



**HAL**  
open science

# La galle du collet chez la vigne : de la diversité des pathogènes à l'étude des plasmides et du quorum sensing d'*Allorhizobium vitis* S4

Quentin Duplay

► **To cite this version:**

Quentin Duplay. La galle du collet chez la vigne : de la diversité des pathogènes à l'étude des plasmides et du quorum sensing d'*Allorhizobium vitis* S4. Ecologie, Environnement. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1041 . tel-01968061

**HAL Id: tel-01968061**

**<https://theses.hal.science/tel-01968061>**

Submitted on 2 Jan 2019

**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.



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 341**  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

**Ecologie microbienne**

Soutenue publiquement le 09/03/2018, par :

**Quentin Duplay**

---

**La galle du collet chez la vigne : de la diversité  
des pathogènes à l'étude des plasmides et du  
quorum sensing d'*Allorhizobium vitis* S4**

---

Devant le jury composé de :

JUMAS-BILAK Estelle, Professeure, Université de Montpellier

Rapportrice

DESSAUX Yves, Directeur de recherche CNRS, IBIC Gif-Sur-Yvette

Rapporteur

POTHIER Joël, Chercheur, SLSFM, Wädenswil, Suisse

Rapporteur

LISA Sanchez, Ingénieur de recherche, Université de Reims

Examinatrice

COMTE Gilles, Professeur, Université Lyon 1

Président du jury

WISNIEWSKI-DYE Florence, Professeure, Université Lyon 1

Co-Directrice de thèse

VIAL Ludovic, Maitre de Conférence, Université Lyon 1

Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



# La galle du collet chez la vigne : de la diversité des pathogènes à l'étude des plasmides et du quorum sensing d'*Allorhizobium vitis* S4

## Résumé

La galle du collet, caractérisée par la formation d'une tumeur, représente la bactériose la plus répandue chez la vigne et entraîne d'importantes pertes économiques à travers le monde. L'agent responsable de cette maladie est le plasmide Ti (pTi) qui confère à ces bactéries hôtes, telles que des *Allorhizobium vitis*, leur pouvoir pathogène. En plus du pTi, les *A. vitis* sont aussi les hôtes d'autres plasmides dont les fonctions et les modes de dissémination sont peu documentés. Afin d'étudier l'adaptation particulière des souches d'*A. vitis* à la vigne, nous nous sommes intéressés à la diversité de ces pathogènes ainsi qu'au rôle de ces plasmides et à la régulation de leur dissémination.

Tout d'abord, nous avons analysé la diversité des isolats provenant de vignobles du Maroc atteints par la galle du collet. Nous avons pu mettre en évidence que l'ensemble des isolats pathogènes (e.g. porteur d'un pTi) forme 4 groupes génétiques se distinguant par le type d'opine produit. Nous nous sommes par la suite intéressés à la souche *A. vitis* S4 qui héberge 5 plasmides dont 3 possèdent un mécanisme de transfert pouvant être régulé par un système de communication bactérienne nommé quorum sensing (QS). Nous avons montré que le système QS du plasmide p130 (renommé pApi) contrôle non seulement le transfert conjugatif du pApi mais aussi d'autres fonctions plasmidiques non caractérisées. Ce système QS nécessite la synthèse d'une molécule signal de type *N*-acyl-homosérine lactone qui d'après nos travaux de caractérisation possède une structure atypique. De plus, des analyses génomiques couplées à des tests de résistance au cuivre nous ont permis d'identifier, sur le plasmide p79 d'*A. vitis* S4, un îlot de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au cuivre de cette souche.

Via des analyses de diversité ainsi que l'étude d'une souche modèle, nos travaux fournissent des connaissances sur l'adaptation d'*Allorhizobium vitis* à son unique plante hôte, la vigne.

**Mots clés :** *Allorhizobium vitis*, galle du collet, quorum sensing, plasmide, résistance au cuivre

# Crown gall disease in grapevine: from the diversity of pathogens to the study of plasmids and quorum sensing of *Allorhizobium vitis* S4

## Abstract

Crown gall disease, characterized by the formation of a tumor, represents the most widespread bacteriosis in the vineyard and causes significant economic losses throughout the world. The causing agent is the Ti plasmid (pTi) which confers pathogenicity to their bacterial hosts, such as *Allorhizobium vitis*. In addition to pTi, *A. vitis* harbours other plasmids whose functions and ways of dissemination are poorly documented. In order to study the peculiar adaptation of *A. vitis* strains to grapevine, we studied the diversity of these pathogens as well as the role of plasmids and the regulation of their dissemination.

First, we analyzed the diversity of isolates from vineyards of Morocco affected by crown gall. We highlighted that all the pathogenic isolates (e.g. carrying a pTi) form 4 genetic groups that are distinguished by the type of opine produced and the ability to induce a hypersensitive response. We then focused on strain *A. vitis* S4, which contains 5 plasmids, including 3 possessing a transfer mechanism that can be regulated by a bacterial communication system called quorum sensing (QS). We demonstrated that the QS system of plasmid p130 (renamed pApi) controls not only the conjugative transfer of the pApi but also other uncharacterized plasmid-encoded functions. This QS system requires the synthesis of a *N*-acyl-homoserine lactone signal molecule with an atypical structure. In addition, genomic analyzes combined with copper resistance assays allowed us to identify, on plasmid p79 of *A. vitis* S4, a genomic island that is likely involved in copper resistance of this strain.

Through analyzes of diversity and study of a model strain, our work provides insight into adaptation of *Allorhizobium vitis* to its unique host plant, grapevine.

**Key Words:** *Allorhizobium vitis*, crown gall, quorum sensing, plasmid, copper resistance

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury Lisa Sanchez, Estelle Jumas-Billak, Yves Dessaux, Joël Pothier et Gilles Comte d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie Yvan de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du LEM, merci également à Xavier et Céline de m'avoir accueilli dans leur équipe ainsi que pour tous les conseils que vous m'avez donné au cours de ces nombreuses années. Et oui ça fait plus de 5ans et demi que je suis arrivé au labo, jeune stagiaire L3 volontaire à l'époque.

Merci également à Sylvie Réverchon, Annelise Chapalain, Hasna Boubakri et Lisa Sanchez pour leurs conseils avisés au cours de mes deux comités de pilotage.

Un très grand merci à Ludo pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces presque 5 ans sous ton encadrement. Si en M1 j'avais su ce qui m'attendais en commençant mon stage avec toi... et bien j'aurai signé plutôt 100 fois qu'une. Ces années de thèse ont été très enrichissantes et c'est en partie grâce à toi. Et je vous souhaite à Raphaëlle et toi un bon début dans la vie à 5, avec le troisième qui va bientôt arriver et que je remercie d'avoir attendu le rendu de mon manuscrit avant d'arriver. J'espère que Raphaëlle ne m'en veut pas de t'avoir monopolisé aussi souvent pendant une période aussi importante. Je vous souhaite beaucoup de bonheur !

Un grand merci à Florence pour tout le temps que tu as pris pour ma thèse, en particulier à la fin quand les choses s'accéléraient, pour la rédaction (particulièrement en anglais où mon écriture est aussi bonne que le système immunitaire de David !). Les corrections envoyées par mail à toute heure du jour ou de la nuit, en semaine comme les week end, automne comme hiver... ont été très utiles.

Merci à tous les membres de l'équipe 4 : Isabelle pour tout le travail qu'on a fait ensemble pour la caractérisation de cette satané molécule, Vincent ta précieuse aide pour les manips, Cindy, Franck (bureau de choc, le meilleur, avec nos petits secrets qui font jalouser !), David (je te jure que je te rendais presque tout le temps ton matériel !), Laurène, Daniel.

Mes deux petites stagiaires, qui ne le sont plus mais un peu quand même. Vous avez toutes les deux choisit l'équipe 3 pour continuer et ça à l'air de plutôt bien marcher, enfin Tiffany tu encore une petite étape à franchir pour devenir une vraie grande. Je vous souhaite une très bonne continuation à toutes les deux. Merci également au bref passage d'Edouard parti vers d'autres horizons.

Je remercie également toutes les personnes du CESN qui m'ont aidées et conseillées Gilles pour les nombreuses réunions « caractérisation », Guillaume et PE souvent pour le côté technique des grosses machines qui sont souvent en panne de la plateforme, Serge et Marjo pour votre curiosité et vos petits conseils parfois comme ça en passant, Elise pour toujours arriver à nous satisfaire malgré nos demandes pas toujours très anticipées (« Salut Elise, c'est possible d'avoir 24 plants de tomates âgés de trois semaines pour demain stp. Merci ! »). Florence H. pour tes conseils ainsi que le prêt de matériel pour les extractions d'ARN, Lisa pour nous avoir aidés à mieux maîtriser nos petits plants de vignes ainsi que pour les conseils, les autres chercheurs du LEM que j'ai pu croiser dans ce grand couloir du 4<sup>e</sup> étage du Mendel.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire Eric Déziel qui m'ont accueilli, conseillé et fait découvrir pendant un mois et demi la vie d'un doctorant au pays de la poutine, des Cowboys Fringants et des caribous. Merci Eric, Marie-Christine, Sylvain ainsi que tous les étudiants aussi nombreux qu'accueillant !

J'en arrive maintenant aux innombrables étudiants avec qui j'ai eu la chance de passer plus ou moins de temps. La meilleure promo : Thib (alias JB) et Zazou, ça fait plus de 8ans qu'on se connaît maintenant, des bancs de la L1 jusqu'à maintenant, de Sainté à Lyon une très belle épopée, Elodie depuis la L3 aussi quand même, ça en fait des bons souvenirs, Lise pour tous les bons moments au labo, dans les activités sportives (enfin le marathon c'est sans moi) ou en soirée (là c'est plus mon domaine), Guillaume et Camille pour les bons moments au labo et une mention très spéciale pour





*« La vie ce n'est pas seulement respirer, c'est avoir le souffle coupé »*

**Alfred Hitchcock**



# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>Listes des figures et tableaux</b> .....	
<b>Introduction générale</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>I. Plasmides chez les <i>Rhizobiaceae</i></b> .....	<b>- 7 -</b>
I.1 Diversité et dissémination des plasmides .....	- 8 -
I.1.1 Diversité des plasmides .....	- 8 -
I.1.2 Systèmes de répllication et de transfert .....	- 9 -
I.1.3 Régulation du transfert .....	- 9 -
I.2 Le plasmide symbiotique et la formation de nodosités .....	- 10 -
I.3 Le plasmide Ti et la galle du collet .....	- 13 -
I.3.1 Le plasmide Ti .....	- 13 -
I.3.2 Rôle du pTi dans l'infection de la cellule végétale .....	- 13 -
I.3.3 Transformation de la cellule végétale .....	- 15 -
I.3.4 Dissémination de la maladie grâce au transfert du pTi.....	- 18 -
I.4 Autres plasmides chez les <i>Rhizobiaceae</i> .....	- 19 -
I.4.1 Autres plasmides chez <i>Rhizobium</i> .....	- 19 -
I.4.2 Autres plasmides chez <i>Agrobacterium</i> et <i>Allorhizobium</i> .....	- 19 -
<b>II. <i>Allorhizobium vitis</i> : détection, épidémiologie et spécificités</b> .....	<b>- 22 -</b>
II.1 La galle du collet chez la vigne : agent causal et historique .....	- 22 -
II.1.1 La galle du collet chez la vigne .....	- 22 -
II.1.2 Historique et état actuel de la taxonomie des <i>Allorhizobium vitis</i> .....	- 23 -
II.2 Habitats, détection et typage des <i>A. vitis</i> .....	- 26 -
II.2.1 Les différents habitats d' <i>A. vitis</i> .....	- 26 -
II.2.1.1 Un mode de vie endophyte .....	- 26 -
II.2.1.2 Présence d' <i>A. vitis</i> dans d'autres biotopes.....	- 27 -
II.2.2 Techniques de détection d' <i>A. vitis</i> .....	- 27 -
II.2.2.1 Détection avec une étape de mise en culture.....	- 27 -
II.2.2.2 Détection directement sur un échantillon de vigne ou du sol .....	- 28 -

II.2.3 Typage d' <i>A. vitis</i> .....	- 28 -
<b>II.3 Epidémiologie et diversité.....</b>	<b>- 30 -</b>
II.3.1 Epidémiologie.....	- 30 -
II.3.2 Diversité génétique .....	- 31 -
II.3.3 Diversité plasmidique.....	- 31 -
<b>II.4 Méthodes de lutte.....</b>	<b>- 32 -</b>
II.4.1 Traitements .....	- 33 -
II.4.2 Biocontrôle .....	- 34 -
II.4.2.1 La souche F2/5.....	- 34 -
II.4.2.2 Autres souches d' <i>A. vitis</i> à potentiel de biocontrôle.....	- 35 -
II.4.2.3 Autres espèces bactériennes à potentiel de biocontrôle .....	- 35 -
II.4.3 Sélection variétale de la vigne.....	- 36 -
<b>II.5 Spécificités plasmidiques des <i>A. vitis</i> .....</b>	<b>- 36 -</b>
II.5.1 Particularités des pTi retrouvés chez <i>A. vitis</i> .....	- 36 -
II.5.1.1 Les différents types de pTi.....	- 37 -
II.5.1.2 Gènes impliqués dans la délimitation de la gamme d'hôtes .....	- 38 -
II.5.2 Capacité des souches d' <i>A.vitis</i> à cataboliser l'acide tartrique .....	- 39 -
II.5.2.1 Distribution de cette capacité et avantages.....	- 39 -
II.5.2.2 Support génomique et gènes impliqués .....	- 41 -
<b>II.6 Spécificités chromosomiques .....</b>	<b>- 42 -</b>
II.6.1 Formation de nécroses.....	- 42 -
II.6.1.1 Rôle de l'activité polygalacturonase.....	- 42 -
II.6.1.2 Synthétases de peptides non ribosomiques et polycétide synthases.....	- 43 -
II.6.2 Induction d'une réponse hypersensible (HR).....	- 44 -
II.6.3 Mobilité par swarming .....	- 45 -
II.6.4 Mécanisme de <i>quorum sensing</i> .....	- 46 -
II.6.4.1 <i>Quorum sensing</i> chez <i>A. vitis</i> F2/5 .....	- 46 -
II.6.4.2 <i>Quorum sensing</i> chez <i>A. vitis</i> S4 .....	- 47 -
<b>Résultats .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>Chapitre 1 : Diversité des souches pathogènes isolées de pieds de vignes atteint de la galle du collet au Maroc .....</b>	<b>- 51 -</b>
Préambule.....	- 51 -
Characterization and phylogenetic diversity of <i>Allorhizobium vitis</i> isolated from grapevine in Morocco.....	- 53 -

Introduction .....	- 55 -
Materials and Methods .....	- 56 -
Results: .....	- 60 -
Discussion.....	- 65 -
<b>Chapitre 2 : Caractérisation d'un système de <i>quorum sensing</i> atypique chez <i>Allorhizobium vitis</i> S4 .....</b>	<b>- 77 -</b>
Préambule.....	- 77 -
A new plasmidic quorum sensing system in <i>Allorhizobium vitis</i> S4 regulates conjugal transfer .....	- 79 -
Introduction .....	- 80 -
Material and methods .....	- 82 -
Results .....	- 89 -
Discussion.....	- 99 -
<b>Chapitre 3 : Implication du plasmide Cu d'<i>Allorhizobium vitis</i> S4 dans la résistance au cuivre.....</b>	<b>- 115 -</b>
Introduction .....	- 115 -
Matériels et méthodes.....	- 117 -
Milieux et conditions de culture.....	- 117 -
Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	- 117 -
Analyse de la distribution des gènes de résistance au cuivre .....	- 117 -
Résultats et discussion .....	- 119 -
1) Analyse du plasmide Cu d' <i>A. vitis</i> S4 .....	- 119 -
2) Résistance au cuivre de différentes souches d' <i>A. vitis</i> et d' <i>A. tumefaciens</i> .....	- 120 -
3) Distribution des gènes impliqués dans la résistance au cuivre.....	- 122 -
Conclusion .....	- 124 -
<b>Discussion générale.....</b>	<b>- 127 -</b>
<b>Références .....</b>	<b>- 139 -</b>



# Liste des abréviations

A : Adénosine

ACP : Acyl Carrier Protein

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADN-T : ADN de transfert

AHL : *N*-Acyl Homosérine Lactone

ARN : Acide RiboNucléique

Bv : biovar

C : Cytosine

CoA : Coenzyme A

D : Dextrogyre

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

G : Guanine

GABA : Gamma Aminobutyric Acid

GBL : Gamma-Butyrolactone

GFP : Green Fluorescent Protein

Gm : Gentamycine

HSL : HomoSérine Lactone

Kb : Kilobase

L : Lévoxyre

LB : Luria Bertani

LC : Liquid Chromatography

LPG : Levure Peptone Glucose (YPG : Yeast Peptone Glucose)

LPS : lipopolysaccharide

Mb : Mégabase

MCH : Magnetic Capture Hybridization



MLSA : MultiLocus Sequence Analysis

MS : Mass Spectrometry

MS/MS : Tandem Mass Spectrometry

Mn<sup>2+</sup> : Manganèse

NaCl : Chlorure de Sodium

NeoKan : Néomycine/Kanamycine

NRPS : NonRibosomal Peptide Synthetase

Nt : nucléotide

3-OC<sub>8</sub>-HSL : 3-Oxo-C<sub>8</sub>-HomoSérine Lactone

3-OHC<sub>12</sub>-HSL : 3-Oxo-C<sub>12</sub>-HomoSérine Lactone

Pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PKS : PolyKetide Synthetase

PPTase : Sfp phosphopantetheinyl transferase

pSym : plasmide symbiotique

pTi : plasmide Ti (pour *tumor inducing*)

pTiC58 : plasmide Ti de la souche C58

pTiS4 : plasmide Ti de la souche S4

QS : *Quorum sensing*

Q-ToF : Quadrupole Time-of-Flight

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Length Polymorphism

RNAP : RNA Polymerase

RNAseq : RNA sequencing

RPKM : Reads Per Kilobase of transcript per Million reads mapped

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative PCR

T : Thymine

UFC (CFU) : Unité Formant Colonies

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography

# Listes des figures et tableaux

## - Synthèse bibliographique

### Figures :

- Figure 1:** Représentation schématique des différentes étapes de la mise en place de nodosités par *Rhizobium*. ..... - 11 -
- Figure 2 :** Carte du plasmide Ti d'*A. fabrum* C58. .... - 12 -
- Figure 3:** Mise en place de la virulence lors du développement de la galle du collet par *A. fabrum* C58. .... - 14 -
- Figure 4:** Synthèse et intégration de l'ADN-T dans le génome végétal grâce aux protéines Vir. .... - 16 -
- Figure 5 :** Représentation de la structure chimique de plusieurs opines parmi les plus courantes. - 17 -
- Figure 6 :** Galle du collet provoquée par *A. vitis* sur un pied de vigne..... - 22 -
- Figure 7 :** Arbre phylogénétique de la famille des *Rhizobiaceae* basé sur le gène *recA*. ..... - 25 -
- Figure 8 :** Planisphère montrant les pays dans lesquels des souches d'*A. vitis* ont été isolées. .... - 29 -
- Figure 9 :** Profil plasmidique mettant en évidence la diversité plasmidique de souches d'*A. vitis* isolées de la vigne au Maroc. .... - 32 -
- Figure 10 :** Effet d'un mélange des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et de *Thymus vulgaris* sur *A. vitis* S4..... - 33 -
- Figure 11 :** Effet de la souche *A. vitis* VAR03-1 sur la formation de tumeurs chez la vigne..... - 35 -
- Figure 12 :** Carte du plasmide Ti d'*A. vitis* S4. .... - 37 -
- Figure 13 :** Comparaison de l'organisation des régions de virulence des plasmides Ti des souches *A. vitis* S4 et *A. fabrum* C58. .... - 38 -
- Figure 14 :** Colonisation d'une racine de vigne et mise en évidence de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme de l'acide tartrique..... - 40 -
- Figure 15 :** Capacité à induire une nécrose sur explant de vigne par *A. vitis*. .... - 43 -
- Figure 16 :** Voie de biosynthèse d'un métabolite induisant des phénotypes de nécrose et de réponse hypersensible chez la souche *A. vitis* F2/5. .... - 44 -
- Figure 17 :** Réponse hypersensible sur feuille de tabac par *A. vitis* ou *A. tumefaciens*. .... - 45 -
- Figure 18 :** Capacité de swarming chez *A. vitis*. .... - 46 -
- Figure 19 :** Schéma récapitulatif simplifié du quorum sensing, de la nécrose, de la réponse hypersensible et du swarming chez la souche modèle *A. vitis* S4..... - 48 -

## - Chapitre 1 : Diversité des souches pathogènes isolées de pieds de vignes atteints de la galle du collet au Maroc

### Figures :

<b>Figure 1</b> : Localization of the sampling sites.....	- 60 -
<b>Figure 2</b> : Phylogenetic position of recA sequences obtained in this study.....	- 61 -
<b>Figure 3</b> : Phylogenetic tree of five housekeeping genes from <i>Allorhizobium vitis</i> isolates. ....	- 63 -
<b>Figure 4</b> : Hypersensitive response (HR) on tobacco leaves and necrosis on grape shoot explants. .	- 64 -
<b>Figure S1</b> : Grapevine showing crown gall symptoms from vineyard B.....	- 70 -
<b>Figure S2</b> : Pathogenicity of different <i>A. vitis</i> and <i>A. tumefaciens</i> strains on tomato plants. ....	- 71 -
<b>Figure S3</b> : Plasmid profiles of <i>A. vitis</i> isolates. ....	- 72 -

### Tableaux :

<b>Table 1</b> : PCR primers used in this study. ....	- 57 -
<b>Supplemental Table 1</b> : recA alleles of <i>A. tumefaciens</i> G4, G7 and <i>A. vitis</i> species. ....	- 73 -
<b>Supplemental Table 2</b> : Characterization of isolates from grapevine tumors of Morocco, Meknes region.....	- 74 -

## - Chapitre 2 : Caractérisation d'un système de *quorum sensing* atypique chez *Allorhizobium vitis* S4

### Figures :

<b>Figure 1</b> : Phylogenetic tree of LuxI-like members in selected Rhizobiales. ....	- 88 -
<b>Figure 2</b> : A) Genetic organization of <i>A. vitis</i> S4 p130 tra and trb operons, apil and apiR genes and B) Organization of the replication, conjugal transfer, quorum sensing and NRPS genes of the <i>A. vitis</i> S4 p130 .....	- 90 -
<b>Figure 3</b> : Characterization attempt of the Apil molecule.....	- 92 -
<b>Figure 4</b> : Dose-responses of the Papil-egfp reporter strain exposed to commercial AHL and to the Apil molecule.....	- 94 -
<b>Figure 5</b> : Transfer frequencies of p130 in vitro and in planta. ....	- 95 -
<b>Figure S1</b> : Sequence alignment of Apil with BjaI (Q89VI2) BraI (A4YLT1) and RpaI (Q6NCZ6). ....	- 109 -
<b>Figure S2</b> : Sequence alignment of the regulator ApiR with BjaR (Q6NCZ5), BraR (A4YLT2) and RpaR (Q6NCZ5). ....	- 110 -
<b>Figure S3</b> : Mass spectrum of the Apil molecule.....	- 111 -
<b>Figure S4</b> : The MS/MS mass spectra of 3-OH-C10-L-HSL, 3-OH-C14-L-HSL and C12-L-HSL compared with molecules produced by <i>A. vitis</i> S4.....	- 112 -
<b>Figure S5</b> : Necrosis on grapevine explants (A) and swarming motility (B) exhibited by <i>A. vitis</i> S4 wild-	

type, S4 $\Delta$ apil and S4 $\Delta$ avsl strains..... - 113 -

### **Tableaux :**

**Table 1** : List of plasmidic down-regulated genes in the apil mutant compared to *A. vitis* S4 wild-type identified by RNA-seq and RTqPCR. .... - 97 -

**Table S1** : Bacterial strains and plasmids used in this study ..... - 107 -

**Table S2** : PCR primers used in this study. .... - 108 -

## **- Chapitre 3 : Implication du plasmide Cu d'*Allorhizobium vitis* S4 dans la résistance au cuivre**

### **Figures :**

**Figure 1** : Représentation schématique du plasmide Cu d'*Allorhizobium vitis* S4. .... - 119 -

**Figure 2** : Région de résistance au cuivre de *A. vitis* S4 et orthologues chez *A. fabrum* C58, *A. tumefaciens* CFBP6623 et CFBP6626..... - 123 -

### **Tableaux :**

**Tableau 1** : Caractéristiques des souches testées pour leur résistance au cuivre. .... - 118 -

**Tableau 2** : Annotation manuelle de la région de résistance au cuivre du pCu d'*A. vitis* S4 ..... - 121 -



# Introduction générale



Le terme d'écologie a été inventé en 1866 par Ernst Haeckel qu'il définit comme « la science des conditions d'existence ». Cette science comprend l'étude des organismes vivants, de leur environnement et les interactions entre organismes ainsi que celles qu'ils ont avec leur environnement. Ces interactions constituent le moteur de l'évolution car elles entraînent des modifications dans le mode de vie des organismes qui doivent, de ce fait, s'adapter et donc évoluer pour survivre. Elles s'établissent entre individus d'une même espèce comme entre individus très éloignés phylogénétiquement, tel qu'entre un procaryote et un eucaryote. Certaines interactions n'apportent ni avantage ni inconvénient pour les deux protagonistes mais d'autres s'avèrent bénéfiques ou au contraire négatives pour l'un ou pour les deux protagonistes. Dans le cas d'une interaction de type parasitisme, au cours de laquelle un des deux partenaires va tirer un avantage au dépens du second, des gènes présents chez le parasite ainsi que chez l'hôte permettent la mise en place de l'interaction.

