduit à une révision de son annotation.

Mes travaux apportent un éclairage nouveau sur l'import des mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*. Le fait qu'aucun des transporteurs étudiés ne permette l'import de l'agropine laisse penser qu'il existe une autre PBP ou un autre système de transport encore inconnu assurant cette fonction, ouvrant la voie vers de nouvelles études sur les pTi de type octopine et agropine.