Chez les bactéries pathogènes, les mécanismes de virulence ont un coût métabolique important, leur expression va donc être finement régulée. Certains de ces mécanismes sont notamment régulés par un système de communication cellulaire densité-dépendant appelé quorum sensing (QS). Grâce à la synthèse de molécules signal, ce système permet à chaque bactérie d'évaluer la densité de sa population. Lorsque la concentration de molécules signal est importante, le *quorum* est atteint, ce qui entraîne la régulation de certains mécanismes nécessitant une action collective des bactéries. Dans le cas de bactéries pathogènes, une fois que le *quorum* est atteint il peut y avoir induction des mécanismes de virulence. La compréhension de ce mécanisme est donc cruciale, notamment pour mieux appréhender l'initiation de maladies bactériennes dans le domaine de la médecine ou encore dans celui de la phytopathologie.

*Agrobacterium* est un genre bactérien ubiquitaire des sols et de la rhizosphère principalement connu pour induire la galle du collet, qui se caractérise par la formation d'une tumeur, chez de nombreuses espèces de plante (Kado, 2014). Cependant, le véritable agent pathogène de cette maladie est le plasmide Ti (pTi) qui porte tous les gènes de virulence et confère à sa bactérie hôte la capacité à induire cette bactériose. Le pTi est également retrouvé chez *Allorhizobium vitis* (anciennement *Agrobacterium vitis*) et leur confère la capacité d'induire la galle du collet uniquement chez la vigne entraînant d'importantes pertes économiques (Burr *et al.*, 1998). Les particularités, connues sur ce pathogène, notamment celles impliquées dans l'interaction avec la plante hôte, sont principalement concentrées sur le pTi (diversité, ADN-T) et sont moindres que celles connues chez *A. tumefaciens*. Les études s'intéressant à la diversité d'*A. vitis* sont peu nombreuses et le niveau d'information pertinent est parfois limité, du fait des outils employés et des controverses sur la



position taxonomique du pathogène *A. vitis* (Kuzmanović *et al.*, 2015; Mousavi *et al.*, 2015; Shams *et al.*, 2013).

Tout comme les autres membres de la famille des *Rhizobiaceae*, la plupart des souches d'*A. vitis* hébergent de nombreux plasmides. Les plasmides étant connus pour porter l'information génétique permettant la mise en place d'adaptations, leur étude ainsi que celle de leur dissémination semblent pertinentes afin de comprendre l'adaptation des *A. vitis* à la vigne. La souche de référence *A. vitis* S4 possède un pTi (259 kb) et quatre plasmides (631 kb, 212 kb, 130 kb et 79 kb) (Slater *et al.*, 2009). Le pTi ainsi que deux autres plasmides présents chez cette souche possèdent des systèmes QS. *A. vitis* semble donc un modèle de choix à la fois pour étudier l'implication du quorum sensing dans la dissémination des plasmides et les fonctions apportées par ces plasmides potentiellement impliquées dans l'adaptation de la bactérie à son hôte et/ou son environnement.

Le premier objectif de ce travail a consisté à caractériser et étudier la diversité des bactéries phytopathogènes responsables de la galle du collet au sein de vignobles du Maroc en prenant en considération les données récentes sur la taxonomie des *Rhizobiaceae* et en couplant l'utilisation d'outils de phylogénie moléculaire et d'analyses phénotypiques.

Le second objectif s'est concentré sur le rôle des plasmides dans l'adaptation à l'hôte et/ou à l'environnement, en se focalisant sur les plasmides de la souche modèle *A. vitis* S4. Notamment, le système QS présent sur le p130 a été exploré (caractérisation de la molécule signal, identification des fonctions régulées par ce système QS) et l'implication du p79 dans la résistance au cuivre a été abordée.

Dans une première partie, ce manuscrit se propose d'établir un état de l'art des connaissances sur les plasmides de la famille des *Rhizobiaceae* ainsi que sur le phytopathogène *Allorhizobium vitis*. Dans une seconde partie, seront présentés les résultats obtenus au cours de cette thèse avec i) un premier chapitre sur l'analyse de la diversité des isolats provenant de vignobles du Maroc atteints par la galle du collet ; ii) un second chapitre sur l'étude d'un système de quorum sensing atypique porté par un plasmide de la souche *A. vitis* S4 ainsi que des gènes régulés par ce système ; iii) et un troisième chapitre consacré à l'étude d'un autre plasmide d'*A. vitis* S4 et à son implication dans la résistance particulière de cette souche au cuivre. Enfin dans une dernière partie, l'apport de ces résultats et les perspectives qui en résultent seront discutés, notamment en les replaçant dans un contexte plus global.

# Synthèse bibliographique



## I. Plasmides chez les *Rhizobiaceae*

Les *Rhizobiaceae* sont une famille de bactéries appartenant à l'ordre des *Rhizobiales* et faisant partie des  $\alpha$ -protéobactéries. La plupart des espèces de cette famille vit dans le sol ou met en place des interactions avec des plantes. C'est notamment le cas des deux genres les plus étudiés, *Rhizobium* et *Agrobacterium*. Ils sont principalement connus pour établir respectivement une interaction de type symbiose, la symbiose fixatrice d'azote, et une interaction de type pathogène, provoquant la maladie de la galle du collet. Les *Rhizobiaceae* ont aussi la caractéristique d'avoir un nombre de réplicons très variable et présentant une importante diversité (Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Teyssier *et al.*, 2004).

Les différents genres qui composent la famille des *Rhizobiaceae* possèdent tous, en plus de leur chromosome circulaire, un deuxième réplicon de grande taille appelé chromide. Les chromides sont des molécules d'ADN extrachromosomiques vraisemblablement acquises par transfert horizontal et qui possèdent un système de répllication et de répartition de type plasmidique, indépendant de celui du chromosome. Après avoir été appelés « chromosomes secondaires », le terme de chromide est maintenant utilisé pour les qualifier (Harrison *et al.*, 2010). Ces molécules, qui sont souvent de grande taille (>200 kb), seraient le résultat de l'évolution de plasmides ayant perdu leur capacité à se transférer horizontalement mais ayant acquis des gènes essentiels, les rendant désormais indispensables à la survie de leur hôte (Harrison *et al.*, 2010). A l'intérieur de la famille des *Rhizobiaceae*, toutes les bactéries du genre *Agrobacterium* possèdent un chromosome circulaire et un chromide qui a la particularité d'être linéaire (Allardet-Servent *et al.*, 1993; Ramírez-Bahena *et al.*, 2014) contrairement aux *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) et *Allorhizobium* qui possèdent un chromosome circulaire et un chromide circulaire (Mousavi *et al.*, 2015; Ramírez-Bahena *et al.*, 2014).

Parmi les réplicons se trouvent également les plasmides, qui sont des molécules d'ADN indépendantes pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides ne sont pas essentiels et codent pour des fonctions non-obligatoires, permettant par exemple à la bactérie de s'adapter à de nouveaux environnements (López-Guerrero *et al.*, 2012; Teyssier *et al.*, 2004). Les déterminants génétiques bactériens permettant la mise en place des interactions avec la plante sont, dans certains cas, portés par des plasmides : le pSym (pour plasmide symbiotique) et le pTi (pour plasmide *tumour inducing*). Le pSym est retrouvé chez certaines bactéries des genres *Rhizobium* et *Ensifer* et le pTi est, quant à lui, retrouvé dans les genres *Agrobacterium* et *Allorhizobium*.

La phylogénie au sein de la famille des *Rhizobiaceae* est complexe et de nouveaux noms de genres ou d'espèces sont encore régulièrement proposés, notamment grâce à l'utilisation de nouveaux outils phylogénétiques (Mousavi *et al.*, 2014, 2015; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015; Ramírez-Bahena *et al.*, 2014).

Afin d'illustrer la complexité de la taxonomie de cette famille, prenons l'exemple du complexe d'espèces *A. tumefaciens* qui regroupe plusieurs espèces génomiques rassemblées sous un même nom car elles n'ont pas encore été caractérisées. Ce complexe d'espèce est subdivisé en espèces génomiques (*A. tumefaciens* G1 à G9, G13 et G14) qui sont différenciées sur des critères de polymorphisme et de phylogénie moléculaire (Costechareyre *et al.*, 2010; Mousavi *et al.*, 2014, 2015). Un nom latin binomial a été attribué à certaines de ces espèces génomiques (*Agrobacterium pusense* pour l'espèce génomique G2, *Agrobacterium nepotum* pour l'espèce génomique G14) (Kuzmanović *et al.*, 2015; Panday *et al.*, 2011). Au sein du complexe d'espèce génomique *A. tumefaciens*, la souche modèle est *Agrobacterium fabrum* C58 (anciennement *A. tumefaciens* C58) qui appartient à l'espèce génomique G8. Son génome est disponible depuis de nombreuses années, puisque cette souche a été séquencée par deux équipes en même temps dès 2001 (Goodner, *et al.*, 2001; Wood, *et al.*, 2001).

Au cours de cette première partie, nous allons nous focaliser sur l'étude des plasmides permettant la mise en place de ces deux interactions ainsi qu'à la diversité des plasmides retrouvés chez ces genres bactériens.

## I.1 Diversité et dissémination des plasmides

### I.1.1 Diversité des plasmides

Chez les *Rhizobiaceae*, certains plasmides se révèlent importants pour la survie de la bactérie dans certains environnements et permettent d'établir des interactions avec la plante. Au sein du genre *Rhizobium*, le nombre de plasmides peut varier de 0 (souche de *Neorhizobium galegae* HAMBI 540, (Wang *et al.*, 1998)) à 11 plasmides (*R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39, (Romero D. and Brom S., 2004)), avec des tailles allant de 150 kb à 1683 kb (Romero et Brom, 2004). Au sein du genre *Agrobacterium*, une grande diversité dans le nombre et la taille des plasmides est également retrouvée ; notamment, les souches de la collection de l'équipe hébergent de 0 à 5 plasmides avec des tailles parfois inférieures à 100 kb ou supérieures à 1000 kb (données non publiées). Les plasmides de plus de 1000 kb sont appelés mégaplasmides. Avec la présence de chromides et de nombreux plasmides, l'ADN non-chromosomique peut représenter jusqu'à 50% de l'ADN total de certaines espèces (García-de Los Santos *et al.*, 1996).

## I.1.2 Systèmes de réplication et de transfert

Malgré leur grande diversité en termes de taille et de contenu en gènes, les plasmides des *Rhizobiaceae* partagent des caractéristiques communes. La plupart d'entre eux possèdent le même type de système de réplication codé par les gènes *rep* (Li and Farrand, 2000; Witzany, 2011). L'opéron *rep* est composé des gènes *repA* et *repB* dont les produits permettent la ségrégation du plasmide lors de la division cellulaire, et du gène *repC* dont le produit permet l'initiation du début de la réplication (Cevallos *et al.*, 2008). La présence de plusieurs plasmides possédant des systèmes de réplication similaires, par exemple de type *rep*, chez une même bactérie peut entraîner un phénomène d'incompatibilité plasmidique. Cependant, plusieurs plasmides ayant des systèmes de réplication de type *rep* cohabitent chez certaines souches des *Rhizobiaceae*, comme c'est le cas d'*A. vitis* S4. Les raisons pouvant justifier cette présence simultanée ne sont pas connues mais les différents avantages que confèrent ces plasmides, entraînant des pressions de sélection différentes, pourraient l'expliquer (Castillo-Ramírez *et al.*, 2009). A notre connaissance, seuls quelques plasmides des *Rhizobiaceae* ont un système de réplication différent. C'est le cas des plasmides de la souche *Methylobacterium nodulans* ORS2060 (Witzany, 2011) ainsi que le pRm1132f de *Ensifer meliloti* 1132, qui possèdent un système de réplication de type RCR (*rolling-circle-replicating*) (Barran *et al.*, 2001).

Une autre caractéristique commune à de nombreux plasmides d'*Agrobacterium* et de *Rhizobium* est la présence d'un système de transfert par conjugaison grâce à un système de sécrétion de type IV composé des protéines Tra et Trb (Beijersbergen *et al.*, 1992; Piper *et al.*, 1993). Dans le cas du pTi de la souche C58, les opérons *traAFBH* et *traCDG* codent la protéine T4CP ainsi que les protéines permettant la formation du relaxosome qui permet la coupure de l'ADN puis le déenroulement du brin et son transport vers la bactérie receveuse. Les gènes *trb* de l'opéron *tral-trbBCDEJKLFGHI* codent les protéines formant les pili et le complexe protéique transmembranaire (Li and Farrand, 2000; Romero D. and Brom S., 2004; Witzany, 2011).

## I.1.3 Régulation du transfert

Une régulation très fine du transfert et de la réplication de ces plasmides est nécessaire afin qu'ils puissent se disséminer sans pour autant entraîner un coût métabolique trop important pour la bactérie. La régulation du transfert plasmidique chez les *Rhizobiaceae* est souvent dépendante de la densité cellulaire ou régulation par *quorum sensing* (QS) (Wisniewski-Dyé and Downie, 2002). Cette régulation permet d'activer l'expression des gènes de transfert uniquement lorsqu'un nombre suffisant de bactéries est présent, ce qui est une condition favorable au transfert par conjugaison (Zhang *et al.*, 1993).

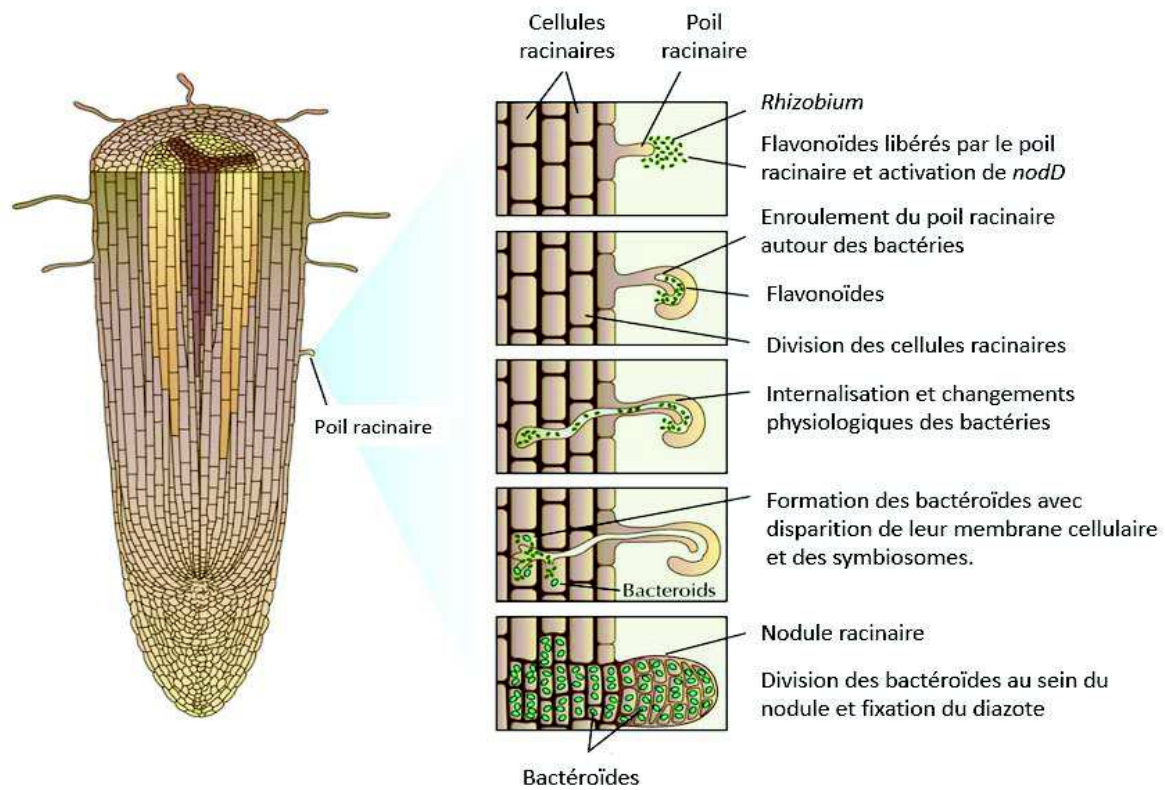
Ce type de régulation est retrouvé chez une gamme importante de plasmides : i) le pNGR234a de *Rhizobium sp.* NGR234, ii) le p42a de *Rhizobium etli* CFN42, iii) le pRL1JI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, et iv) plusieurs pAt de souches d'*A. tumefaciens* (mais pas le pAt de la souche *A. fabrum* C58), possèdent un système de QS qui permet de réguler leur transfert conjugatif (He *et al.*, 2003; McAnulla *et al.*, 2007; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016; Tun-Garrido *et al.*, 2003). Plusieurs pTr ou pTar (pour plasmide acide Tartrique) présents chez des *A. vitis* possèdent également un système de QS supposé impliqué dans la régulation du transfert conjugatif (Lowe *et al.*, 2009).

Bien que présente chez de nombreux plasmides, la régulation du transfert conjugatif par le QS a principalement été étudiée pour le pTi et sur quelques souches modèles dont *A. fabrum* C58 (pour revue voir Lang and Faure, 2014) et sera détaillée par la suite (paragraphe I.3.4). Pour le pSym, l'étude du QS est plus compliquée car contrairement à *A. fabrum* C58 les souches de *Rhizobium* possèdent en général un ou plusieurs systèmes de QS. Cependant, l'implication d'un système de QS dans la régulation du transfert de ce plasmide a pu être mise en évidence chez certaines souches (He *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2009; Wilkinson *et al.*, 2002). Le transfert de certains plasmides dont le pAt de *A. fabrum* C58 n'est pas régulé par QS mais par les protéines RctA et RctB (Perez-Mendoza *et al.*, 2005). La protéine RctA réprime le transfert du plasmide tandis que RctB semble diminuer l'action de RctA. Il est à noter qu'il a été récemment mis en évidence la présence d'un système de QS et de la protéine RctA sur un même plasmide chez *A. tumefaciens* P4 (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016).

## I.2 Le plasmide symbiotique et la formation de nodosités

L'azote est un élément essentiel pour tout organisme vivant. Cependant la forme prépondérante, notamment dans l'atmosphère, le diazote ( $N_2$ ), n'est pas assimilable par la plupart des organismes. La fixation du diazote permet de le transformer en ammonium ( $NH_4^+$ ) qui peut ensuite être assimilé par un plus grand nombre d'organismes. La compétition pour l'azote étant importante, les plantes capables d'établir des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azote se voient conférer un avantage (Boring *et al.*, 1988). La majorité des espèces de plantes pouvant établir des symbioses avec des *Rhizobiaceae* fixatrices d'azote font parties de la famille des *Fabaceae*. Cette symbiose permet la mise en place d'un nouvel organe, la nodosité dans lequel vont se développer les bactéries fixatrices d'azote et se dérouler les échanges nutritifs entre les deux partenaires (Crews, 1999; Witzany, 2011).

Chez la majorité des souches de *Rhizobiaceae* fixatrices d'azote, les déterminants génétiques permettant la mise en place des nodosités (gènes *nod*) et l'activité de fixation d'azote (gènes *nif*) sont portés par un plasmide, le pSym (He *et al.*, 2003; Verma and Long, 1983; Wilkinson *et al.*, 2002).



**Figure 1 : Mise en place de nodosités par *Rhizobium*.** Modifié d'après le livre Evolution, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.

Le pSym présente une grande diversité de taille : de 180 kb chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* à 1,35 Mb chez une souche de *Ensifer meliloti* (Romero D. and Brom S., 2004). La suppression du pSym chez les souches le possédant abolit la capacité à former une symbiose fixatrice d'azote. Le transfert du pSym à une souche d'*Agrobacterium* lui confère la capacité de former des nodosités ainsi que de fixer le diazote atmosphérique (Martínez *et al.*, 1987).

L'interaction entre la plante et la bactérie débute par un dialogue moléculaire. La plante exsude des flavonoïdes dans la rhizosphère qui vont être perçus par les bactéries et vont activer la transcription des gènes *nod* (Peters *et al.*, 1986) (Figure 1). L'induction des gènes *nod*, notamment *nodABC*, conduit à la synthèse de dérivés oligosaccharidiques, les facteurs Nod, capables de se lier à des récepteurs de type kinase spécifiques de la plante hôte. En fonction du type d'oligosaccharides synthétisés et du type de récepteurs de la plante, il peut y avoir mise en place de la symbiose ou non, ce qui détermine le spectre d'hôte plus ou moins étroit de la bactérie. La détection des facteurs Nod par la plante déclenche une voie de signalisation complexe au niveau des racines, entraînant l'enveloppement des bactéries par les poils racinaires (Mitra *et al.*, 2004; Radutoiu *et al.*, 2003) (Figure 1).

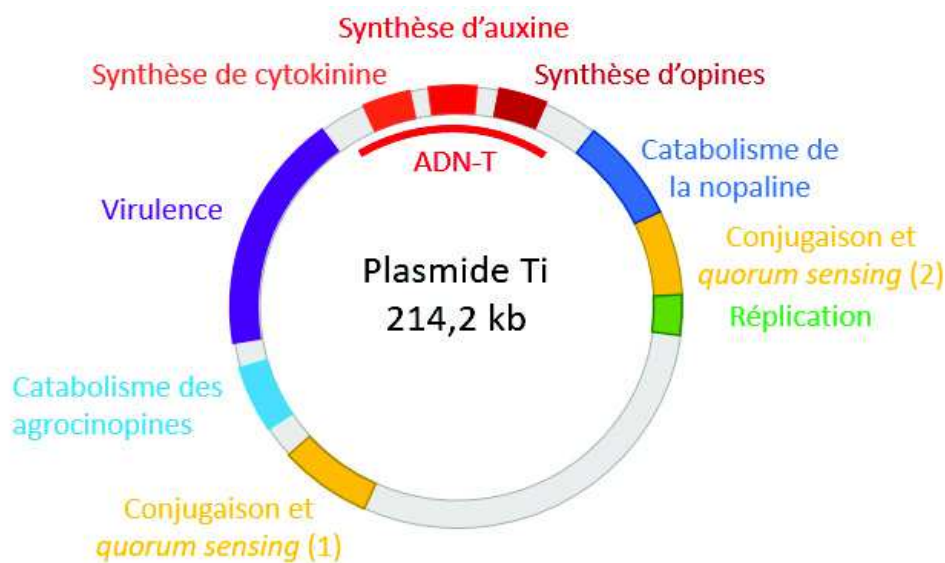
Suite à l'internalisation de la cellule bactérienne grâce à l'enveloppement par le poil racinaire, la bactérie pénètre dans la racine grâce à une structure tubulaire créée par la plante, le cordon d'infection (Gage, 2004), la menant au niveau des cellules racinaires (Figure 1). A ce niveau, la



membrane cellulaire végétale contient une brèche, ce qui permet à la bactérie d'entrer directement dans le cytoplasme de la cellule racinaire (Brewin, 2004). La bactérie va alors subir de nombreux changements physiologiques afin de s'adapter à ce nouvel environnement (Prell and Poole, 2006). La cellule végétale va ensuite grossir et la bactérie va rejoindre le lumen par endocytose. A ce stade, la bactérie devient un bactéroïde en perdant sa membrane cellulaire. Cet ensemble formé par le bactéroïde et la cellule végétale est appelé symbiosome.

Un symbiosome peut contenir un ou plusieurs bactéroïdes selon le type de bactérie, le plasmide symbiotique et la maturité de la nodosité. C'est à l'intérieur des symbiosomes qu'a lieu la fixation du diazote par les bactéroïdes grâce à la nitrogénase, codée par les gènes *nifHDK*, souvent portés par un pSym (Verma and Long, 1983). L'ammonium fourni par la fixation d'azote est assimilé au niveau du cytosol de la cellule végétale sous forme d'acides aminés (glutamate ou glutamine) ou d'autres composés azotés. En échange, les bactéroïdes catabolisent des sources énergétiques produites par la plante, notamment des acides dicarboxyliques comme le malate et le succinate (Lodwig E. and Poole P., 2003).

Outre leur capacité à permettre la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote, les pSym possèdent également des gènes conférant d'autres avantages. Le pSymA de *S. meliloti* confère par exemple la capacité à utiliser l'arginine, l'histidine, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), la sérine, la glycine et le gluconate comme sources de carbone. Il contient également des gènes impliqués dans la résistance aux stress oxydatif ou osmotique (Barnett *et al.*, 2001; Oresnik *et al.*, 2000).



**Figure 2 : Carte du plasmide Ti d'*A. fabrum* C58.**

Les régions colorées et nommées représentent les régions impliquées dans la virulence et la dissémination du pTi. La région de virulence contient les gènes *vir* dont les rôles sont expliqués dans le texte et dans la figure 4.

## I.3 Le plasmide Ti et la galle du collet

### I.3.1 Le plasmide Ti

La galle du collet est une phyto bactériose identifiée chez un très grand nombre d'espèces de plantes dicotylédones, dont de nombreuses ayant un intérêt agronomique (vigne, pêchers, pommiers, rosiers...). Elle se caractérise par la formation d'une tumeur le plus souvent localisée au niveau du collet de la plante. La propagation de la maladie se fait souvent à la suite de blessures naturelles ou par les outils de taille qui se révèlent être d'importants vecteurs de propagation.

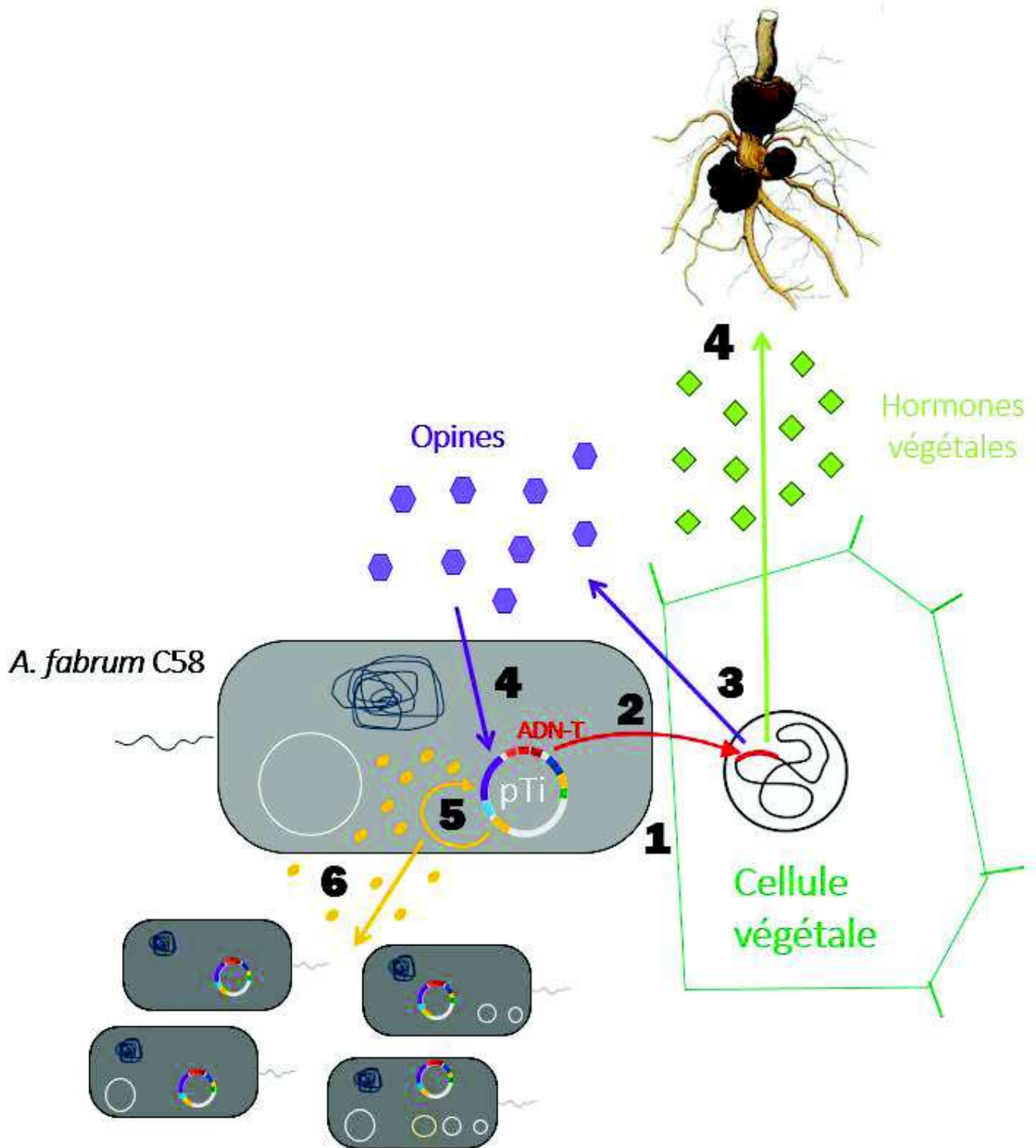
L'agent infectieux de la galle du collet est le plasmide Ti (ou pTi) qui héberge les gènes de virulence nécessaires à la mise en place de la maladie (Figure 2). Ce plasmide est retrouvé principalement chez des bactéries appartenant au genre *Agrobacterium* ou à l'espèce *Allorhizobium vitis* (Hooykaas *et al.*, 1977; Zaenen *et al.*, 1974). Les régions et les gènes nécessaires au transfert conjugatif, à la réplication du plasmide, à la mise en place de la virulence ainsi que la portion d'ADN qui est transférée dans le génome de la cellule végétale (ADN-T) ont été identifiés et caractérisés (Figure 2).

Le plasmide Ri (pour *Root inducing*), présent chez les *Agrobacterium rhizogenes*, permet à ces bactéries hôtes d'induire la maladie du chevelu racinaire chez de nombreuses espèces de plantes (Moor *et al.*, 1979). Le plasmide Ri possède également un ADN-T, et la mise en place de la maladie du chevelu racinaire ressemble en de nombreux points à celle de la galle du collet, et ne sera par conséquent pas détaillé dans ce document.

### I.3.2 Rôle du pTi dans l'infection de la cellule végétale

Lorsqu'une plante est blessée, suite à un stress naturel ou par l'intervention de l'homme, elle libère de nombreux signaux chimiques (Figure 3, étape 1). Des composés phénoliques, des monosaccharides et la diminution du pH due à la présence de composés pariétaux acides sont des signaux qui vont être reconnus par les agrobactéries porteuses d'un pTi. Leur reconnaissance entraîne l'activation de gènes chromosomiques permettant la synthèse des flagelles (gènes *fla*, *fli*, *flh* et *flg*) et impliqués dans le chimiotactisme (opérons *che* et *mcp*) (Chesnokova *et al.*, 1997; Deakin *et al.*, 1999). Les agrobactéries se déplacent alors jusqu'à la blessure par chimiotactisme.

Les bactéries vont par la suite adhérer aux cellules végétales, tout d'abord de manière transitoire grâce à la synthèse d'exopolysaccharides puis de manière durable grâce à la présence de fibres de cellulose (Matthysse, 2014). Lorsqu'une agrobactérie se trouve à proximité des cellules



**Figure 3 : Mise en place de la virulence lors du développement de la galle du collet par *A. fabrum* C58.**

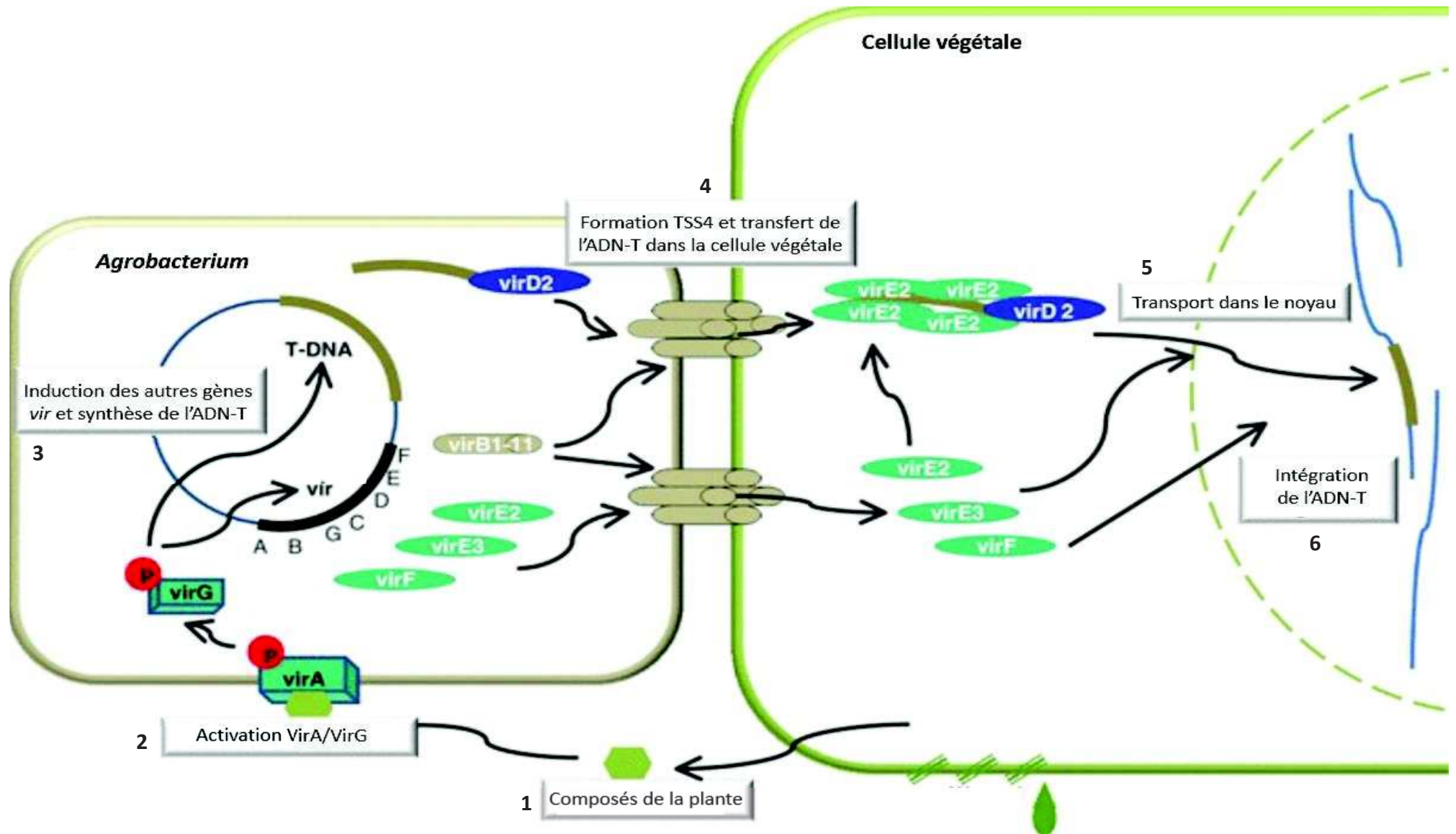
1) blessure, chimiotactisme et adhésion ; 2) activation des gènes de virulence et transfert de l'ADN-T dans la cellule végétale ; 3) synthèse d'hormones et d'opines par la cellule végétale ; 4) prolifération anarchique des cellules végétales et utilisation des opines par les agrobactéries comme source de carbone et d'azote ; 5) activation du système de *quorum sensing* et des gènes de réplication et de conjugaison ; 6) transfert du pTi à d'autres agrobactéries qui deviennent à leur tour virulentes.

végétales, des composés végétaux sont perçus par le système à deux composants VirA-VirG de la bactérie, ce qui permet l'activation de la transcription des opérons *vir* présents sur le pTi (Figure 4). Les protéines Vir synthétisées déclenchent le clivage de l'ADN-T simple brin, qui est un fragment d'environ 22kb pour le pTi de C58, puis son transfert dans la cellule végétale grâce à la formation d'un système de sécrétion de type IV (Figure 3, étape 2 et Figure 4) (Christie *et al.*, 2014; Padavannil *et al.*, 2014; Subramoni *et al.*, 2014). Toujours grâce aux produits des gènes *vir*, l'ADN-T est ensuite dirigé vers le noyau de la cellule et s'intègre dans le génome végétal (Chilton *et al.*, 1977; García-Rodríguez *et al.*, 2006). Le mécanisme d'intégration n'est pas encore clairement défini mais deux hypothèses sont proposées : l'ADN-T pourrait s'intégrer soit suite à la reconnaissance de micro-homologies et à une cassure simple brin, soit suite à une cassure double brin de l'ADN nucléaire végétal (Liang and Tzfira, 2013). Ce transfert d'un morceau d'ADN bactérien dans la cellule végétale est le seul exemple de transfert d'ADN entre organismes de règnes différents.

### II.3.3 Transformation de la cellule végétale

Les différents gènes présents sur l'ADN-T possèdent les éléments génétiques nécessaires pour leur transcription et leur traduction par un système eucaryote (boîte TATA, boîte CAAT, signal de polyadénylation). Ils seront donc exprimés par la cellule végétale. Les oncogènes *iaaM*, *iaaH*, *6b*, *5* et *ipt* présents sur l'ADN-T codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'hormones de type auxine et cytokinine.

Le gène *iaaM* code une tryptophane monooxygénase qui permet la modification du tryptophane en indole-3-acétamide ; ce dernier est ensuite converti par une indoleacétamide hydrolase (codée par le gène *iaaH*) en acide indole 3-acétique (AIA), une phytohormone de type auxine connue pour jouer un rôle essentiel dans de nombreux processus du développement de la plante (Zhao, 2010). Le gène *ipt* code une isopentényl phosphotransferase responsable de la synthèse des cytokinines (Werner and Schmölling, 2009). Le produit du gène *6b* entraîne plusieurs modifications au sein de la cellule végétale dont notamment une perturbation dans le transport polaire de l'auxine dans les feuilles (Kakiuchi *et al.*, 2006), ou encore une accumulation de glucides et de composés phénoliques (Clément *et al.*, 2007). Enfin, le gène *5* code une enzyme permettant la conversion du tryptophane en indole-3-lactate qui est un composé pouvant perturber la perception de l'AIA (Körber *et al.*, 1991). Cette conversion diminuerait la sensibilité aux hormones de type auxine et permettrait ainsi d'augmenter le ratio cytokinine/auxine, induisant une augmentation de la croissance des tiges infectées (Britton *et al.*, 2008). Les effets cumulés de ces perturbations entraînent une



**Figure 4 : Synthèse et intégration de l'ADN-T dans le génome végétal grâce aux protéines Vir.**

1 : Synthèse de composés de la plante suite à une blessure ; 2 : Reconnaissance des composés végétaux par le système à deux composants VirA/VirG ; 3 : Induction de l'expression des opérons *vir* par la protéine VirG phosphorylée ; les protéines de virulence ainsi synthétisées permettent la synthèse de l'ADN-T et la formation d'un relaxosome ; 4 : Fixation des protéines VirE2 sur l'ADN-T qui est ensuite dirigé vers la membrane cellulaire, puis transféré dans la cellule végétale par un complexe de protéines VirB qui forme un système de sécrétion de type 4 (TSS4) ; 5 L'ADN-T est ensuite adressé jusqu'au noyau où il va être libéré de son complexe protéique ; 6 : l'ADN-T est enfin intégré dans le génome de la cellule végétale. D'après Pitzschke et Hirt, 2010.

dédifférenciation et une croissance anormalement élevée des cellules et conduisent ainsi à la formation de la tumeur (Veselov *et al.*, 2003) (Figure 3, étape 4).

D'autres gènes portés par l'ADN-T dirigent la synthèse de molécules spécifiques appelées opines, qui sont des molécules provenant le plus souvent de la condensation d'un acide aminé et d'un glucide (Figure 3, étape 3). Suivant le plasmide Ti, il existe différents gènes de biosynthèse des opines donnant lieu à une gamme variée d'opines (Figure 5) : la nopaline, l'acide nopalinique, l'octopine, la lysopine, l'histopine, l'acide octopinique, la sulfopine, la mannopine, l'acide mannopinique, la cucumopine, la ridéopine, la méthiopine, l'agropine, les agrocinopines A et B, la chrysoptine, l'acetopine, la leucinopine, l'acide agropinique, la glutaminopine, la succinamopine et enfin la vitopine (heliopine) (Chang *et al.*, 1983; Chang and Chen, 1983; Chilton *et al.*, 1984, 1995, 2001; Christou *et al.*, 1986; Coxon *et al.*, 1980; Flores-Mireles *et al.*, 2012; Otten and De Ruffray, 1994; Otten and Szegedi, 1985; Paulus and Otten, 1993; Ridé *et al.*, 2000).

Plusieurs gènes de biosynthèse d'opines peuvent être présents dans un même ADN-T, comme par exemple le pTiC58 qui permet la synthèse de nopaline et d'agrocinopine A et B (Ellis and Murphy, 1981; Piper *et al.*, 1999). La classification des pTi est basée sur le type d'opine dont ils dirigent la synthèse, les plus courants étant les plasmides dits à nopaline et à octopine.

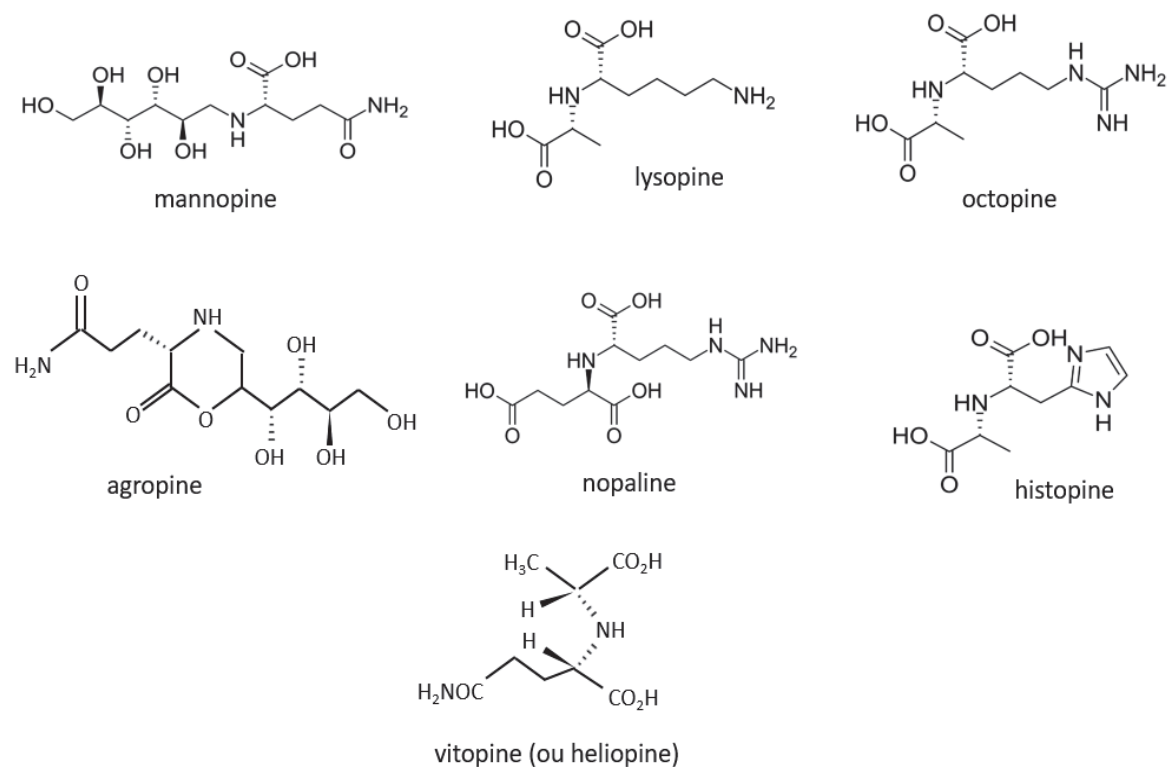


Figure 5 : Représentation de la structure chimique de plusieurs opines parmi les plus courantes.

Les opines produites par la plante sont ensuite utilisées comme source de carbone et d'azote par les bactéries possédant les gènes permettant leur catabolisme (Kim *et al.*, 2008; Kreusch *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 2014) (Figure 3, étape 4). Ces gènes de catabolisme, présents sur le pTi, confèrent un avantage aux bactéries possédant le pTi dans cette niche écologique particulière, c'est le « concept d'opine » (Petit *et al.*, 1983). Ce concept propose qu'un agent pathogène utilise sa plante hôte pour synthétiser des opines et ainsi créer un environnement favorable à son propre développement. Les gènes impliqués dans le catabolisme des opines sont activés uniquement en présence d'opines, par l'intermédiaire de protéines régulatrices (NocR pour la nopaline, OccR pour l'octopine et AccR pour les agrocinopines A et B) (Kim *et al.*, 2008; Marines and White, 1993). En plus d'être utilisées comme ressource nutritive, certaines opines ont également un rôle dans le transfert conjugatif du pTi.

#### 1.3.4 Dissémination de la maladie grâce au transfert du pTi

Les opines dites conjugatives, comme l'agrocinopine ou l'octopine, sont indispensables au transfert du pTi auxquelles elles sont associées. Dans le cas du pTiC58, le régulateur AccR inhibe la transcription des gènes impliqués dans le transport et le catabolisme de l'agrocinopine et inhibe la transcription de l'opéron *arc* où est présent le gène *traR* (Fuqua *et al.*, 1994; Oger and Farrand, 2002) (Figure 3, étape 4). En présence d'agrocinopines, un complexe est formé entre AccR et l'agrocinopine. Sous cette conformation, AccR n'est plus capable d'inhiber la transcription de l'opéron contenant le gène *traR*, il y a donc transcription de cet opéron (Fuqua *et al.*, 1994; Oger and Farrand, 2002). Avec le gène *traI*, le gène *traR* forme un couple de gènes de type *luxI-luxR* permettant la mise en place d'une régulation de type *quorum sensing* (QS). Les molécules signal utilisées par ce type de régulation QS sont des *N*-acyl-homosérines lactones (AHL). Ces molécules sont synthétisées par l'AHL-synthase LuxI et vont former un complexe avec le régulateur LuxR et sous cette forme activer les gènes cibles (Stevens and Greenberg, 1997).

Dans le cas du pTi de *A. fabrum* C58, l'AHL synthase TraI permet la synthèse de *N*-3-oxo-octanoyl-L-homosérine lactone (OC<sub>8</sub>HSL) qui s'associe avec le régulateur TraR pour former le complexe TraR-OC<sub>8</sub>HSL (Zhang *et al.*, 1993). Ce complexe va ensuite réguler les différents gènes cibles en se fixant spécifiquement à une région appelée « boîtes *tra* » (Figure 3, étape 5). Ces boîtes *tra* sont des régions nucléotidiques consensus présentes dans la région promotrice des gènes régulés par ce système de QS. La fixation de TraR-OC<sub>8</sub>HSL sur les boîtes *tra* active la transcription des opérons *tra*, *trb* et *rep*. Parmi les éléments de régulation du QS chez *A. fabrum* C58, nous pouvons citer le gène *traM* qui code un inhibiteur interagissant avec le complexe TraR-OC<sub>8</sub>HSL empêchant ainsi sa fixation aux boîtes *tra* et inhibant de ce fait le QS (Fuqua and Winans, 1994; Lang *et al.*, 2014; Piper *et al.*, 1993). Une souche

inactivée pour *traM* répond à de plus faibles concentrations de AHL, ce qui conduit à un phénotype hyperconjugatif des souches, tandis que la surexpression de *traM* provoque un phénotype opposé (Fuqua *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1999).

En conclusion, en présence d'opine conjugative, le pTi est ainsi transféré vers d'autres agrobactéries qui deviennent à leur tour pathogènes et qui contribueront par la suite au maintien ou à la propagation de la maladie (Kerr, 1969) (Figure 3, étape 6).

## I.4 Autres plasmides chez les *Rhizobiaceae*

### I.4.1 Autres plasmides chez *Rhizobium*

De nombreuses fonctions codées par des plasmides de *Rhizobium* ont été mises en évidence, dont voici quelques exemples. Plusieurs plasmides portent des gènes impliqués dans des voies de biosynthèse, notamment du citrate (Pardo *et al.*, 1994), ou de thiamine (Finan *et al.*, 1986). D'autres encore permettent l'utilisation de nouvelles sources de carbone, que ce soit des métabolites de la plante tels que la rhizopine (Saint *et al.*, 1993), du glycérol (Ding *et al.*, 2012), des composés aromatiques tel que le catéchol ou d'autres composés comme le rhamnose, le sorbitol, le lactose, le malate (Baldani *et al.*, 1992; Oresnik *et al.*, 1998). Des régions permettant la fixation du diazote ont également été retrouvées sur ce type de plasmide chez des *R. etli* ou *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes and McGregor, 1990). Une région appelée *Ips $\beta$*  présente sur le plasmide p42b de *R. etli* CFN42 est indispensable à la synthèse du LPS (García-de los Santos and Brom, 1997). Avec le séquençage récent du génome de nombreuses souches, des informations sont maintenant disponibles grâce aux annotations, sans toutefois que le rôle de ces gènes n'ait été confirmé par des études fonctionnelles.

### I.4.2 Autres plasmides chez *Agrobacterium* et *Allorhizobium*

En plus du pTi, la souche C58 possède un plasmide dit At (pour *Agrobacterium tumefaciens*), le pAtC58. Longtemps défini comme un plasmide cryptique, plusieurs fonctions codées par ce plasmide ont pu être mises en évidence. Ce plasmide semble jouer un rôle de modulateur dans la sévérité de la maladie (taille de la tumeur) même s'il ne porte pas de gènes essentiels à la virulence. En effet, en présence du pAtC58 une plus forte expression des gènes *vir* du pTiC58 a été montrée (Nair, 2003). Cependant lorsqu'une large région de ce plasmide est délétée, les gènes de virulence du pTi voient leur expression augmentée (Morton *et al.*, 2013). Ces deux résultats montrent que l'implication du pAt dans la virulence est complexe et nécessite d'être approfondie. Le pAtC58 possède aussi les gènes



*attKLM* qui permettent de cataboliser le GBL (Gamma-Butyrolactone) produit par la plante. Ces gènes sont induits en présence de GBL, ce qui conduit à la synthèse de la lactonase produite par le gène *attM*. Cette dernière est également impliquée dans la régulation du QS du pTi en modulant la concentration en OC<sub>8</sub>HSL (Carlier *et al.*, 2004). Tout comme le pTi, le pAt utilise un système de sécrétion de type IV (SST4) pour se transférer par conjugaison (Chen *et al.*, 2002). La régulation du transfert du pAtC58 est également dépendante de la protéine régulatrice AccR présente sur le pTi. En effet, AccR inhibe le transfert du pTi en absence d'opines mais empêche également le transfert du pAt en régulant les gènes du SST4. Les deux plasmides étant transférés par conjugaison de manière simultanée, le terme de plasmide compagnon est proposé dans cette étude (Lang *et al.*, 2013).

De nombreuses autres souches d'*A. tumefaciens* possèdent un plasmide qualifié de pAt (Lassalle *et al.*, 2017). Ce nom est souvent attribué au plasmide de plus grande taille pour une souche donnée. Toutefois, la taille et le contenu en gènes de ces plasmides sont très divers et peu de gènes sont parfois conservés entre les pAt de différentes souches, même entre souches phylogénétiquement proches (Lassalle *et al.*, 2015) et semblent partager peu de fonctions avec le pAtC58. Ainsi, la souche *A. fabrum* J07 possède un pAt de 383 kb ayant une taille très inférieure à celui du pAt de C58. Bien que ce pAt de J07 porte une région de 150 kb homologue à une région du pAt de C58, le reste des régions de ce plasmide présente très peu d'homologie avec celui du pAt. Enfin, contrairement au pAt de C58, le transfert de ce pAt est régulé par QS (données de l'équipe). De manière plus globale, et ce qui expliquerait les différences entre ces plasmides, il a été proposé que le plasmide At ait un rôle dans l'adaptation de la bactérie à sa niche écologique (Lassalle *et al.*, 2017).

Chez *Allorhizobium vitis*, les plasmides appelés génériquement pAt sont également retrouvés car cette espèce était encore récemment affiliée au genre *Agrobacterium*. C'est le cas notamment d'*A. vitis* S4 qui possède un pAt se caractérisant par sa taille importante de 631kb et par la présence de nombreux ABC transporteurs comme le pAt de C58. Toutefois, seule une centaine de gènes du pAt de S4 ont une identité supérieure à 35% avec des gènes du pAt de C58. A notre connaissance, aucun rôle ou fonction particulière n'a été décrit pour le pAt d'*A. vitis* S4.

Des plasmides appelés pTar ou pTr (pour acide tartrique) sont dénommés ainsi car ils confèrent la capacité à métaboliser l'acide tartrique (voir paragraphe II.5.2.2). Cette fonction plasmidique est retrouvée chez de nombreuses souches d'*A. vitis* et chez certaines souches d'*A. tumefaciens* (Lowe *et al.*, 2009). La capacité à utiliser l'acide tartrique, acide organique le plus abondant de la vigne, comme source de carbone confère un avantage compétitif dans la vigne, ce qui explique la présence de ces plasmides chez des souches isolées de la vigne (Salomone *et al.*, 1998a). En dehors des pTi et des pTar, très peu d'informations sont disponibles sur les autres plasmides de

cette espèce, bien que certains pourraient avoir un rôle important, comme c'est le cas des plasmides des autres genres de la famille des *Rhizobiaceae*.

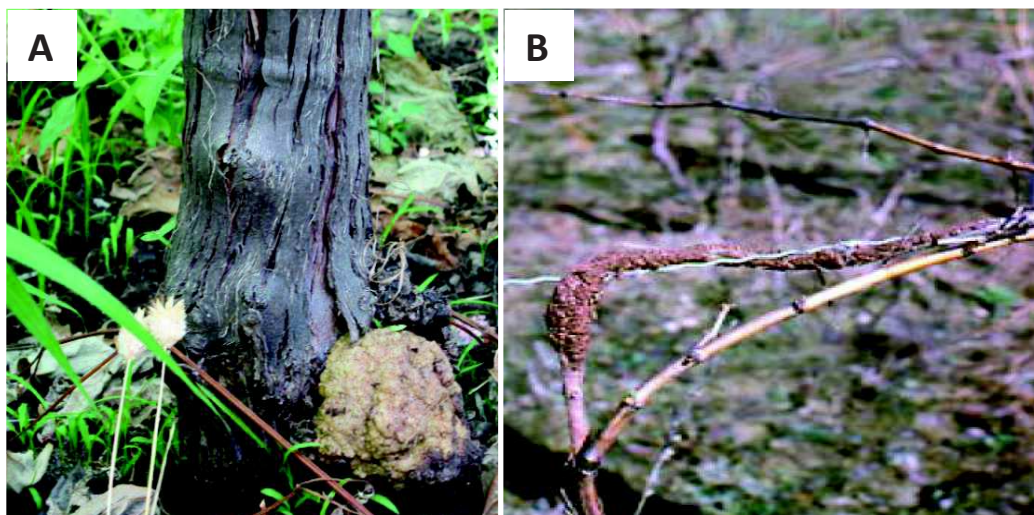
## II. *Allorhizobium vitis* : détection, épidémiologie et spécificités

### II.1 La galle du collet chez la vigne : agent causal et historique

#### II.1.1 La galle du collet chez la vigne

La galle du collet représente la bactériose la plus répandue chez la vigne (Burr *et al.*, 1998a). Que ce soit pour la production de raisin de table, de vin ou d'autres dérivés, la viticulture représente un des domaines agricoles les plus importants au monde en termes de superficie de culture mais également en termes économiques. La galle du collet chez la vigne se caractérise principalement par la formation d'une tumeur au niveau du collet de la plante ainsi que par l'apparition de nécroses surtout au niveau des racines. Elle provoque une diminution de la vigueur des pieds de vigne et une réduction de la production de raisin (Schroth, 1988) ; elle peut également entraîner la mort de jeunes pieds de vigne (Burr *et al.*, 1998b). Cette maladie a été mise en évidence dans une trentaine de pays à travers le monde et l'agent bactérien responsable de cette maladie a été caractérisé.

Dans la grande majorité des cas, cette maladie est induite par des souches d'*Allorhizobium vitis* mais des souches d'*A. tumefaciens* peuvent également en être à l'origine (Abdellatif *et al.*, 2013; Genov *et al.*, 2015; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). La vigne peut donc être infectée par des *A. vitis* ou des *A. tumefaciens* ; en revanche, les souches d'*A. vitis* ont été isolées uniquement de tumeurs de vigne.



**Figure 6 : Galle du collet provoquée par *A. vitis* sur un pied de vigne.**

La photographie A a été prise lors d'une campagne d'échantillonnage dans un vignoble de la région de Meknès au Maroc en juillet 2015 (C. Lavire). La photographie B est extraite de Burr *et al.*, 1998.

## II.1.2 Historique et état actuel de la taxonomie des *Allorhizobium vitis*

Chez la vigne, la galle du collet est également appelée maladie du « broussin de la vigne », terme provenant de la première observation des symptômes en France en 1853 par Fabre et Dunal dans un écrit intitulé « Observations sur les maladies régnantes de la vigne ». Dans cet article, les auteurs décrivent les symptômes comme étant le développement de « broussins », qui sont des excroissances ligneuses, sur les tiges de vignes (Fabre et Dunal, 1853 cité dans Hedgcock, 1910) (Figure 6). Dès 1880 plusieurs rapports scientifiques font mention de symptômes similaires aux Etats Unis, puis de nombreux autres constats de la maladie sont répertoriés à travers le monde (Hedgcock, 1910).

En 1885, Corvo est le premier à mettre en évidence des bactéries qui seraient à l'origine du broussin de la vigne sans pour autant leur donner un nom. Il faut attendre 1909 pour que Townsend dans son article « A bacterial gall of the daisy and its relation to gall formations on other plants. » identifie cette bactérie comme étant *Bacterium tumefaciens*. Cette bactérie est déjà connue depuis environ un an pour provoquer une maladie aux symptômes similaires chez d'autres espèces de plantes (Hedgcock, 1910). La classification et la nomination des *Agrobacterium* ont beaucoup évoluées au cours du temps et ce dès que la communauté scientifique a suspecté la diversité qui se dissimulait sous ce nom. Mais le faible nombre de souches isolées et les techniques de l'époque ne permettaient pas d'effectuer une identification précise des espèces. Les premières méthodes de différenciation étaient donc uniquement basées sur la pathogénie des souches : *A. radiobacter* n'induit pas de symptômes, *A. tumefaciens* induit la galle du collet, *A. rhizogenes* provoque la maladie du chevelu racinaire et *A. rubi* provoque la « galle de la canne » sur les plantes du genre *Rubus* (Holmes, 1988).

Toujours en conservant les critères de pathogénicité les biovars 1, 2 et 3 ont ensuite été créés. Les *A. vitis* sont donc, à cette époque, classées comme *A. tumefaciens* biovar 3 (Kerr and Panagopoulos, 1977; Süle, 1978). Un biovar, ou parfois appelé biotype, est une sous-catégorie de l'espèce établie sur des critères biochimiques et physiologiques avec, dans le cas des biovars, des critères additionnels de pathogénie. Bien que la nomenclature ait par la suite évolué, cette appellation *A. tumefaciens* biovar 3 est encore retrouvée dans certains articles récents.

En prenant en compte de nouveaux critères biochimiques et génomiques, notamment le pourcentage d'hybridation ADN-ADN entre les différentes souches, il apparaît que les souches du biovar 3 se différencient des autres biovars pour représenter une espèce à part entière ; le nom d'*Agrobacterium vitis* est alors proposé (Ophel and Kerr, 1990). Dès 1993, les premières études basées sur le gène codant l'ARNr 16S montrent que ces souches sont phylogénétiquement plus proches de certaines souches de *Rhizobium* que des *A. tumefaciens* biovar 1 (Willems and Collins, 1993; Yanagi and Yamasato, 1993). En 2001, une étude basée sur l'analyse des séquences du gène codant l'ARNr

16S intègre toutes les bactéries appelées *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium* et *Ensifer* dans un même genre bactérien appelé alors *Rhizobium* et modifie donc le nom d'*Agrobacterium vitis* en *Rhizobium vitis* (Young *et al.*, 2001). En 2003, une nouvelle étude remet en question le regroupement dans le même genre de toutes ces bactéries (Farrand, 2003). Via des critères biochimiques et génomiques, il est démontré que les biovars 1 et 3 font bien partie d'un genre différent des autres *Rhizobium* qui est à nouveau nommé le genre *Agrobacterium*. Le nom *Agrobacterium vitis* est donc de nouveau utilisé.

Sachant que le gène codant l'ARNr 16S est parfois hautement conservé entre souches appartenant à différentes espèces, il a été montré que l'utilisation de MLSA (*multilocus sequence analysis*) était mieux adaptée à l'étude de souches ou d'espèces phylogénétiquement proches (Farrand, 2003; Martens *et al.*, 2007). Une étude récente a permis de réaliser une phylogénie de la famille des *Rhizobiaceae* par une approche de MLSA en ciblant 6 gènes de ménage (*atpD*, *glnA*, *recA*, *glnII*, *rpoB* et *thrC*) chez 114 souches appartenant principalement aux genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*. Cette étude a conduit à l'apparition d'un nouveau genre, le genre *Neorhizobium*, à la reclassification de *Rhizobium rhizogenes* en *Agrobacterium rhizogenes* et enfin à la reclassification d'*Agrobacterium vitis* en *Allorhizobium vitis* (Mousavi *et al.*, 2014). Un autre argument appuyant la séparation *A. tumefaciens* et *A. vitis* est la présence d'un chromide linéaire chez les bactéries du genre *Agrobacterium* via l'acquisition du gène *telA* dans la famille des *Rhizobiaceae* (Figure 7). Le gène *telA* code une protéomérase impliquée dans la linéarisation par coupure double brin de l'ADN du chromide caractéristique de cette famille (Slater *et al.*, 2009). La présence de ce gène et donc d'un chromide linéaire chez les *Agrobacterium* permet donc de les différencier des autres genres qui eux possèdent un chromide circulaire (et donc ne possédant pas le gène *telA*) comme *Allorhizobium vitis* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2014).

Aujourd'hui nous pouvons encore retrouver différentes appellations dans la bibliographie (*Agrobacterium tumefaciens* biovar 3, *Agrobacterium vitis* et *Rhizobium vitis*) mais tout au long de ce document nous utiliserons le terme *Allorhizobium vitis*.



## II.2 Habitats, détection et typage des *A. vitis*

### II.2.1 Les différents habitats d'*A. vitis*

Comme de nombreuses bactéries phytopathogènes, *A. vitis* se développe principalement au sein de sa plante hôte et peut parfois se développer dans d'autres biotopes ou survivre dans le sol lorsque des conditions favorables sont réunies (Burr and Katz, 1983; Schroth *et al.*, 1971; Spiers, 1979).

#### II.2.1.1 Un mode de vie endophyte

Contrairement aux *Agrobacterium*, *A. vitis* a la particularité de pouvoir se développer de manière endophyte dans la vigne (Lehoczky, 1968). Les *A. vitis* sont notamment présentes dans le xylème ce qui permet également aux bactéries de se déplacer (Burr *et al.*, 1998b). D'autres études rapportent la présence de la bactérie dans d'autres parties de la vigne, notamment dans le phloème, ou encore à la surface des feuilles (Johnson *et al.*, 2016). Lorsque la plante est en dormance il a été montré la présence d'*A. vitis* dans les tissus sous l'écorce ou encore dans les bourgeons (Süle *et al.*, 1986 et Jager *et al.*, 1989 cités dans Burr and Otten, 1999; Orel *et al.*, 2017).

La présence des *A. vitis* est mise en évidence dans les « saignements de la vigne » (*bleeding grapevine*) (Burr and Katz, 1983; Lehoczky, 1968, 1971). Pour réaliser cet isolement, il faut récolter des pieds de vignes entre mars et mai (hémisphère nord), lorsque la croissance des racines redémarre au début du printemps, ce qui entraîne une reprise de l'activité vasculaire et donc une montée du xylème des racines vers le reste de la plante. La densité et la répartition de la population d'*A. vitis* dans la vigne pendant l'année est influencée par les changements physiologiques de la plante ; la densité est en effet plus importante dans l'ensemble de la plante en hiver qu'en été, avec une augmentation en automne. La présence d'*A. vitis* dans les tissus de la plante (endophyte) est aussi liée à la production d'opines. En effet, lorsqu'il y a production d'opines, la population d'*A. vitis* va rester concentrée autour de la tumeur ; à l'automne, l'arrêt de la production d'opines est corrélé au déplacement de la bactérie vers d'autres parties de la vigne. Après une infection par *A. vitis*, réalisée au niveau de bourgeons aériens, il a été montré que cette bactérie se déplace à une vitesse de 5mm par jour (Bauer *et al.*, 1994).

Aucun déterminant génétique impliqué dans le trait de vie endophyte n'a pour l'instant été mis en évidence.

### II.2.1.2 Présence d'*A. vitis* dans d'autres biotopes

*A. vitis* a été détectée dans de nombreux échantillons de sols mais uniquement lorsque la présence de débris de vigne a pu être observée, jamais à partir de sols nus (Bishop *et al.*, 1988; Burr and Katz, 1983; Burr and Reid, 1995). Il a été montré que des isolats d'*A. vitis* pouvaient être isolés de sols au moins 2 ans après l'arrachage des pieds de vignes. La présence de vignes contaminées pourrait donc entraîner une contamination pérenne du sol (Burr and Reid, 1995). La grande majorité des souches isolées à partir de ces sols contaminés possédaient encore le pTi et pouvaient donc entraîner une nouvelle contamination. Cette survie est probablement due à la réserve de substrats assimilables que sont les débris de vigne pour les *A. vitis*.

La rhizosphère localisée au niveau des pieds de vigne est également un biotope propice pour les *A. vitis* notamment grâce à la présence de nombreux exsudats sécrétés par la vigne. De plus, les souches d'*A. vitis* ont la capacité d'entraîner la formation de nécroses sur les racines, ce qui entraîne la libération dans la rhizosphère de nombreux composés (Bishop *et al.*, 1988; Burr *et al.*, 1987; Burr and Otten, 1999).

Des souches d'*A. vitis* ont également été retrouvées dans des vignes sauvages de l'espèce *Vitis riparia* (Burr *et al.*, 1999). Les échantillonnages ont été réalisés à différentes distances de vignobles, avec notamment une zone d'échantillonnage situé à plus de 150km du vignoble le plus proche. Parmi les souches isolées dans cette première étude aucune ne possédait de pTi contrairement à une étude plus récente qui a permis d'isoler des souches tumorigéniques de vignes sauvages (Orel *et al.*, 2017b).

## II.2.2 Techniques de détection d'*A. vitis*

### II.2.2.1 Détection avec une étape de mise en culture

Plusieurs études ont tout d'abord mis au point des méthodes de détection de souches connues d'*A. vitis* en ciblant une région particulière d'ADN via l'utilisation d'amorces spécifiques (Burr and Reid, 1995; Irelan and Meredith, 1996a; Kaufmann *et al.*, 1996; Momol *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1993). Afin d'augmenter la sensibilité de détection des *A. vitis* présentes dans la vigne, une méthode d'immunocapture utilisant des anticorps polyclonaux a été mise au point (Kaufmann *et al.*, 1996). Ces méthodes, bien qu'efficaces sur les souches connues, n'ont été testées que sur un faible nombre de souches. En 2002, les premières amorces spécifiques permettant d'identifier des souches d'*A. vitis* inconnues provenant de vigne contaminées suite à un isolement sur milieu sélectif ont été publiées (Szegedi and Bottka, 2002).



Actuellement des milieux permettant la sélection uniquement des *Agrobacterium*, ou même la sélection d'un biovar d'*A. tumefaciens* sont encore utilisés. Le milieu 3DG et le milieu Roy and Sasser permet notamment d'isoler les *A. vitis* (Brisbane and Kerr, 1983; Roy and Sasser, 1983). La sélection peut être encore améliorée avec l'ajout de tellurite qui est composé toxique pour de nombreuses bactéries mais auquel les *Rhizobiaceae* sont résistantes (Shams *et al.*, 2012). L'avantage de la procédure de mise en culture est de pouvoir obtenir des isolats qui peuvent être étudiés par la suite, mais surtout de pouvoir établir un lien entre une identification taxonomique de l'isolat (chromosome) et la présence voir le typage du pTi.

#### II.2.2.2 Détection directement sur un échantillon de vigne ou du sol

La première méthode de détection ne passant pas obligatoirement par une phase de croissance sur gélose a été développée en 1995 (Eastwell *et al.*, 1995). L'extraction de l'ADN a été optimisée afin d'extraire plus spécifiquement l'ADN bactérien et des amorces spécifiques visant les gènes *virA*, *pehA* et *6A* sont utilisées. Cette nouvelle approche de détection sans étape de culture est plus rapide, le coût engendré est plus faible et cela permet la détection d'*A. vitis* présentes dans la vigne ou dans le sol mais ne pouvant pas survivre à une étape de croissance sur gélose (Eastwell *et al.*, 1995).

Des méthodes de MCH (*Magnetic Capture Hybridization*) qui consistent à utiliser des billes magnétiques possédant une sonde spécifique afin d'accrocher l'ADN par hybridation ont également été mise au point (Johnson *et al.*, 2013). Cette méthode couplée à une détection par PCR ou RT-PCR avec des amorces spécifiques permet d'augmenter l'efficacité de détection (Orel *et al.*, 2017a)..

Avec l'amélioration des méthodes de détection, des *A. vitis* ont été détectés dans 17% d'échantillons de tiges, dans 52% des échantillons de méristèmes et dans 37% de ceux prélevés à la surface de tiges de vignes infectées. Des isolats d'*A. vitis* ont été détectés sur seulement 7% des tiges désinfectées contre 37% des tiges non désinfectées indiquant un mode de vie épiphyte d'*A. vitis* (Johnson *et al.*, 2016). Des analyses de microbiotes de sols, de racines et de tiges de plants de vigne ont montrées qu'*A. vitis* était toujours dans les espèces majoritaires (Faist *et al.*, 2016).

#### II.2.3 Typage d'*A. vitis*

Dans un premier temps, l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou la recherche des différences dans la composition des acides gras, dans le type de LPS ou encore dans la capacité à utiliser certaines sources de carbone ont été utilisées afin de différencier les *A. vitis* des *A. tumefaciens*



**Figure 8 : Planisphère montrant les pays dans lesquels des souches d'*A. vitis* ont été isolées.**

Liste non exhaustive de la provenance des souches d'*A. vitis*. **Afrique du Sud** (Burr *et al.*, 1997, 1998a), **Italie, Moldavie, Monténégro, Maroc et Pologne** (Bini *et al.*, 2008(a), 2008(b); Kuzmanović *et al.*, 2015), **Serbie** (Bini *et al.*, 2008(a); Kuzmanović *et al.*, 2014), **Russie, Hongrie et Bulgarie** (Bini *et al.*, 2008(b); Szegedi E. *et al.*, 1988, thèse Malenin, 1971, Ignatof *et al.*, 2016), **Australie** (Ophel and Kerr, 1990; Szegedi *et al.*, 1988a), **Etats unis** (Burr *et al.*, 1997; Orel *et al.*, 2017), **Egypte** (Tolba and Zaki, 2011), **Japon** (Burr *et al.*, 1998a; Kawaguchi *et al.*, 2008; Kawaguchi and Inoue, 2012), **Grèce et Iran** (Kerr and Panagopoulos, 1977), **Tunisie** (Abdellatif *et al.*, 2013; Chebil, 2013), **Israël** (Burr *et al.*, 1998a; Haas *et al.*, 1991), **Espagne** (Burr *et al.*, 1998a; Ponsonnet and Nesme, 1994), **France** (Paulus *et al.*, 1989; Ponsonnet C. and Nesme X., 1994; Ridé *et al.*, 2000; Szegedi and Bottka, 2002; thèse E. Bien, 1988), **Turquie** (Argun *et al.*, 2002), **Nouvelle Zélande** (Spiers, 1979), **Allemagne** (E. Bien, 1988 (thèse); Burr *et al.*, 1998), **Chine et Chili** (Burr *et al.*, 1998a).

(Bouzar H. *et al.*, 1993 ; (Bishop *et al.*, 1989; Weibgen *et al.*, 1993). Par la suite, la détermination du pourcentage d'hybridation ADN-ADN afin de différencier les souches d'*A. vitis* des autres espèces a été utilisée avec succès. Le pourcentage d'hybridation maximum entre les souches d'*A. vitis* testées et les autres espèces d'*Agrobacterium* étant de 47% contre 78% à 90% entre les souches d'*A. vitis* (Ophel and Kerr, 1990). Le séquençage d'une partie du gène codant l'ARNr 16S, des amorces spécifiques ciblant une région de l'ADN-T et des techniques de PCR-RFLP ou de RAPD ont également été utilisées (Irelan and Meredith, 1996b; Momol *et al.*, 1998; Ponsonnet and Nesme, 1994; Sawada *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1993).

Actuellement, la MLSA et l'utilisation d'amorces spécifiques sont les méthodes les plus couramment utilisées pour réaliser le typage des souches d'*A. vitis* (Kuzmanović *et al.*, 2015; Mousavi *et al.*, 2014, 2015; Shams *et al.*, 2013). Il a été notamment défini pour le gène *recA* des amorces amplifiant soit l'ensemble des *Rhizobiaceae* soit encore spécifiquement les souches appartenant à l'espèce *A. vitis* (Shams *et al.*, 2012, 2013). De la même manière il existe des amorces ciblant le pTi, par exemple le gène *virC*, permettant ainsi un typage du pTi (Kumagai and Fabritius, 2008; Kuzmanović *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2009; Sawada *et al.*, 1995; Suzaki *et al.*, 2004). Une PCR multiplex peut également être réalisée afin d'augmenter la précision de typage (Kuzmanović *et al.*, 2016).

## II.3 Epidémiologie et diversité

### II.3.1 Epidémiologie

De nombreux articles rapportent la présence de vignobles contaminés à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et dans la première moitié du XX<sup>e</sup> en France et aux Etats-Unis, alors que de nos jours cette maladie n'est que peu présente dans ces pays. Dès les premières études sur la galle du collet sur vigne, il est apparu une diversité au niveau de l'origine géographique des souches isolées ; mais également une diversité des souches détectées au sein d'un même vignoble (Hedgcock, 1910). Cet agent pathogène est présent sur tous les continents et détecté actuellement dans une trentaine de pays (Figure 8). L'augmentation du nombre de laboratoires travaillant sur la vigne dans certains pays (notamment en Europe de l'Est et en Afrique du Nord) a révélé plus récemment la présence d'*A. vitis* dans ces pays. Il est probable que cet agent pathogène était déjà présent depuis longtemps dans ces régions mais la contamination de ces vignobles suite à l'importation de pieds de vignes provenant de vignobles contaminés est également envisageable.

Au Maroc, les premiers symptômes sur les vignes de la galle du collet ont été détectés en 2008 et à ce jour 11 vignobles sur 15 dans la région de Méknès-Fes sont affectés. En Tunisie, la galle du collet

sur la vigne a été détectée pour la première fois en 2011 avec l'isolement à la fois de souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens* pathogènes. Des cas ont été détectés sur plants d'environ 1 ou 2 ans dans différentes régions mais avec un faible pourcentage de vignes infectées (9,72%) (Abdellatif *et al.*, 2013; Chebil, 2013; Chebil *et al.*, 2013).

### II.3.2 Diversité génétique

La plupart des études de diversité se sont intéressées à l'ensemble des *Agrobacterium* et à différencier les biovars ou espèces entre elles, mais peu d'études ont porté sur la diversité des souches au sein d'*A. vitis*. Les techniques permettant ce type d'étude sont des approches de MLSA ou portant sur le génome entier des souches (Mousavi *et al.*, 2014).

Cette diversité des souches d'*A. vitis* a récemment été étudiée grâce à des techniques de RAPD, de RFLP ainsi que par l'utilisation de 11 paires d'amorces spécifiques ciblant des gènes du chromosome et du pTi. Une diversité importante au sein des *A. vitis* a ainsi été mise en évidence ainsi que l'existence de groupes de souches dont la proximité phylogénétique révèle une origine commune récente. Pour certains groupes de souches ayant des caractéristiques chromosomiques communes, un certain type de pTi est parfois retrouvé préférentiellement. Il existerait donc une relation entre fond chromosomique et pTi (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2015, 2016).

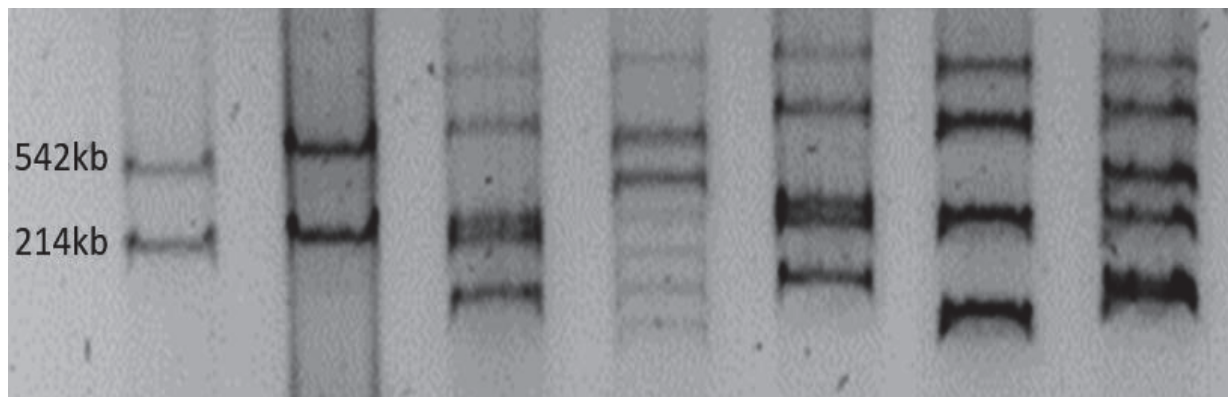
### II.3.3 Diversité plasmidique

Tout comme c'est le cas chez les *A. tumefaciens*, les pTi des *A. vitis* sont classés en fonction du type d'opines qu'ils permettent de synthétiser (Fournier *et al.*, 1993; Nuenen *et al.*, 1993; Otten *et al.*, 1993). L'organisation et la composition en gènes des pTi sont relativement proches de celles des pTi retrouvés chez les *A. tumefaciens*. En plus des types de pTi couramment retrouvés chez *A. tumefaciens* comme ceux à octopine et nopaline, un autre type permettant la synthèse de vitopine est fréquemment présent (Figure 5) (Dessaux *et al.*, 1998; Szegedi *et al.*, 1996; Szegedi, 2003a). Les gènes présents sur ces plasmides, leur organisation ainsi que la présence de certaines régions en fonction des types de pTi nous permettent d'observer une grande diversité au sein d'une même catégorie de plasmide (Otten and De Ruffray, 1994; Szegedi *et al.*, 1996). Le type d'opine étant le facteur permettant d'identifier le type de pTi, cette région a été largement étudiée mais peu d'informations sont disponibles sur la potentielle diversité des autres régions des pTi retrouvées chez les *A. vitis*.

Des plasmides portant une région permettant l'utilisation de l'acide tartrique (pTar) sont fréquemment retrouvés chez les souches d'*A. vitis*. Des différences dans le contenu en gènes des

régions de catabolisme de ce composé ont pu être observées mais ce sont les seules informations disponibles indiquant des différences entre les pTar (Lowe *et al.*, 2009; Szegedi *et al.*, 1992; Szegedi and Otten, 1997). Les particularités des pTi et pTar seront détaillées par la suite (cf parties II.5 et II.6).

Les souches d'*A. vitis* possèdent un nombre de plasmides très variable, allant de 0 à 6 ; la souche *A. vitis* S4 par exemple possède 5 plasmides dont le pTi et le pTar (Slater *et al.*, 2009). L'analyse du contenu plasmidique, via la technique des gels Eckhardt, a été réalisée sur de nombreuses souches présentes dans notre collection d'équipe et a révélé une grande diversité en nombre et en taille (Figure 9, données non publiées). En revanche, il n'existe pas d'information permettant de corrélérer cette diversité ou certains de ces plasmides à une adaptation particulière d'*A. vitis* à la vigne ou à d'autres environnements.



**Figure 9 : Profil plasmidique mettant en évidence la diversité plasmidique de souches d'*A. vitis* isolées de la vigne au Maroc.**

La première colonne montre les deux plasmides de la souche modèle *A. fabrum* C58 puis ceux de différentes souches d'*A. vitis* issues de tumeurs récoltées sur des plants de vigne au Maroc. Ce type d'analyses permet également d'estimer de façon assez précise la taille des plasmides grâce à la taille connue des plasmides de souches modèles (données de l'équipe non publiées).

## II.4 Méthodes de lutte

La galle du collet étant la maladie bactérienne de la vigne la plus répandue, sévissant depuis une longue période et causant d'importantes pertes économiques, des moyens de luttés ont été recherchés et les recherches continuent encore. Des rapports épidémiologiques de la galle du collet dans certaines régions montrent que lorsqu'un vignoble ou une pépinière est contaminé, un pourcentage parfois très important des vignes peut être infecté, et de manière rapide. En effet, lors de la taille de vigne, la maladie peut rapidement se propager car en plus de créer des blessures qui

sont des portes d'entrées aux bactéries, le matériel servant à la taille, s'il n'est pas désinfecté après la taille de chaque pied de vigne, est un très bon vecteur de dissémination (Lehoczky, 1971).

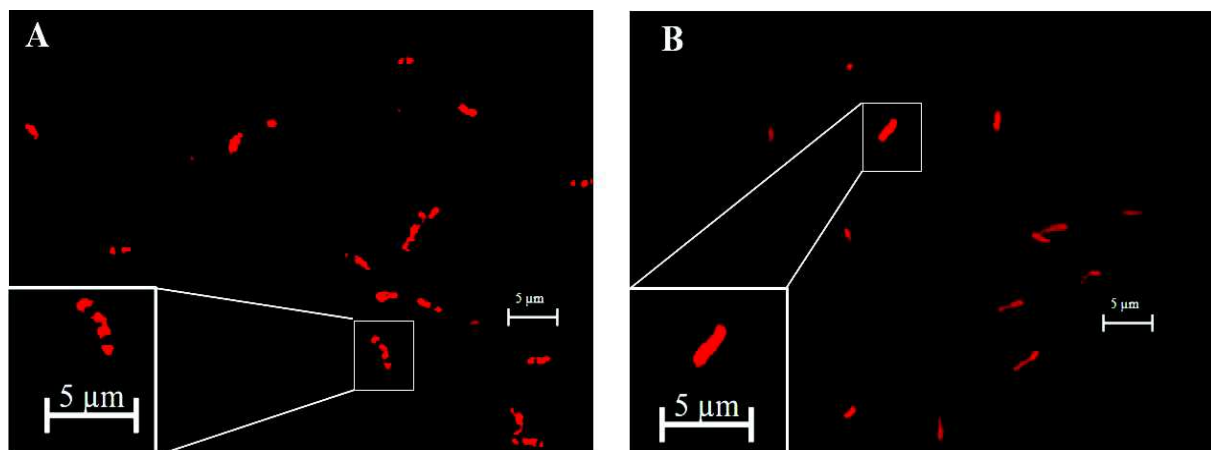
La présence et le maintien de la bactérie dans un sol où des plants contaminés étaient présents peut également conduire à la contamination de pieds de vignes (Burr *et al.*, 1983; Schroth *et al.*, 1971; Spiers, 1979).

#### II.4.1 Traitements

Au-delà des techniques de lutte traditionnellement utilisées en viticultures telles que l'utilisation d'intrants agricoles (ex : bouillie bordelaise), des méthodes pour combattre la galle du collet ont été mise en place.

L'un des premiers moyens de traitement a été de plonger des tiges de vigne en dormance dans de l'eau à 50°C ou 56°C pendant 30 min avant de les planter ce qui permet d'éliminer partiellement les *A. vitis* (Burr *et al.*, 1989; Burr and Otten, 1999). Si ce traitement semble efficace sur les *A. vitis*, il semble toutefois ne pas l'être sur *A. tumefaciens*. En fonction des variétés de vigne, du climat de la région et du support sur lequel est fait le traitement (âge et vigueur de la vigne avant mise en dormance), il peut avoir un impact négatif sur la physiologie de la plante (Burr *et al.*, 1989; Waite and Morton, 2007).

Les huiles essentielles sont connues pour avoir un effet antimicrobien sur de nombreux pathogènes ou phytopathogènes et notamment sur *A. tumefaciens* (Badawy and Abdelgaleil, 2014).



**Figure 10 : Effet d'un mélange des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et *Thymus vulgaris* sur *A. vitis* S4.**

La souche d'*A. vitis* S4 exprime de manière constitutive la protéine DsRed, l'observation a été réalisée en microscopie confocale une heure après exposition de *A. vitis* S4 à un mélange des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et *Thymus vulgaris* (A) ou sans exposition aux huiles essentielles (B) d'après Habbadi *et al.*, 2017.

De nombreuses huiles essentielles ont montré un effet inhibiteur sur des cultures *in vitro* d'*A. vitis* (Figure 10). Les huiles essentielles d'*Origanum compactum* et de *Thymus vulgaris* induisent l'inhibition la plus importante et ont été testées avec succès *in planta* (Habbadi *et al.*, 2017).

## II.4.2 Biocontrôle

La souche *A. rhizogenes* K84 via la synthèse d'agrocine est bien connue pour inhiber *A. tumefaciens* ; cette souche a été utilisée de manière commerciale pour lutter contre *A. tumefaciens* (Pesenti-Barili *et al.*, 1991; Schroth *et al.*, 1971; Vicedo *et al.*, 1992). Toutefois, cette souche n'a en revanche pas d'effet sur *A. vitis* (Kawaguchi *et al.*, 2008).

### II.4.2.1 La souche F2/5

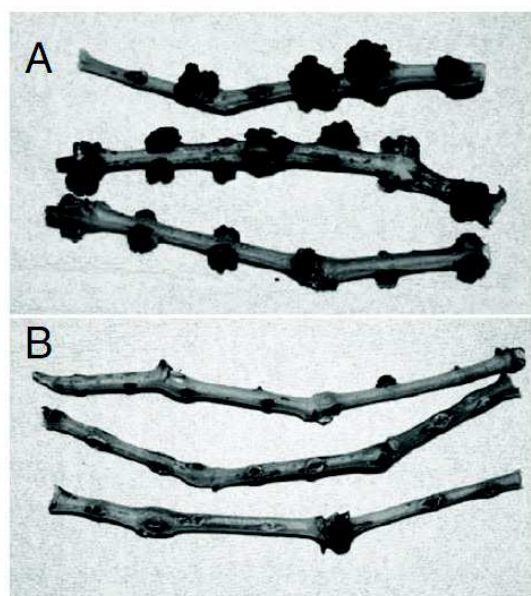
La souche *A. vitis* F2/5 (dépourvue de pTi) possède une activité de biocontrôle notamment en diminuant le transfert de l'ADN-T du pTi sans toutefois diminuer la croissance du pathogène (Burr *et al.*, 1997; Kaewnum *et al.*, 2013; Staphorst *et al.*, 1985). Plus récemment, il a été confirmé que cette capacité de biocontrôle n'est retrouvée que chez la vigne et ne fonctionne pas sur d'autres plantes infectées par *A. vitis* en laboratoire telles que le tabac. Il a enfin été découvert que deux synthétases de peptides non ribosomiques (F-avi3342 et F-avi5730) et une synthase de polycétide (F-avi4330) sont indispensables à la capacité de biocontrôle de cette souche (Kaewnum *et al.*, 2013; Zheng and Burr, 2016). Les produits de ces gènes sont également impliqués dans la formation des nécroses et dans la réponse hypersensible provoquée par la souche F2/5. Ces nécroses induites au niveau des racines sont un problème quant à l'utilisation de cette souche en tant qu'agent de biocontrôle (Herlache *et al.*, 2001). Plusieurs études de mutagenèse dirigée ont donc été réalisées sur cette souche afin de supprimer l'induction de ces nécroses (Carle *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2012; Zheng and Burr, 2013) (cf partie II.6).

Afin d'améliorer la capacité de biocontrôle de la souche F2/5, celle-ci a également été modifiée en y ajoutant un plasmide stable permettant la synthèse de trifolitoxine qui est un peptide ayant un rôle bactériostatique. La co-inoculation de cette souche modifiée avec une *A. vitis* pathogène entraîne une diminution de la taille des tumeurs d'environ 70% (Herlache and Triplett, 2002). L'utilisation d'un organisme génétiquement modifié comme agent de biocontrôle dans les vignobles soulève toutefois la question de l'utilisation des organismes génétiquement modifiés au champ. Contrairement à la souche biocontrôle *A. rhizogenes* K84, la souche F2/5 peut potentiellement recevoir un pTi par conjugaison ce qui la rendrait pathogène à son tour et limite sa possible utilisation (Vicedo *et al.*, 1992, p. 84).

#### II.4.2.2 Autres souches d'*A. vitis* à potentiel de biocontrôle

Plusieurs souches d'*A. vitis* ont des effets de biocontrôle par diminution de l'incidence et de la taille des tumeurs lors de leur application au niveau du site d'infection ou au niveau des racines de jeunes plants (Kawaguchi et al., 2005a, 2007). Des tests d'inhibitions *in vitro* ont montré que ces souches produisent une molécule inhibitrice des *A. vitis* pathogènes (Figure 11) (Kawaguchi et al., 2005a). D'autres souches permettent de diminuer l'incidence et la taille des tumeurs mais cette fois par diminution du pouvoir pathogène (Kawaguchi, 2015; Kawaguchi and Inoue, 2012). Parmi ces dernières, ARK-1 ne provoque pas de nécroses sur des explants de vignes (Kawaguchi, 2013), ce qui est le seul et unique cas connu pour une *A. vitis* référencée.

La souche E26 a également un effet de biocontrôle sur des souches pathogènes d'*A. vitis*. Cet effet est lié à la synthèse d'un composé antibactérien qui provoque une inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2003). L'originalité de cette souche est qu'elle possède un pTi dépourvu des gènes *virA* et *virG* ainsi que des gènes *iaaH* et *iaaM*, l'empêchant d'induire la formation de tumeurs et de recevoir un autre pTi (Bi *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2009). Certaines souches isolées de *Vitis riparia* sont également capables de diminuer la formation de galle du collet mais les mécanismes impliqués n'ont pas été étudiés (Burr *et al.*, 1999).



**Figure 11 : Effet de la souche *A. vitis* VAR03-1 sur la formation de tumeurs chez la vigne.**

A: Vigne inoculée avec la souche G-Ag-27 comme contrôle positif

B: Vigne inoculée avec un mélange de la souche G-Ag-27 et de la souche VAR03-1 au même moment, au ratio 1 :1

La photographie a été prise 3 mois après inoculation. D'après Kawagushi *et al.* 2005

#### II.4.2.3 Autres espèces bactériennes à potentiel de biocontrôle

Trois souches endophytes isolées de pommiers, *Pseudomonas fluorescens* 1100-6, *Bacillus subtilis* EN63-1, et *Bacillus spp.* EN71-1, ont été étudiées pour leur activité de biocontrôle. Les trois souches permettent une réduction du nombre et de la taille des galles sur des tiges de tabac par



inhibition des *A. vitis* (Eastwell *et al.*, 2006). Une autre étude a montré que *Rahnella aquatilis* HX2 possède également des caractéristiques de biocontrôle en réduisant l'incidence et la taille des tumeurs sur la vigne probablement grâce à un composé inhibiteur des *A. vitis* (Chen *et al.*, 2007).

A notre connaissance, il n'y a actuellement aucune utilisation de souches à activité biocontrôle dans des vignobles ou des pépinières, et aucune n'est disponible commercialement.

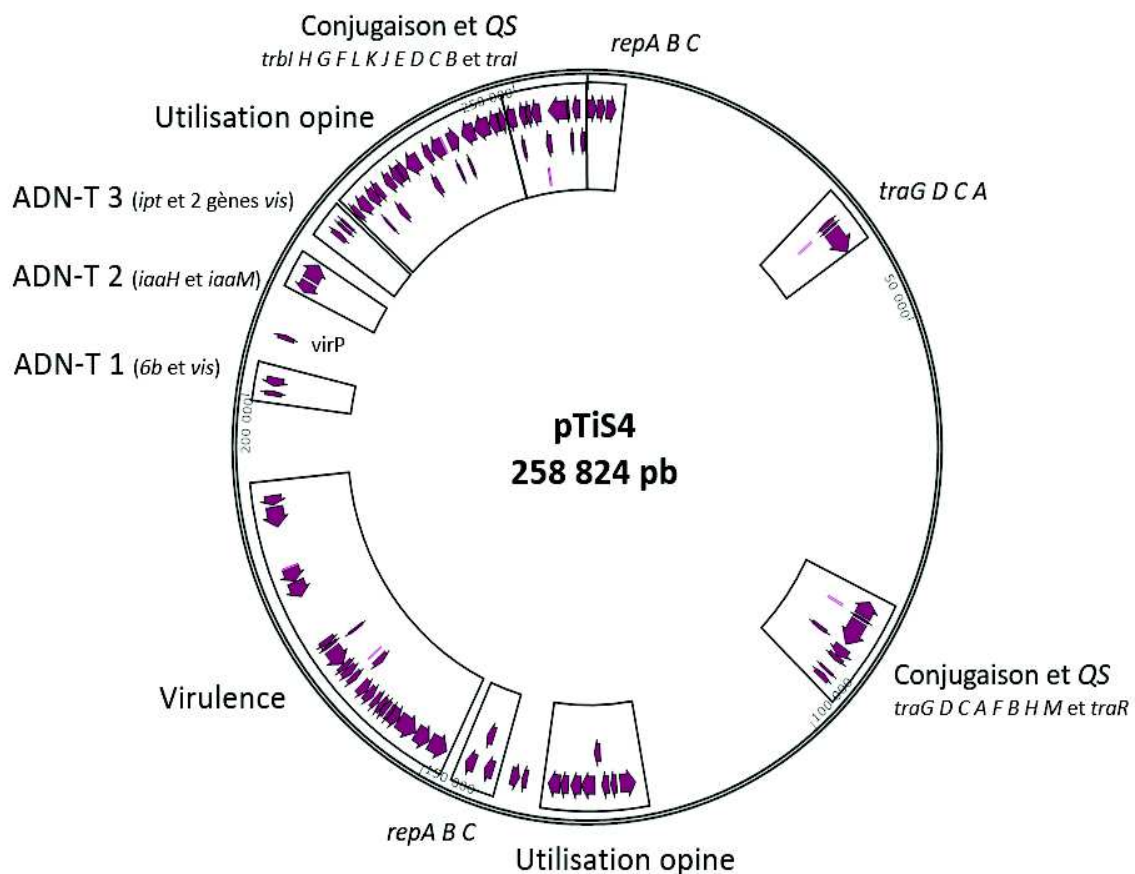
### II.4.3 Sélection variétale de la vigne

Les souches d'*A. vitis* ont des affinités préférentielles pour certaines variétés de vignes, tout comme certaines variétés de vignes sont plus résistantes à la galle du collet que d'autres (Bauer *et al.*, 1994; Ferreira and Van Zyl, 1986). Afin de trouver des cultivars plus résistants, de nouvelles variétés hybrides ont été obtenues par croisement de deux variétés ayant des caractéristiques particulières. Ces variétés hybrides ont ensuite été infectées par une souche d'*A. vitis* et certaines ont montré une résistance accrue par rapport aux variétés initiales (Szegedi and Kozma, 1984). Une autre approche encore utilisée actuellement en viticulture est la réalisation de greffes des variétés produisant le type de raisin recherché, sur des pieds de vignes résistants à la galle du collet. Une étude s'est intéressée à l'évolution d'infections de plants de vignes greffés sur un cultivar résistant (Gloire) et sur un sensible (Teleki 5C) (Süle and Burr, 1998). Après 2 ans de culture, 79% des vignes greffées sur des pieds de cultivar Teleki 5C ont développé les symptômes de la galle du collet, contre seulement 9% des pieds greffés sur des pieds du cultivar Gloire. Au bout de 6 ans, seuls 13% des vignes greffées sur des pieds de Teleki 5C ont survécu, contre 82% des pieds greffés sur des pieds du Gloire. Cette méthode de lutte est la seule méthode de lutte actuellement utilisée par les viticulteurs. La sélection variétale semble donc pouvoir porter ces fruits !

## II.5 Spécificités plasmidiques des *A. vitis*

### II.5.1 Particularités des pTi retrouvés chez *A. vitis*

Les étapes du développement de la galle du collet chez la vigne par *A. vitis* sont globalement les mêmes que pour la galle du collet provoquée par *A. fabrum* C58 (Nuenen *et al.*, 1993; Schrammeijer *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1993; Turk *et al.*, 1993). Cette partie se concentre donc sur les particularités des pTi retrouvés chez *A. vitis*.



**Figure 12 : Carte du plasmide Ti d’*A. vitis* S4.**

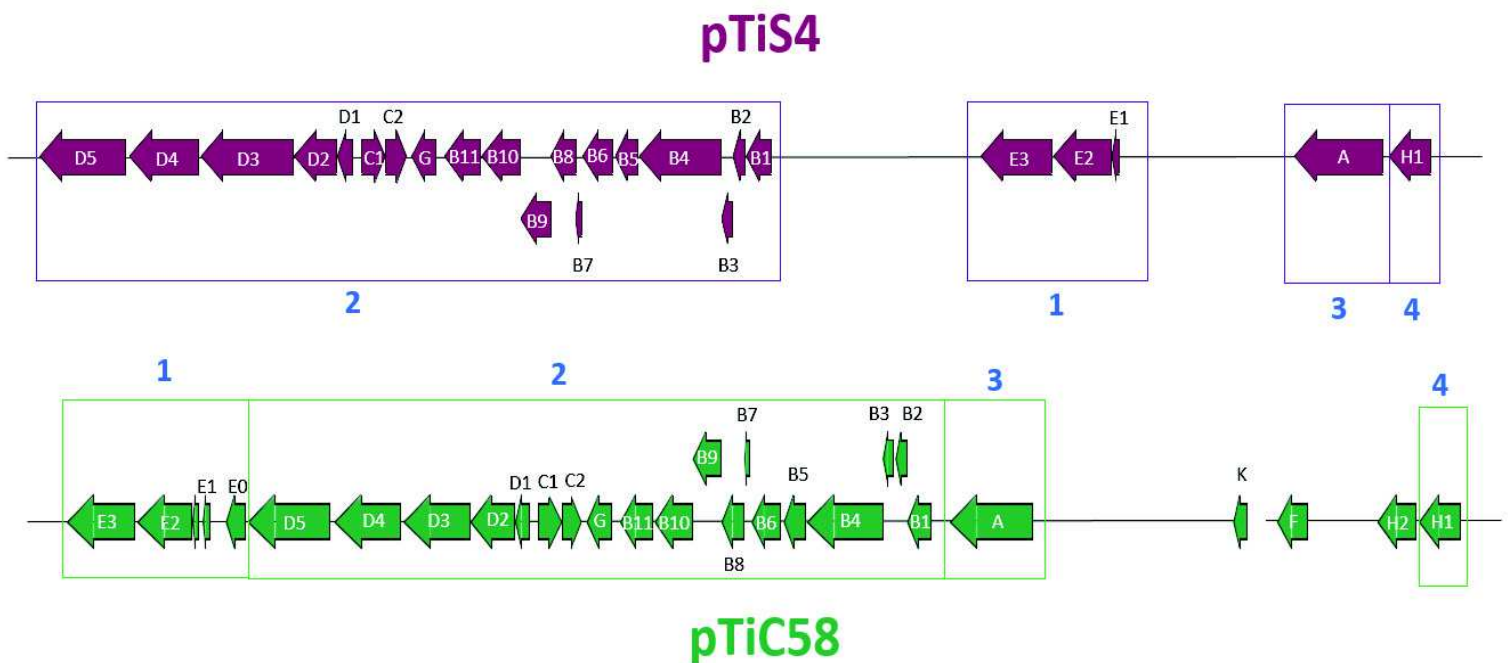
Les gènes représentés par des flèches correspondent aux gènes ayant un rôle (prouvé ou supposé par prédiction) dans une des étapes de virulence. Les autres gènes du pTi n’ont pas été représentés. La longueur des gènes et des régions intergéniques a été respectée.

### II.5.1.1 Les différents types de pTi

De nombreuses opines synthétisées par les cellules végétales suite à l’intégration de l’ADN-T de souches d’*A. tumefaciens* sont également retrouvées dans des tumeurs suite à l’infection de souches d’*A. vitis* (Chilton *et al.*, 2001; Otten and De Ruffray, 1994; Otten and Szegedi, 1985; Paulus and Otten, 1993; Ridé *et al.*, 2000; Szegedi, 2003b). Cependant, certaines opines n’ont jamais été retrouvées dans des tumeurs induites par des souches d’*A. vitis* bien que leur synthèse par des plantes infectées par des souches d’*A. tumefaciens* possédant ce type de plasmide soit possible. La mannopine et l’agropine n’ont, par exemple, jamais été retrouvées dans une tumeur provoquée par *A. vitis* hébergeant un pTi codant une octopine synthase. contrairement à certaines souches d’*Agrobacterium* possédant un pTi codant une octopine synthase qui permet leur synthèse (Szegedi *et al.*, 2005).

En revanche, un plasmide permettant la synthèse d’une nouvelle opine a été mis en évidence uniquement chez les souches d’*A. vitis*, le pTi à vitopine (Figure 12, Szegedi *et al.*, 1996). A notre connaissance, le pTi à vitopine est spécifique aux souches d’*A. vitis*, comme celui de la souche modèle S4 (pTiS4). Ce pTiS4 possède le gène *vis* permettant la synthèse de cette opine, la vitopine également appelé heliopine (Figure 5). Les gènes de la région de catabolisme de la vitopine n’ont en revanche pas

été caractérisés au niveau fonctionnel, leurs fonctions supposées proviennent d'annotations. Les pTi de type vitopine possèdent trois ADN-T contrairement aux autres types de pTi qui en possèdent un ou deux (Canaday *et al.*, 1992). Ce nouveau type de pTi partage une forte synténie avec les autres pTi, sauf pour la région des gènes de virulence qui présente une organisation différente (Gérard *et al.*, 1992) (Figure 13). Certains gènes de virulence présents sur le pTiC58 n'ont donc pas leur équivalent sur le pTiS4, tels que *virK*, *virF*, *virH2* et *virE0*. Même si peu d'études fonctionnelles ont été menées sur le pTiS4, ces gènes ne sont pas indispensables à la mise en place de la virulence.



**Figure 13 : Comparaison de l'organisation des régions de virulence des plasmides Ti des souches *A. vitis* S4 et *A. fabrum* C58.**

Seuls les gènes impliqués dans la virulence (région *vir*) sont représentés. La longueur des gènes et des régions intergéniques a été respectée. Les régions 1-4 représentent les régions ayant une organisation commune entre les deux pTi.

### II.5.1.2 Gènes impliqués dans la délimitation de la gamme d'hôtes

Bien qu'*A. vitis* n'ait été isolé que de la vigne en conditions naturelles, la formation de la galle du collet chez d'autres espèces de plantes avec *A. vitis* est réalisable en conditions de laboratoire. Parmi les pTi présents chez les souches d'*A. vitis*, certains dit « à large spectre » confèrent à leur bactérie hôte la capacité d'infecter une large gamme de plantes alors que d'autres dit « à spectre étroit » vont permettre à leur bactérie d'infecter une faible gamme de plantes, en condition de laboratoire (Panagopoulos and Psallidas, 1973; Thomashow *et al.*, 1980). La plupart des souches d'*A. vitis* possèdent un pTi à large spectre d'hôtes. Lorsqu'un de ces pTi est transféré dans une souche d'*A.*

*vitis* hébergeant initialement un pTi à faible spectre d'hôtes, cette dernière devient capable d'infecter une large gamme de plantes hôtes. Le spectre d'hôte est donc régi par le pTi et non par la souche.

Plusieurs éléments génétiques situés sur le pTi ont été incriminés pour leur rôle dans cette limitation de la gamme de plantes hôtes. L'expression du gène *virA* pourrait être impliqué dans cette limitation (Turk *et al.*, 1993). Pour rappel, la protéine VirA est le senseur du système à deux composants VirA-VirG, qui déclenche la cascade de signalisation. L'expression du gène *virA* d'un pTi ayant un faible spectre d'hôte ne semble pas activé en présence de certaines molécules, notamment en présence d'acétylsyringone, un inducteur du gène *virA* des pTi à large spectre d'hôtes (Turk *et al.*, 1993). Cependant, ce type de résultat n'a pas été confirmé pour d'autres pTi. Le locus *virC* serait également impliqué dans la limitation du nombre de plantes hôtes car une souche délétée pour ce locus voit sa gamme d'hôte augmenter. Bien que le rôle précis de VirC n'ait pas pu être déterminé, l'hypothèse proposée serait que les pTi à faible spectre d'hôtes induiraient une réponse hypersensible chez certaines espèces de plantes, réponse qui n'est pas induite chez les pTi à large spectre d'hôtes (Yanofsky *et al.*, 1985). L'induction de la réponse hypersensible permettrait donc à certaines plantes de ne pas être infectées, limitant ainsi le spectre d'hôtes de certaines souches.

En plus de certains gènes *vir*, des gènes de l'ADN-T influenceraient la gamme du spectre d'hôtes (Hoekema *et al.*, 1984; Yanofsky *et al.*, 1985). Plusieurs pTi à faible spectre d'hôtes ne possèdent pas le gène *ipt* (Bonnard *et al.*, 1989). De plus, l'introduction de ce gène dans les souches qui en sont dépourvues augmente le nombre d'espèces de plantes pouvant être infectées (Hoekema, 1984). L'ensemble des facteurs influençant ce spectre d'hôte montre bien sa complexité.

## II.5.2 Capacité des souches d'*A.vitis* à cataboliser l'acide tartrique

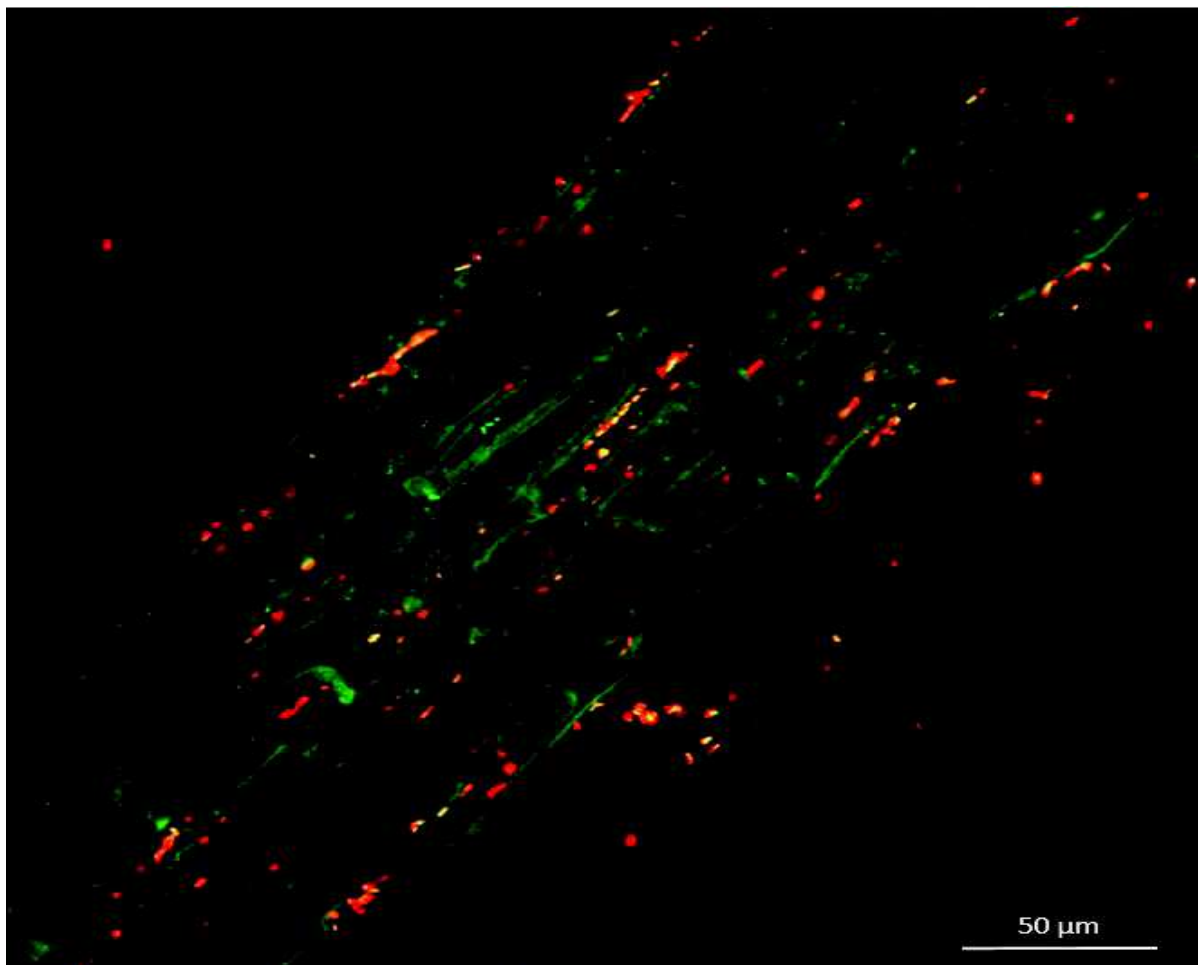
### II.5.2.1 Distribution de cette capacité et avantages

Parmi les différents glucides et acides organiques présents dans la vigne, l'acide tartrique est le composé le plus abondant, et ce dans la plupart des organes de la plante (Kliwer, 1966). Différentes bactéries phytopathogènes, appartenant notamment au genre *Pseudomonas*, ont la capacité d'utiliser cette source de carbone (Dagley and Trudgill, 1963; Shilo and Stanier, 1957). Selon les études, plus de la moitié des souches d'*A.vitis* testées (Szegedi *et al.*, 1992), voire toutes les souches testées (Szegedi, 1985 cité dans Burr and Otten, 1999) peuvent utiliser l'acide tartrique comme source de carbone préférentiellement au glucose.

Lors des premières études, la capacité à utiliser l'acide tartrique au sein du genre *Agrobacterium* a été attribuée exclusivement aux *A.vitis* (Figure 14). Puis, au cours d'études ciblant

plus de souches, des souches d'*A. tumefaciens* possédant des plasmides Ti ayant des régions de catabolisme de l'acide tartrique ont été isolées (Ridé *et al.*, 2000). Chez ces dernières, le glucose reste tout de même une source de carbone préférée à l'acide tartrique.

La présence fréquente de cette capacité à cataboliser l'acide tartrique peut être expliquée par l'avantage que confère cette caractéristique au sein de la vigne, comme démontré lors d'une compétition entre une souche pouvant cataboliser l'acide tartrique et une souche en étant incapable (Salomone *et al.*, 1998a).



**Figure 14 : Colonisation d'une racine de vigne et mise en évidence de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme de l'acide tartrique.**

Un plasmide contenant le gène *mcherry* exprimé constitutivement et le promoteur d'un gène d'utilisation de l'acide tartrique couplé au gène *egfp* a été inséré dans *A. vitis* S4. Cet outil permet de visualiser toutes les bactéries présentes en rouge et les bactéries exprimant les gènes de catabolisme de l'acide tartrique en vert. Le jaune représente la superposition de la fluorescence rouge de la *Mcherry* et verte de l'*EGFP*. Données personnelles non publiées.

### II.5.2.2 Support génomique et gènes impliqués

La majorité des gènes permettant le catabolisme de l'acide tartrique sont localisés sur des plasmides dont la plupart n'ont aucune autre fonction connue et que l'on nomme pTr ou pTar (Lowe *et al.*, 2009). Des pTi peuvent également héberger des gènes de catabolisme de l'acide tartrique (Otten *et al.*, 1995; Ridé *et al.*, 2000; Szegedi *et al.*, 1992). Les plasmides portant une région de catabolisme montrent une grande diversité, d'une part dans l'organisation de ces régions, et d'autre part dans les groupes d'incompatibilité des plasmides (Crouzet and Otten, 1995; Salomone *et al.*, 1998a; Szegedi and Otten, 1997). Certaines souches d'*A. vitis* possèdent même deux régions permettant le catabolisme de ce composé, mais cette redondance ne semble pas conférer d'avantage écologique (Otten *et al.*, 1995). Les plasmides possédant les gènes de catabolisme de l'acide tartrique peuvent être transférés *in vitro* chez des souches de *A. vitis* ou de *A. tumefaciens* qui en sont dépourvues, leur permettant ainsi d'exploiter cette source de carbone (Szegedi *et al.*, 1992).

Quatre gènes indispensables à l'utilisation de l'acide tartrique ont été caractérisés : *ttuA* qui code un régulateur de type LysR, *ttuB* pour une protéine permettant l'import de l'acide tartrique dans la cellule, *ttuC* pour une déshydrogénase de l'acide tartrique et *ttuD* pour une enzyme probablement impliquée dans une étape ultérieure de la dégradation de l'acide tartrique (Crouzet and Otten, 1995). Ces quatre gènes sont parfois accompagnés du gène *ttuE* qui n'est pas indispensable au catabolisme de l'acide tartrique et qui code une protéine dont le rôle précis n'a pas été caractérisé (Crouzet and Otten, 1995).

Ces plasmides possèdent pour la plupart des gènes de transfert conjugatif leur permettant de se disséminer en même temps que la capacité à cataboliser l'acide tartrique. Comme les pTi, les pTar possèdent un système de régulation *quorum sensing* de type *tral-traR* potentiellement impliqué dans la régulation du transfert conjugatif (Lowe *et al.*, 2009). La molécule signal synthétisée par Tral-pTar n'a jamais été caractérisée mais d'après les homologues de séquence des protéines Tral et la détection de ces molécules par une souche bioindicateur d'AHLs suite à une migration par chromatographie sur couche mince, cette molécule serait du OC<sub>8</sub>-HSL (Lowe *et al.*, 2009). Le pTar de la souche S4 possède un système de QS et ce dernier pourrait donc être impliqué dans la régulation du transfert conjugatif de ce plasmide.

## II.6 Spécificités chromosomiques

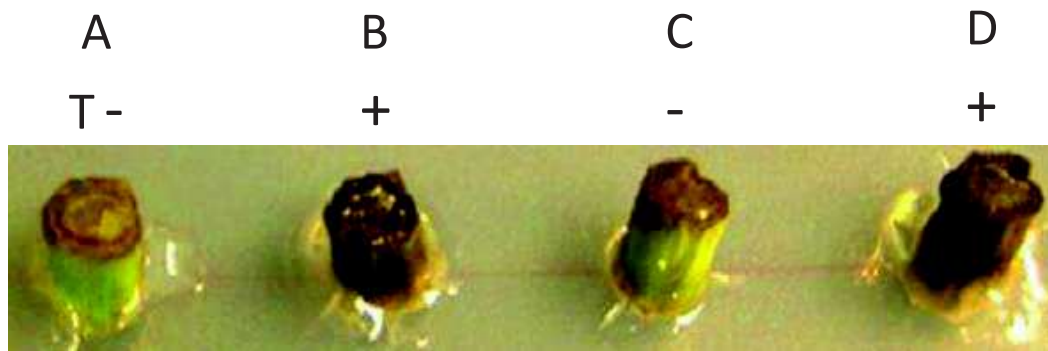
Bien que la galle du collet soit induite par des gènes situés sur le pTi et que les autres plasmides d'*A. vitis*, notamment celui permettant l'utilisation de l'acide tartrique codent des fonctions importantes, *A. vitis* possède également de nombreuses particularités chromosomiques.

### II.6.1 Formation de nécroses

#### II.6.1.1 Rôle de l'activité polygalacturonase

En plus d'avoir la capacité d'induire la galle du collet lorsqu'elle héberge un pTi, *A. vitis* peut également induire des nécroses localisées principalement au niveau des racines. Malgré des tests sur plusieurs autres plantes, ces nécroses ont été reproduites en laboratoire uniquement sur la vigne, indifféremment chez tous les cépages testés (Burr *et al.*, 1987; Süle *et al.*, 1994). Cette capacité à induire les nécroses est retrouvée chez quasiment toutes les souches de *A. vitis* testées, même chez les *A. vitis* ne possédant pas le pTi et donc incapables de provoquer la galle du collet. Seulement deux études ont mis en évidence que certaines souches d'*A. tumefaciens* peuvent causer des nécroses, toutefois moins sévères que celles causées par *A. vitis* (Deng *et al.*, 1995; Yanofsky *et al.*, 1985). Les gènes *tms1* et *6b*, localisés au niveau de l'ADN-T et permettant la synthèse et la modulation de l'activité de l'auxine après intégration de l'ADN-T dans le génome végétal, sont impliqués dans la formation de nécroses chez *A. tumefaciens*.

L'apparition de nécroses a été initialement corrélée à la présence de polygalacturonases synthétisées par les souches d'*A. vitis* (McGuire *et al.*, 1991). Ces enzymes sont également utilisées par d'autres pathogènes bactériens de la vigne tels que *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum* ou encore *Erwinia carotovora* (Allen *et al.*, 1991; Lei *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994; Roper *et al.*, 2007). Les polygalacturonases ont un rôle dans la colonisation et l'attachement de la bactérie lors des premières phases d'infections (Brisset *et al.*, 1991). L'activité polygalacturonase est codée par le gène *pehA* qui permet à lui seul la synthèse de la polygalacturonase lors d'une expression hétérologue. Un mutant inactivé pour ce gène est dépourvu d'activité polygalacturonase et incapable d'induire une nécrose (Rodriguez-Palenzuela *et al.*, 1991).



**Figure 15 : Capacité à induire une nécrose sur explant de vigne par *A. vitis*.**

Les explants sont des morceaux de tige de vigne d'une taille entre 1 et 2cm dont le bois est encore vert et dont la surface est nettoyée dans différents bains. Lorsqu'il y a nécrose, l'explant de vigne se noircit au bout de 2 à 5 jours. A : H<sub>2</sub>O, B : *A. vitis* F2/5, C : Souche inactivée pour *lhnR* (gène impliqué dans la nécrose), D : Souche complétée pour le gène *lhnR*. Modifié d'après Zheng *et al.*, 2012).

#### II.6.1.2 Synthétases de peptides non ribosomiques et polycétide synthases

En 2001, une étude a suggéré que des mécanismes autres que l'activité polygalacturonase pourraient être impliqués dans la formation des nécroses chez la vigne par *A. vitis* (Figure 15) (Herlache *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2012). En effet, une souche mutée pour le gène *pehA* peut tout de même induire des nécroses lorsqu'elle est inoculée dans les tissus de la plante à une concentration de plus de 10<sup>6</sup> cellules/ml.

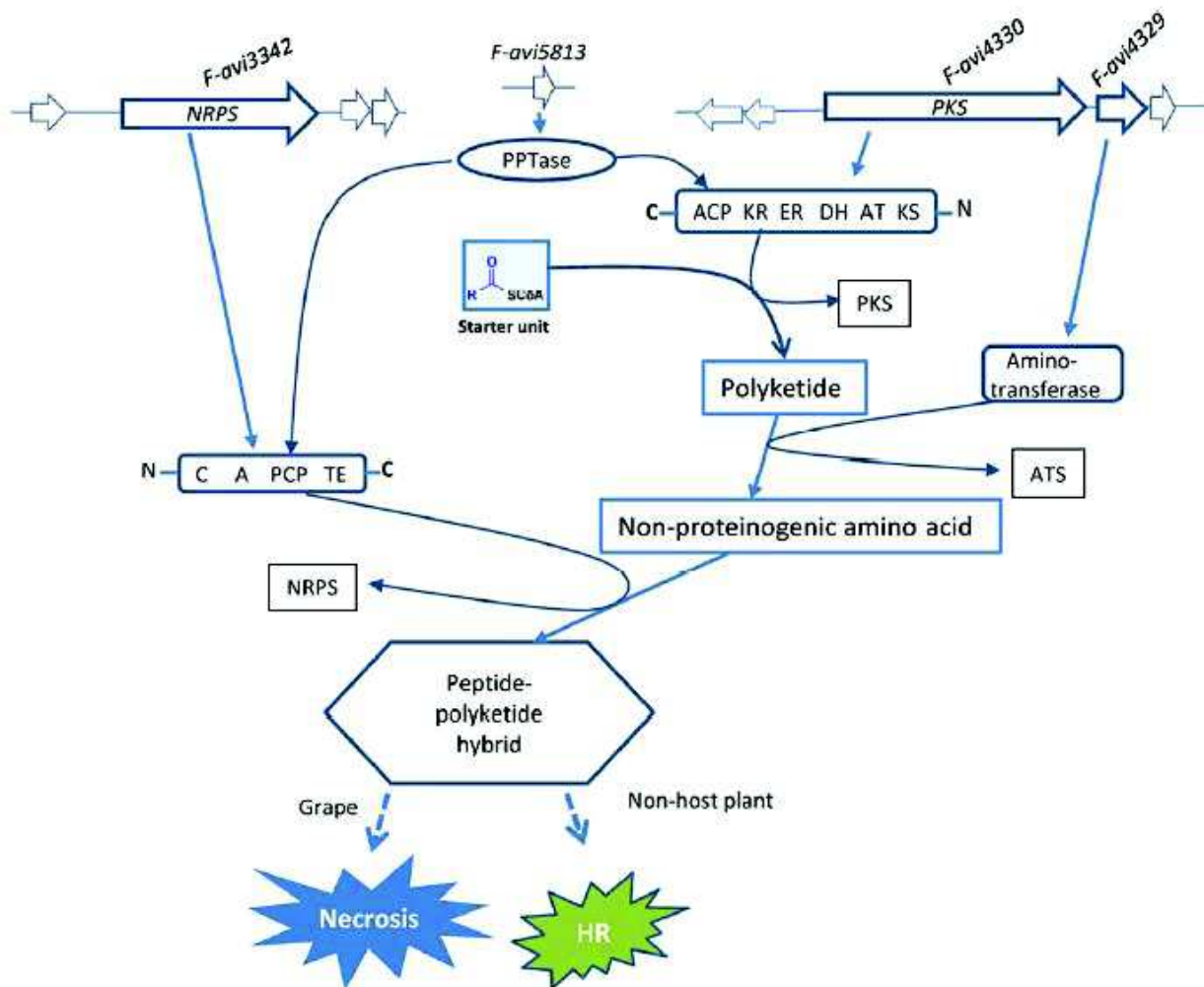
Différentes études de mutagenèse aléatoire et de mutagenèse dirigée ont été menées sur la souche F2/5 afin de caractériser les gènes impliqués dans la formation de nécroses (Herlache *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2003, 2012; Zheng and Burr, 2013). Plusieurs gènes regroupés dans un opéron appelé *avh* jouent un rôle dans ce phénotype. Les gènes *avhE* et *avhF* permettent la synthèse d'une polycétide synthase (PKS). Les autres gènes de l'opéron, *avhA*, *avhB*, *avhC* et *avhD*, sont également impliqués puisque la délétion de chacun de ces gènes entraîne une réduction partielle de la nécrose (Carle *et al.*, 2008) ; leur rôle n'a cependant pas été clairement défini.

Le gène *lhnR* qui code un régulateur transcriptionnel de type LysR, ainsi que l'opéron *lhnABC*, sont également impliqués dans la formation de la nécrose, puisque la délétion du régulateur *lhnR* ou de l'opéron *lhnABC* conduit à une diminution du phénotype de nécrose (Zheng *et al.*, 2012). Une étude plus récente a permis d'identifier trois autres gènes de la souche F2/5 impliqués dans la nécrose (Zheng and Burr, 2013) : *F-avi5813* qui code une protéine de type Sfp phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) qui est une enzyme de modification post-traductionnelle, *F-avi4330* qui code une polycétide synthase et *F-avi3342* qui lui code une synthétase de peptide non ribosomiques (NRPS). Ces trois gènes sont nécessaires à la mise en place de la nécrose car la délétion de l'un d'entre eux empêche la formation de nécrose sur explants. Un schéma hypothétique montrant l'implication des différents



gènes et l'ordre d'intervention des produits de ces gènes a été suggéré (Zheng and Burr, 2013) (Figure 16).

Toutes ces études ont été menées sur la souche F2/5 mais les résultats sont probablement transposables à la souche S4 qui possède des gènes ayant une très forte identité avec ceux de F2/5 (le plus souvent dans les études sur F2/5 ce sont les séquences d'*A. vitis* S4 qui sont utilisés).



**Figure 16 : Voie de biosynthèse d'un métabolite induisant des phénotypes de nécrose et de réponse hypersensible chez la souche *A. vitis* F2/5.**

Ce modèle montre l'implication supposée des produits des gènes NRPS (non ribosomal peptide synthetase), PKS (polycétide synthase) et du gène F-avi5813 qui code une protéine de type Sfp phosphopantéthéinyl transférase. D'après Zheng et Burr, 2013.

## II.6.2 Induction d'une réponse hypersensible (HR)

La réponse hypersensible (HR) est un mécanisme de défense de la plante. Lorsque la plante détecte la présence de bactéries pathogènes par reconnaissance d'un ou de plusieurs produits de gènes d'avirulence, elle va induire la mort de ces propres cellules situées autour du site d'infection afin

de limiter la propagation du pathogène. C'est un mécanisme de défense précoce retrouvé très fréquemment chez les plantes. Contrairement à la nécrose, la réponse hypersensible induite par la présence d'*A. vitis* n'est pas spécifique à la vigne (Herlache *et al.*, 2001) et cette réponse se retrouve chez différentes plantes notamment le tabac (Figure 17). Il a été montré que tous les gènes impliqués dans la nécrose chez la souche F2/5 l'étaient également dans l'induction de la HR chez le tabac (Carle *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2012; Zheng and Burr, 2013). L'effecteur responsable de la nécrose serait également responsable de la HR (Figure 16).

L'étude de différentes souches d'*A. vitis* a montré que l'induction de la nécrose et celle de la HR pouvaient être variables d'une souche à une autre ; certaines souches induisant une forte nécrose induisent une faible HR parfois même non détectable comme c'est le cas de la souche S4 (Li *et al.*, 2005a). La non-induction de HR par certaines souches pourrait s'expliquer par une modification de l'effecteur empêchant ainsi sa reconnaissance par la plante. Cette réponse hypersensible est une propriété propre à *A. vitis* puisque les souches d'*A. tumefaciens* n'induisent pas de HR (Figure 17).



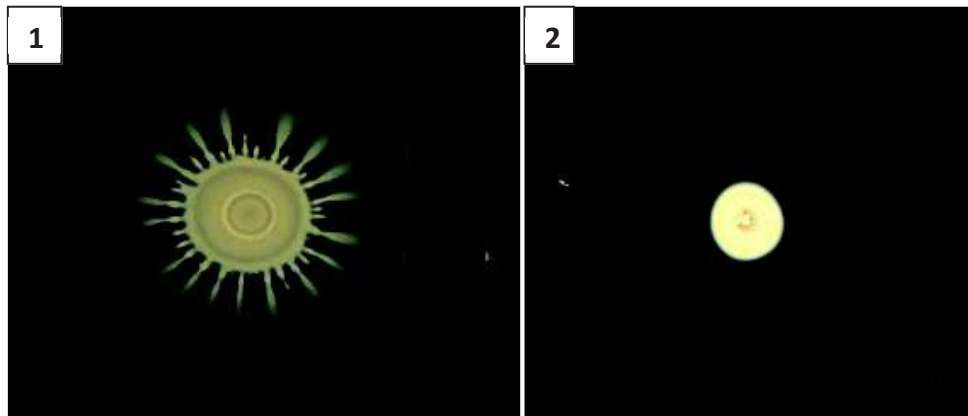
**Figure 17 : Réponse hypersensible sur feuille de tabac avec *A. vitis* ou *A. tumefaciens*.**

Des feuilles de tabac ont été infectées avec une souche entraînant une réponse hypersensible (1) et avec *A. fabrum* C58 n'entraînant pas de réponse hypersensible (2). Réalisé au sein de l'équipe après modification du protocole de Herlache *et al.* (2001), données non publiées.

### II.6.3 Mobilité par swarming

Le swarming (ou essaimage) est un mode de mobilité qui nécessite la présence de flagelles et qui ne peut se réaliser que lorsqu'un nombre important de bactéries est présent (Figure 18) (Daniels *et al.*, 2004). Le swarming joue un rôle important dans la colonisation d'environnements naturels par les microorganismes (Harshey, 1994). Toutes les souches d'*A. vitis* testées ont montré la capacité à se déplacer par swarming (Süle *et al.*, 2009a; Yang *et al.*, 2009), tout comme certaines souches de *Rhizobium* (Daniels *et al.*, 2006; Tambalo *et al.*, 2010). En revanche, dans les conditions testées, les souches d'*Agrobacterium* n'effectuent pas de swarming et ne peuvent se déplacer que par swimming (Süle *et al.*, 2009a).

Cette mobilité par swarming chez *A. vitis* est accompagnée par la production de bio-surfactants (dont la nature n'est pas connue) et est régulée par QS chez la souche F2/5. Chez cette même souche, il a également été montré que les gènes *lhnR* et *lhnABC*, qui sont impliqués dans la nécrose et la HR, sont également indispensables à la synthèse de bio-surfactant et à la mise en place du swarming (Zheng *et al.*, 2012). Cette mobilité de type swarming pourrait permettre à la bactérie une meilleure colonisation des tissus.



**Figure 18 : Capacité de swarming chez *A. vitis*.**

*A. vitis* S4 sauvage (1) et S4 $\Delta$ avsl affecté pour le swarming (2) sur milieu  $\frac{1}{2}$ TY 0.6% d'agar au bout de 48h. Réalisé au sein de l'équipe, données non publiées.

#### II.6.4 Mécanisme de *quorum sensing*

Contrairement aux *A. tumefaciens*, les *A. vitis* possèdent un couple *luxI-luxR* sur un de leur chromosome circulaire en plus de ceux présents sur certains de leurs plasmides. Cependant, jamais plus d'un système de QS chromosomique n'a été mis en évidence chez les *A. vitis*. Pour les souches hébergeant un ou plusieurs plasmides possédant également des gènes de régulation QS, plusieurs systèmes QS peuvent donc être exprimés en même temps, rendant complexe l'étude de chaque système (Figure 19).

##### II.6.4.1 *Quorum sensing* chez *A. vitis* F2/5

Le système de QS chromosomique appelé *avsl-avsR* est présent chez toutes les souches d'*A. vitis* étudiées. Ce système de communication a été plus particulièrement caractérisé chez la souche F2/5 où la protéine Avsl permet la synthèse de plusieurs *N*-acyl-homosérines lactones (AHL) à longues chaînes acyle : C<sub>16</sub>-HSL (N-hexadecanoyl homosérine lactone) ; 3-oxo-C<sub>16</sub>-HSL (N-(3-oxohexadecanoyl) homosérine lactone) ; C<sub>16:1</sub>-HSL (N-(cis-9-octadecenoyl) homosérine lactone) ; et 3-oxo-C<sub>16:1</sub>-HSL (N-(3-oxo-cis-11-hexadecenoyl) homosérine lactone) (Savka *et al.*, 2011). La synthèse de différentes AHL par

une même synthase de type LuxI est assez fréquente (Rodelas *et al.*, 1999; Wisniewski-Dyé and Downie, 2002). Chez cette souche, plusieurs travaux ont montré que le système *avsl-avsR* était impliqué dans la régulation de différents phénotypes tels que la formation de nécrose sur explants de vignes, l'induction de la HR sur feuilles de tabac ainsi que la mobilité par swarming (Hao and Burr, 2006; Süle *et al.*, 2009b) (Figure 18).

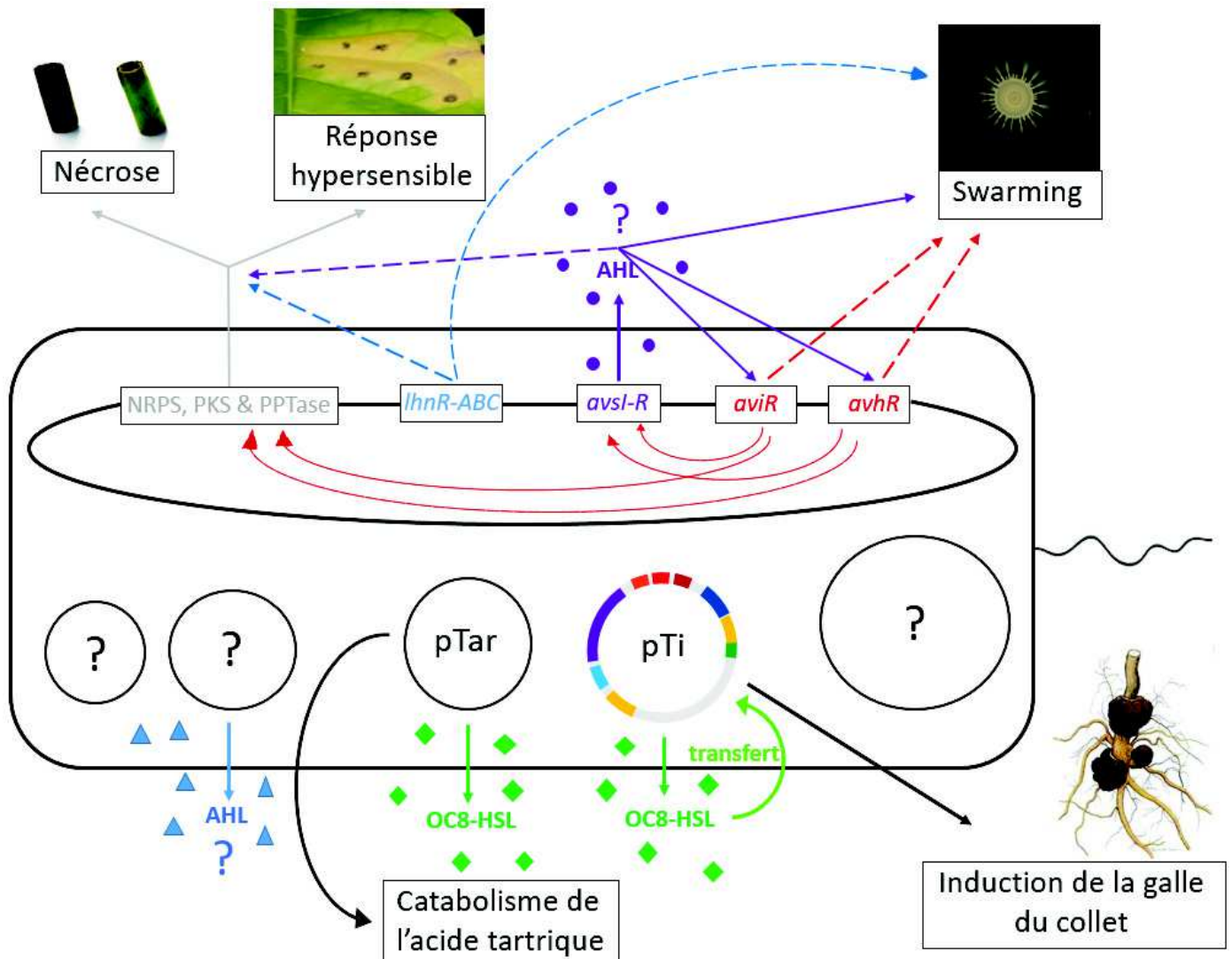
Des AHL à courtes chaînes acyle (chaîne inférieure ou égale à 8 carbones) ont également été détectées dans les extraits de la souche F2/5 mais ces molécules sont également produites chez le mutant inactivé pour le gène *avsl* (Hao and Burr, 2006; Li *et al.*, 2005b; Lowe *et al.*, 2009; Savka *et al.*, 2011). Un gène plasmidique de type *luxI* a été identifié sur un des 3 plasmides de la souche et permettrait la synthèse de ces AHL à courtes chaînes acyle. Cependant, aucune information n'est disponible concernant le plasmide portant ce gène ou sur le gène en lui-même.

Deux gènes de type *luxR* appelés *avhR* et *aviR* sont présents et ont été étudiés chez la souche F2/5. *AviR* et *AvhR* possèdent tous les deux un domaine de fixation à un auto-inducteur (PF03472) ainsi qu'un domaine C-terminal de fixation à l'ADN typiques des LuxR (PF00196, PFAM, InterProScan, Mage Genoscope). Ces deux gènes ne sont en revanche pas associés à un gène de type *luxI* et sont donc considérés comme des *luxR* orphelins. L'expression de ces gènes semble indépendante du système *Avsl-AvsR*, mais *AviR* semble impliqué dans la régulation de la synthèse des molécules d'*Avsl*. De plus, la délétion de *avhR* entraîne une diminution de la nécrose, une suppression de la HR mais ne modifie pas la mobilité de type swarming. En revanche, la délétion d'*aviR* entraîne une diminution de la concentration en AHL ainsi qu'une suppression de la nécrose, de la HR et du swarming (Hao *et al.*, 2005; Savka *et al.*, 2011; Süle *et al.*, 2009b; Zheng *et al.*, 2003). Il semble donc possible que ces LuxR orphelins répondent à la présence d'AHLs endogènes, notamment celles synthétisées par la synthase *Avsl*, mais ils peuvent également répondre à des AHLs exogènes synthétisées par d'autres bactéries.

#### II.6.4.2 *Quorum sensing* chez *A. vitis* S4

Pour la souche S4 peu d'informations sont présentes dans la littérature mais les loci des gènes étudiés pour la souche F2/5 ont été proposés après le séquençage et l'annotation du génome de la souche S4. Par conséquent, les données sur des gènes chromosomiques obtenues chez F2/5 sont potentiellement transposables à la souche S4. Les gènes *avsl-avsR* ainsi que les deux gènes codant des LuxR orphelins, *avhR* et *aviR*, sont bien présents chez la souche S4 mais leurs rôles n'ont pas été étudiés et les molécules produites par *Avsl* n'ont pas été caractérisées. Une détection des molécules présentes dans l'extrait total de la souche S4 grâce à une souche bioindicateur a tout de même révélée la présence d'AHL à courtes et à longues chaînes acyle (Li *et al.*, 2005b).

Trois des plasmides présents chez la souche S4 portent également des gènes de type *luxI* : le pTi et le pTar comme évoqué précédemment, ainsi qu'un troisième plasmide de 130 kb qui n'a encore jamais été étudié. La figure 19 permet de résumer les phénotypes régulés par les différents systèmes QS chez la souche S4 en utilisant les homologues de ce qui est déjà décrit pour la souche F2/5.



**Figure 19 : Schéma récapitulatif simplifié du *quorum sensing*, de la nécrose, de la réponse hypersensible et du *swarming* chez la souche modèle *A. vitis* S4.**

L'emplacement et l'organisation des gènes chromosomiques ne sont pas respectés et ont été simplifiés pour permettre de mettre en évidence leur implication dans les différents phénotypes. La majorité des données proviennent des études menées sur la souche F2/5 mais les mêmes gènes sont présents chez la souche S4, ce qui laisse supposer le même type de régulation chez cette souche. NRPS pour Non Ribosomal Peptide Synthetase, PKS pour Polycétide Synthase, PPTase pour Sfp-type phosphopantetheinyl transferase.

# Résultats



# Chapitre 1 : Diversité des souches pathogènes isolées de pieds de vignes atteints de la galle du collet au Maroc

## Préambule

La viticulture est pratiquée par l'homme depuis des millénaires. La date de son apparition n'est pas connue mais les premières découvertes de raisin ramassé datent du Paléolithique inférieur (entre - 500 000 et - 120 000 environ). Les premières traces concernant le vin proviennent d'amphores dans lesquelles du vin aurait été stocké il y a 7500 ans en Iran (Testard-Vaillant, 2005). Les premiers écrits sur le vin proviennent de *l'Épopée de Gilgamesh* qui est un récit babylonien vieux de 4 000 ans considéré comme la plus vieille œuvre littéraire connue. La viticulture a depuis été exportée dans le monde entier et est maintenant un des secteurs agricoles les plus retrouvés avec une surface de 8 000 000 ha<sup>2</sup> (chiffres de 2010).

Au Maroc, la vigne est cultivée sur une superficie totale de l'ordre de 57 000 ha, ce qui permet une production annuelle de 440 115 tonnes et l'érige au rang de 4<sup>e</sup> secteur agricole du pays après l'olivier, l'amandier et les agrumes. Chaque région possède des vignes pour la production de raisin de table et de raisin de cuve, avec notamment la région de Meknès-Tafilalet produisant le plus de raisin de cuve (6070 ha) (Achbani E. H. *et al.*, 2016).

De nombreuses maladies affectent la vigne et entraînent une diminution de la production, notamment la galle du collet qui est la principale bactériose sévissant sur la vigne. L'agent pathogène de cette maladie est le plasmide Ti, retrouvé chez des agrobactéries, qui porte tous les gènes de virulence et confère à sa bactérie hôte la capacité à induire cette bactériose. Bien que la galle du collet soit connue depuis longtemps au Maroc pour provoquer d'importantes pertes économiques sur de nombreux arbres fruitiers (Benjama *et al.*, 1996), elle n'a été diagnostiquée sur la vigne qu'en 2008. La galle du collet est maintenant présente dans de nombreux vignobles et provoque d'importantes pertes économiques, notamment dans la région de Meknès.

En collaboration avec le Laboratoire de recherche et de protection des plantes (URPP- INRA-Meknès, Maroc) et le Laboratoire de Botanique, Biotechnologie, et Protection des Plantes (Kenitra, Maroc), nous avons cherché à analyser la diversité des agrobactéries responsables de cette épidémie dans des vignobles contaminés de la région de Meknès. Dans cet objectif, nous avons réalisé la caractérisation de l'agent pathogène par une combinaison de tests phénotypiques en lien avec la pathogénie et d'analyses phylogénétiques.



Les travaux réalisés sur cette partie sont présentés sous la forme d'une publication qui sera soumise dans Systematic and Applied Microbiology.

### **Contributions personnelles**

Ce projet a été initié avant le début de ma thèse par les travaux de K Habbadi, étudiante en thèse dans le laboratoire de E. H. Achbani (URPP- INRA-Meknès, Maroc). Le travail de prospection dans les vignobles de la région de Meknès ont été réalisés par C. Lavire, L. Vial et E. H. Achbani, Lors de la présence de K. Habbadi au laboratoire d'Ecologie Microbienne j'ai participé à son encadrement pour les étapes de biologie moléculaires, et les différents tests phénotypiques réalisés sur *A. vitis* ont été adaptés et réalisés par nos soins. J'ai effectué l'ensemble de l'analyse des données présentées dans ce document.

# Characterization and phylogenetic diversity of *Allorhizobium vitis* isolated from grapevine in Morocco

Khaoula HABBADI<sup>1,2,3\*</sup>, Quentin DUPLAY<sup>3\*</sup>, David CHAPULLIOT<sup>3</sup>, Isabelle KERZAON<sup>3</sup>, Rachid BENKIRANE<sup>2</sup>, Abdellatif BENBOUAZZA<sup>1</sup>, Florence WISNIEWSKI-DYÉ<sup>3</sup>, Céline LAVIRE<sup>3</sup>, El Hassan ACHBANI<sup>1</sup>, Ludovic VIAL<sup>3#</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de recherche et de protection des plantes URPP-INRA-Meknès, Maroc;

<sup>2</sup>Laboratoire de Botanique, Biotechnologie, et Protection des Plantes, Faculté des Sciences, Kenitra, Maroc;

<sup>3</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, INRA, UMR1418, 10 Villeurbanne, F-69622, France

\*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding author:

Ludovic Vial, Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne cedex, France, Tel +334 72 44 82 89 ; E-mail: ludovic.vial@univ-lyon1.fr

Informative title: Identification of *Allorhizobium vitis* isolated from Morocco

Key words: Crown gall, grapevine, *Allorhizobium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, phylogenetic diversity

## Abstract

Crown gall was observed in recently planted vineyards of the Meknes region (Morocco). 82 isolates from 10 affected vineyards were characterized by *recA* sequencing and were found to belong to *A. tumefaciens* genomospecies G1, G4 or G7, *Rhizobium rhizogenes*, and to *Allorhizobium vitis*. Only the 39 *A. vitis* isolates showed to be pathogenic *in vitro* on tomato and MLSA phylogenetic analyses revealed a poor genetic diversity, with the definition of only four genomic groups. Definition of the *A. vitis* genomic groups correlates with specific pathogenic traits: indeed, genomic groups differ with respect to the severity of hypersensitive response symptoms on tobacco leaves, the intensity of necrotic response on grapevine explants, and opine profiles. Both vitopine and octopine were detected by UHPLC in tumors induced by isolates of three genomic groups, an opine signature scarcely ever reported.

## Introduction

Crown gall is a phyto-bacteriosis characterized by the formation of galls or tumours on plant roots and stems. The disease has been identified on a large variety of dicotyledonous plants, many of which of agricultural and economic importance (vine, peach, cherry, rose ...). Grapevine is very sensitive to this disease (Burr *et al.*, 1998; Kado, 2014). Whereas older vines usually survive the infection, although showing stress symptoms, development of a tumor on young vines usually leads to plant death (Süle and Burr, 1998). In the absence of appropriate crop management, the damage could threaten the harvest and the quality of grape (Burr *et al.*, 1998; Creasap and Burr, 2006).

The causing agent of this disease is a plasmid, called Ti (pTi for plasmid tumor inducing) since it harbors all the virulence genes necessary for the establishment and the development of the tumor. Briefly, part of this plasmid, the T-DNA (transferred DNA) is transferred and incorporated into the plant cell genome, leading to gall development. In addition to the genes involved in tumorigenesis, the T-DNA also drives the biosynthesis of opines, unusual amino acid and sugar condensates (Dessaux *et al.*, 1998). Opines produced by transformed plant cells can be metabolized only by bacteria carrying a pTi (Dessaux *et al.*, 1998; Lacroix and Citovsky, 2013; Szegedi *et al.*, 1988b). Bacteria belonging to the *Agrobacterium* genus are the principal host of Ti plasmid, and these bacteria are usually recovered from galls in most infected plants. Grapevine is a particular case, as the pathogenic bacteria isolated from infected grapevines very often belong to the *Allorhizobium vitis* species and the disease is due to strains of the *Agrobacterium* genus only in a few situations (Ophel and Kerr, 1990; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009; Szegedi *et al.*, 2005). Interestingly, *A. vitis* strains have never been isolated from tumors formed on other plants than grapevine (Burr and Otten, 1999; Genov *et al.*, 2006; Kuzmanović *et al.*, 2014; Orel *et al.*, 2017).

Until recently, *Allorhizobium vitis* was considered as a species of the genus *Agrobacterium*, and is sometimes still referred to the biovar 3 of the genus *Agrobacterium* (Kawaguchi *et al.*, 2005a; Kerr and Panagopoulos, 1977). Result obtained from a MLSA approach proposed the transfer of *Agrobacterium vitis* into the genus *Allorhizobium* (Mousavi *et al.*, 2014). Moreover, the genus *Agrobacterium* is characterized by a linear chromid whereas *A. vitis* harbored a circular chromid, supporting the distinction into different genera (Ramírez-Bahena *et al.*, 2014). In the same way, recent phylogenetic and genomic analyses propose that *Agrobacterium* must be retained as a valid genus limited gathering *A. rubi*, *A. larrymoorei* and the so-called biovar 1 agrobacteria that are dispatched in several genomic species (or genomospecies) (Kuzmanović *et al.*, 2015; Mousavi *et al.*, 2015; Ramírez-Bahena *et al.*, 2014). In the present study, we will refer to the nomenclature redefined recently.

In 2008, grapevine crown gall appeared in Morocco in the region of Meknes. Since then, the disease appeared in all wine-growing regions and causes economic losses in many vineyards. The objective of this research was to analyze the diversity of pathogenic and nonpathogenic agrobacteria isolated from grapevine in Morocco.

## Materials and Methods

### Media and bacterial growth conditions

*A. vitis* strain S4 isolated from black raspberry in Hungary (Popoff *et al.*, 1984) and *A. fabrum* C58 isolated from cherry in USA (Kerstens *et al.*, 1973) were used as reference strains. Isolates or reference strains were grown at 28°C on MG agar (D-mannitol, 5g/L; L-glutamic acid, 2g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g/L; NaCl, 0.2g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2g/L; Yeast extract, 0.5g/L; Agar, 15g/L; pH 7) or on YPG (yeast extract 5g/L; Bacto peptone 5g/L; glucose 10 g/L; pH 7.2) agar or broth (Campillo *et al.*, 2012).

The ability to grow on L-tartrate was tested on solid AB minimal medium supplemented with 0.5% tartrate (Crouzet and Otten, 1995).

### Isolation of bacteria

Among the fifteen vineyards reviewed in the region of Meknes-Morocco during June-August 2015, samples of young tumor tissues were collected from diseased vineyards (*Vitis vinifera*) in eleven vineyards, designated A to K (Figure 1). Firstly, tumors tissues were washed in running water and the necrotic tissues were removed; tumor surface was rinsed with 70% ethanol and cut in axenic conditions into small pieces. These pieces were crushed with a micropestle in 2 mL of sterile distilled water and let to macerate for at least 30 min. From the aqueous phase, serial dilutions were made and 20 µL of suspension were streaked on MG medium and incubated on 28°C during 48 hours. Single colonies obtained with morphological resemblance to *Agrobacterium* spp. were purified on MG supplemented with potassium tellurite (200 mg/L) (Brisbane and Kerr, 1983; Mougel *et al.*, 2001; Shams *et al.*, 2012). After growth, typical *Agrobacterium* colonies (e.g. circular glistening morphology plus a characteristic black color with a metallic shine due to incorporation of tellurite) were picked and suspended separately in 100 µL sterile distilled water and incubated overnight at 28°C. A final purification was made on MG medium. Cultures were stored at 4°C on MG medium for short-term maintenance and frozen at -80°C in nutrient broth with 25% glycerol for long-term preservation. For nomenclature of isolates, the first letter refers to the vineyard of isolation.

**Table 1:** PCR primers used in this study.

Gene	Primer	Primer sequence	Reference
<i>recA</i> *	F7386	AGCAAGGCACTGGAAGCGG	(Shams <i>et al.</i> , 2013)
	F7387	CCATACATGATGTCTGAATTC	
<i>virC1-C2</i>	VCF3	GGCGGGCGYGCYGAAAGRAARACYT	(Kawaguchi <i>et al.</i> , 2005b)
	VCR3	AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC	
<i>ttuC</i>	G0931	GACTGGGGYTCCGACTATTACAAGAA	This study
	G0932	ATCTCGTCCCACATCACCATGC	
<i>rpoB</i> *	G0953	TCGTTTCGCAGATGCACCG	This study
	G0954	TAGGCGCCAACATTGACGTG	
<i>thrC</i> *	thrC1F	GGGCAATTTTCGACGATTGCCAG	This study
	thrC1R	GGAAATTTTGGCGGGATGSGC	
<i>atpD</i> *	atpDF2	GCTCGGACGTATTCTNAACGT	(Mousavi <i>et al.</i> , 2014)
	atpDR2	GCCGACACTTCAGANCCAGCCTG	
<i>glnA</i> *	glnAF2	AAGGGCGGCTAYTTCCCGGT	(Mousavi <i>et al.</i> , 2014)
	glnAR2	TGGAKCTTGTTCTTGATGCCG	
<i>ocs</i>	octF	GAATATGAGAAATCCGTCTCG	(F. Bini <i>et al.</i> , 2008)
	octR	ACTCAGAGCTCGTGGCCTTG	
<i>vis</i>	visF	TGCGCGAGTTGGTGAAGTTC	(F. Bini <i>et al.</i> , 2008)
	visR	CTATCTGAACCCAGAGCACC	

\* indicates primers used for the MLSA approach

### PCR amplifications and sequencing

DNA preparation for PCR amplification was performed as described previously (Campillo *et al.*, 2012). Briefly, cells from a single colony were resuspended in 10  $\mu$ L of 20 mM NaOH and incubated at 37°C for 5 min. Three microliters of this suspension were used for the PCR in reaction mixtures of 50  $\mu$ L. The primers used for PCR amplification in the present study are listed in Table 1. The primers used for amplification of the *atpD*, *glnA*, *rpoB*, and *thrC* genes in the present study were redesigned from primers used previously (Mousavi *et al.*, 2014) and adapted if necessary with *A. vitis* sequences available in the NCBI database.

Standard PCR was carried out in a 50  $\mu$ L reaction volume containing 34.6  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 6  $\mu$ L (2 mM) dNTPs, 1.2  $\mu$ L (2 mM) MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ L DMSO (Dimethyl sulfoxide), 1  $\mu$ L (10  $\mu$ M) of each primer, 0.2  $\mu$ L Taq DNA polymerase (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and 3  $\mu$ L of lysed cells. The PCR was performed using the following program: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at T<sub>m</sub>-5°C for 1min and extension at 72°C for 1 min, followed by an additional extension at 72°C for 3 min (T-One, Biometra, Germany). The quality and size of PCR products were checked by electrophoresis amplicons (6  $\mu$ L) on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. Amplification products were sequenced by GenoScreen (Lille, France).

## Sequence and phylogenetic analyses

In order to assign each sequence to the closest *recA* allele, *recA* sequences obtained in this study were then compared to a locally curated database of *recA* sequences database published previously (Shams *et al.*, 2013) complemented with new *recA* alleles available from recently sequenced genomes and *recA* alleles described by Lamovsek *et al.* (2014) (Table S1). Allele sequences that differed from a known allele by only one mismatch were not considered as new. When necessary, for *recA* sequence described in this study, a new allele number was given.

Phylogeny was inferred from gene sequences produced in this study or retrieved from the NCBI database. Gene sequence were aligned using the Clustal  $\omega$ 2 program within Seaview 4 package (Gouy *et al.*, 2010). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model was performed using MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013). The most appropriate model of evolution for each locus was used to construct the combined gene tree. Bootstrap analyses were performed with 500 replicates. The phylogenetic trees were visualized and annotated with FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## Virulence and assays on plants

The tumor-forming ability of isolates was determined by inoculating wounded stems of 3-week-old seedlings of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), cultivar Marmande (Haudecoeur *et al.*, 2009). Briefly, tomato were wounded at the top of the stem just under the second leaf, and were inoculated with 10  $\mu$ L ( $2.5 \cdot 10^6$  bacterial cells) of an overnight bacterial culture. Inoculated plants were maintained in greenhouse at 22°C, with a relative humidity between 50 and 80% and a photoperiod of 16h/8h light/dark. The presence or absence of tumor was visualized 3 weeks post-infection. *A. vitis* S4 and *A. fabrum* C58 strains were used as positive controls.

For the necrosis tests, explants were excised from greenhouse-grown vines and surface-disinfected during 20 min in ethanol 50 % and 5 min in ethanol 70 % (Herlache *et al.*, 2001). They were rinsed in sterile distilled water and cut into 1 cm long sections. Explants were supported vertically, with their basal end up, in 10 % water agar plates, and their aerial ends were inoculated with 2  $\mu$ L of bacterial suspension ( $10^7$  CFU/mL). Development of necrosis was scored over a period of 5 days. *A. fabrum* C58 and *A. vitis* S4 were used as a negative and positive controls respectively.

The hypersensitive response (HR) was determined by infiltration of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) with *A. vitis* cell suspensions (Herlache *et al.*, 2001). Leaves were infiltrated through a pin puncture by a needleless syringe with 200  $\mu$ L ( $10^7$  CFU/mL) of bacterial suspensions from overnight culture. *A. fabrum* C58 and *A. vitis* S4 were used as negative and positive controls respectively.

### **Analysis of plasmid content**

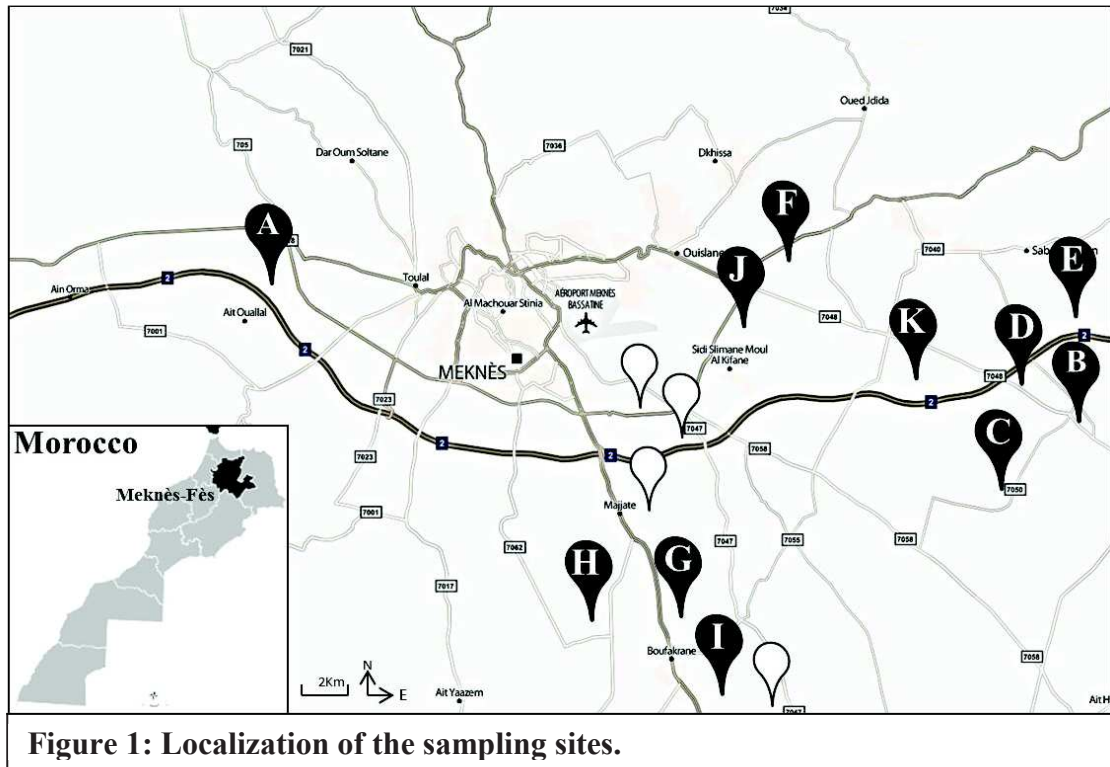
Plasmid profiles were determined by a modified Eckhardt agarose gel electrophoresis technique as previously described (Vial *et al.*, 2006). Isolates were grown overnight in YPG medium at 28°C. Electrophoresis was carried out at 5 V for 30 min and 85 V for 5 h at 4°C on a 0.7% agarose gel containing 1% sodium dodecyl sulfate. Plasmids sizes were estimated by comparison with those of *A. fabrum* C58 and *A. vitis* S4 (Slater *et al.*, 2009; Wood, 2001).

### **Opine analyses**

Tumors were collected on 3 weeks-old tomato plants post-inoculation, cut into small pieces and directly deeped into liquid nitrogen before being freeze-dried. The dried material was then ground into a fine powder (FastPrep®-24 homogenizer, MP Biomedicals, Illkirch, France) and stored at -20°C until extractions. Dried powder samples of 100 mg were extracted twice with 1 mL of MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80, vol/vol), with vortex homogenization and sonication for 10 min at room temperature. After centrifugation (14500 rpm, 10 min), the supernatants were combined and evaporated to dryness at 30°C in a Centrivap concentrator (Labconco, USA) and in a freeze-dryer (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Crude extracts obtained were weighed, dissolved in water at 10 mg/mL, filtered and stored at -80°C until analysis.

Opines analyses were performed on an UHPLC Agilent 1290 with a Poroshell 120 EC-C8 column (2.7 µm particle size, 100 mm × 3 mm, Agilent technologies) and coupled to an Accurate-Mass Q-TOF 6530 spectrometer (Agilent Technologies) used in positive ionization modes (ESI Agilent Jet Stream Technology). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and acidified water (0.4% formic acid) at a flow rate of 0.6 mL/min. Injections were carried out with 10 µL of extract or standard solutions. Detection of opines was based on their accurate mass, molecular formula and retention time compared to reference compounds. The following opines were used as references: (i) solutions of commercial octopine and nopaline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); (ii) cuccumopine, mannopine, mannopinic acid, agropine, and agropinic acid obtained by plants extraction and kindly provided by Dr. Y. Dessaux (I2BC, Gif sur Yvette, France); and (iii) a characterized extract of tomato tumor induced by *A. vitis* S4 known to produce vitopine (Chilton *et al.*, 2001). The UHPLC-MS QTOF device was managed by the Mass Hunter Workstation Acquisition B.07.00 software and the data reworks were performed with Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software (Agilent Technologies).





**Figure 1: Localization of the sampling sites.**

## Results:

### Non pathogenic *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* are present in grapevine tumors

In the vineyards of the Meknes region (Morocco), crown gall was observed only in recently planted vineyards (e.g. not observed in vineyards older than 10 years) (Figure 1 and Figure S1). From 1 to 10 isolates have been obtained from 25 tumors collected from 11 vineyards affected with crown gall disease, and 82 were characterized by amplification and sequencing of the *recA* gene using *Rhizobiaceae*-specific primers (Table S2). RecA sequences were compared to previously deposited sequences in the NCBI gene database and to a locally curated *recA* sequence database (Shams *et al.*, 2013). These isolates were found to belong to *A. tumefaciens* genomospecies G1 (6/82), G4 (1/82) or G7 (26/82), *Rhizobium rhizogenes* (10/82), and to *Allorhizobium vitis* (39/82) (Figure 2).

At the infra-specific level, G1 and G7 isolates were sub-divided into respectively 3 and 4 different types of *recA* sequence, on the basis of at least two nucleotide differences. Based on the *recA* alleles database, two new *recA* alleles were defined: *recA*-G7-14 for the *recA* sequence from BT4-7 isolate and *recA*-G7-15 for the *recA* sequence from the 21 out of 26 isolates belonging to the genomospecies G7 (i.e. AT1-3 and JT1-1). All the others *recA* sequences obtained in our study have been affiliated with an already described *recA* allele. Only one *recA* allele (designed as *recA*-Rrh-2) was detected for all isolates belonging to the *R. rhizogenes* species (Figure 2 and Table S2).



Virulence potential of these 33 *A. tumefaciens* and 10 *R. rhizogenes* isolates was assessed by a PCR targeting the pTi (primer pair VCF3/VCR3) and their ability to induce tumor on tomato was analyzed. Results obtained by PCR were in accordance with virulence assays on plant. Interestingly, all these isolates revealed to be non-pathogenic.

Several of these non-pathogenic isolates were detected within the same tumor. For example, the presence of isolates belonging to *A. tumefaciens* genomic species G1 and to *A. tumefaciens* genomic species G7 was observed for the BT4 tumor. For some tumors, especially from vineyard J, only non-pathogenic isolates were retrieved, even though several isolates could be isolated from a single tumor (Table S2). For such tumors, no amplification was obtained on total DNA extracted from tumor tissue using primers targeting sequences of Ti plasmid (data not shown).

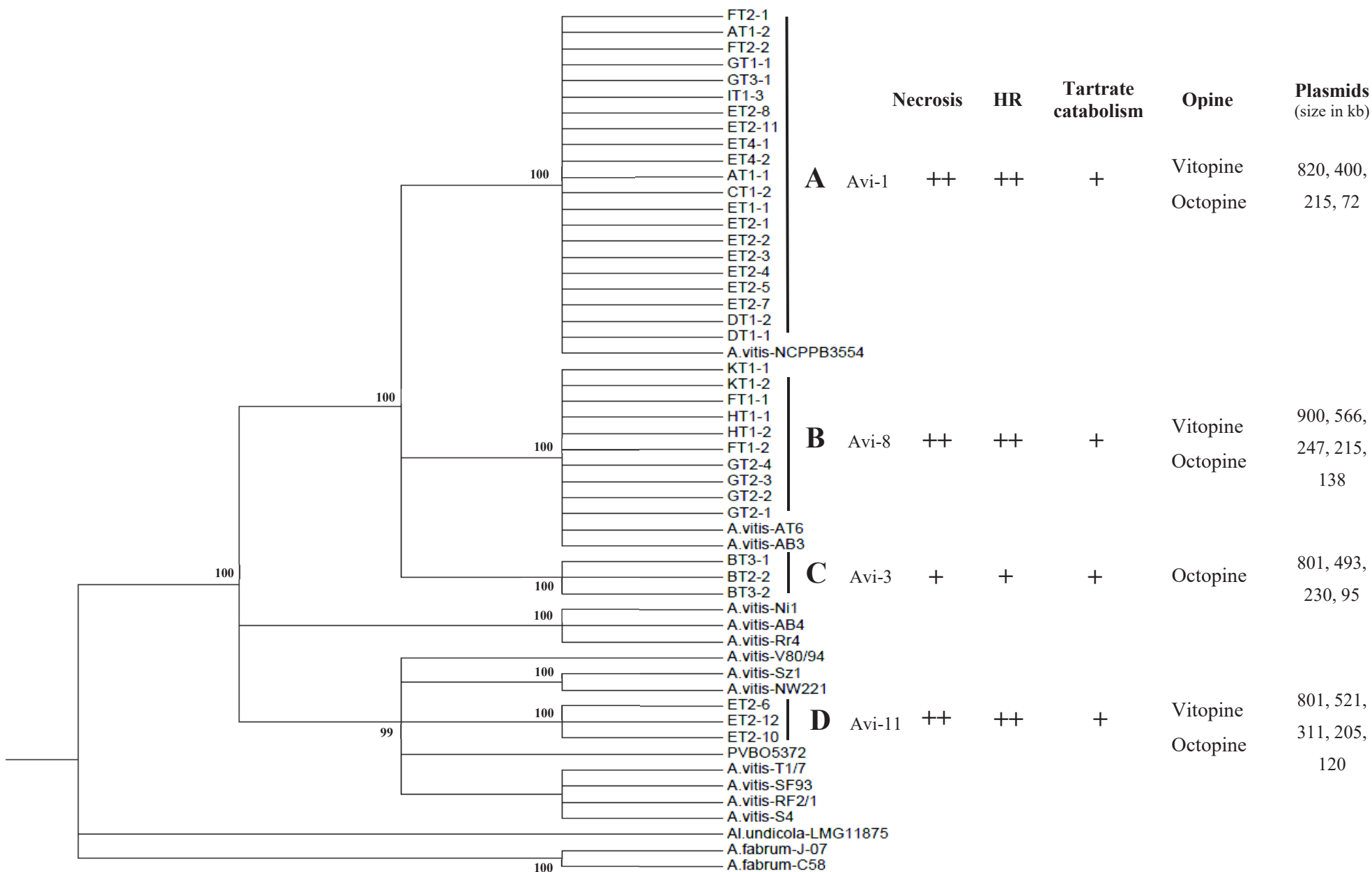
### ***Allorhizobium vitis* is the only causative agent of crown gall on grape in Morocco**

All the remaining 39 isolates belong to the species *Allorhizobium vitis* according to the sequences obtained for the *recA* gene (Figure 2 and Table S2). All these isolates are pathogenic and induced typical tumors *in vitro* on tomato plants (Figure S2). Moreover, for these isolates, an amplification product was obtained with primers VCF3 and VCR3, thus confirming the presence of a Ti plasmid (data not shown). To date, for *A. vitis*, nine *recA* alleles have been described (Shams *et al.*, 2013), and a new *recA* allele (Avi-10) detected from newly sequenced genomes was included in our analysis (Figure 2 and Table S1). At the infra-specific level, *A. vitis* isolates were divided into 4 different types of *recA* sequences, three corresponding to Avi-1, Avi-3 and Avi-8 *recA* alleles, and one corresponding to a new *recA* allele, Avi-11.

For *A. vitis* isolates, multilocus sequence analysis (MLSA) based on *atpD*, *glnA*, *thrC*, *recA*, and *rpoB* housekeeping loci revealed the separation of *A. vitis* isolates into four genomic groups (named A, B, C and D) as observed with the *recA* gene phylogenetic analysis (Figure 3). All isolates from one genomic group (excepting group D with 2 sequences types) exhibited identical sequences at all five housekeeping gene loci sequenced (Figure 3).

Moreover, all isolates from one genomic group showed the same plasmidic profile that differs from the one of the three other groups (Figure S3).

Isolates of groups A and B were recovered from various vineyards (respectively 7 and 4), whereas isolates of genomic group C and D were observed from only one vineyard, B and E respectively). Interestingly, the presence of isolates belonging to different genomic groups was observed with certain tumors, for instance tumors from vineyard J (Table S2). No correlation could be made between geographical origin of the isolates (vineyard) and phylogenetic groups. In the same way, no link between genomic group and the grapevine cultivar was observed.



**Figure 3 : Phylogenetic tree of five housekeeping genes from *Allorhizobium vitis* isolates.** Only bootstraps  $\geq 80$  are indicated in the tree. Data obtained from necrosis, hypersensitive response and plasmid content are presented opposite the tree.

Thus, among all isolates, only *A. vitis* ones revealed to be pathogenic and those can be separated into four genomic groups.

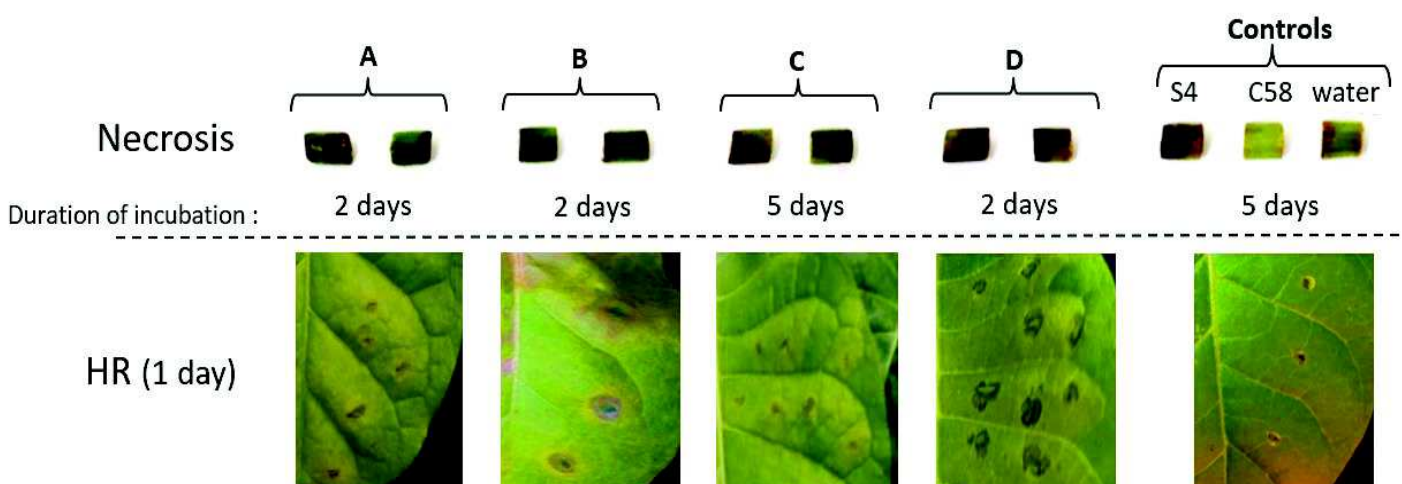
#### Definition of the *A. vitis* genomic groups correlates with specific pathogenic traits

Whatever the genomic groups of *A. vitis* strains, all isolates were able to use tartrate as carbon source for growth. This result was correlated to the amplification of the *ttuC* gene known to code a tartrate dehydrogenase (Crouzet and Otten, 1995) (Figure 3 and data not shown).

The ability to induce HR on tobacco leaves was assessed for several isolates of each *A. vitis* genomic group; even though all isolates induced HR, the severity of HR promoted by isolates from genomic group B and D was more pronounced than the one induced by other genomic groups (Figure 4).

Isolates from genomic group A, B and D caused necrosis on grapevine explants. A weak necrotic response was observed on grapevine explants inoculated by isolates of genomic group C, visible only 5 days after bacterial inoculation (Figure 4).

Finally, opines produced by the infected plant were searched for several isolates of each *A. vitis* group. Whereas octopine was the only opine detected in tumors obtained with isolates from genomic group C, both vitopine and octopine were identified in tumors induced by isolates of the three other genomic groups (Figure 3). Cuccumopine was also searched but has not been detected in any sample. The ability to produce opines was confirmed by PCR targeting genes encoding vitopine and octopine synthases; an amplification product for the vitopine synthase gene was obtained for isolates belonging to the group C and both genes were amplified for isolates belonging to groups A, B, D (data not shown). Hence, the four genomic groups can be distinguished by their aggressiveness, group C appearing the less aggressive.



**Figure 4: Hypersensitive response (HR) on tobacco leaves and necrosis on grape shoot explants.**

## Discussion

Our study shows that *recA* alone is definitively a good proxy for the genotyping of *Agrobacterium* and *Allorhizobium* species, since there is, to our knowledge no indication of lateral transfer for this gene (Costechareyre *et al.*, 2010; Shams *et al.*, 2013). So far, the *recA* marker has been mainly used for *Agrobacterium* isolates (Costechareyre *et al.*, 2010; Shams *et al.*, 2013); here we showed that primers initially designed when only two genomes of *A. vitis* were available are likely to be functional for assessing the whole diversity of *A. vitis* (in silico amplification on newly released genomes and characterization of a new allele). With this primers pair, it may be possible to type all the range of pathogenic and non-pathogenic *Rhizobiaceae* and to distinguish several alleles within a given species, as demonstrated for *A. vitis* (Shams *et al.*, 2013). For a survey of large populations of pathogenic and non-pathogenic agrobacteria, *recA* sequencing thus appears as a powerful enough tool; this implies that it might not be necessary to implement more time-consuming and costly techniques such as MLSA.

Some non-pathogenic *A. tumefaciens* isolates, have also been recovered from grapevine tumors, often within the same tumors that had been infected by *A. vitis*. Some of these *A. tumefaciens* isolates have been shown to utilize tartrate. This catabolic property encoded by plasmidic determinants has been often described in *A. vitis* and *A. tumefaciens* strains isolated from grapevine (Ridé *et al.*, 2000; Salomone *et al.*, 1998), this feature would be advantageous within the tumor as tartrate is the one of the main organic acid of grapevine (Kliwer, 1966). The fact that tumors are colonized not only by the pathogenic strain but also by non-pathogenic *A. tumefaciens* and also by other taxons has recently been reported by analyzing the tumor microbiome (Faist *et al.*, 2016). Strains belonging to the G1 and G7 genomospecies are classically isolated from soil (Bouri *et al.*, 2016; Costechareyre *et al.*, 2010; Lamovèk *et al.*, 2014) and their presence in tumors might reflect their presence in Moroccan soils. Although non-pathogenic, these *A. tumefaciens* strains have the potential to become pathogenic on grapevine by acquisition of a pTi. Interestingly, several tumors appeared to be free of pathogenic isolates (and colonized only by G7 *A. tumefaciens* isolates); one explanation is that sampling occurred at a late stage of the tumorigenic process.

Pathogenic *A. vitis* strains are able to make us of one or more opines (Burr *et al.*, 1998; Burr and Otten, 1999) and they are often classified using the opine synthase gene of their pTi, the most common types being octopine, nopaline, octopine/cuccumopine or vitopine (Argun *et al.*, 2002; Kuzmanović *et al.*, 2014; Szegedi *et al.*, 1988b). In our study, only a few *A. vitis* strains (group C) possess the ability to synthesize octopine whereas the majority of isolates are able to make both octopine and vitopine, a rather unusual situation. Only one report on an Italian *A. vitis* isolate (IPV-BO5372) was found to harbor

vitopine and octopine synthase genes (F. Bini et al., 2008). However, production of both opines were not confirmed by a biochemical approach in this study. Our isolates may carry a pTi with an unorthodox T-DNA or several T-DNA; another hypothesis is the coexistence of two pTi (one coding for octopine synthase and one coding for vitopine synthase) within a single strain, as suggested previously (F. Bini et al., 2008). Indeed, those two pTi are supposed to belong to different incompatibility groups (Szegedi et al., 1996).

Ours study revealed that among the 82 isolates from the Moroccan vineyards, *A. vitis* strains were predominant and were the only pathogenic strains. Although it is sometimes necessary to use several host plants for assessing pathogenicity of *A. vitis* strains (Tolba and Zaki, 2011; Kuzmanović et al., 2014), all our *A. vitis* isolates revealed to be virulent on tomato, and this may indicate the relative genetic homogeneity of the pTi carried by our isolates. It is noteworthy that the genetic diversity of the *A. vitis* strains isolated in our study is relatively narrow, with only four genomic groups, a situation contrasting with previous studies (Kawaguchi, 2009). Several features may indicate a foreign origin of contamination linked to the importation of infected grapevines (Red Glob and Muscat): (i) absence of disease symptoms on older grapevines of the Meknes region; (ii) low diversity of the pathogenic *A. vitis* isolates; (iii) presence of isolates belonging to the same genetic group within different vineyards; (iv) specific opine signature that has never been previously reported. Moreover, as *A. vitis* is a systemic bacterium that can live in lag phase on grapevine tissue without producing symptoms until encountering favorable conditions for infection (Burr et al., 1998), the pathogen can be easily disseminated by grafted material, facilitating the spread of the pathogen.

### **Acknowledgements**

This study was supported by PRAD 14-08 project “Biological control against *Agrobacterium vitis* agent causal of Crown gall of grapevine” and the regional center of the National Institute for Agricultural Research Meknes (INRA). The authors are grateful to Elise Lacroix for technical assistance. This work made use of the technical platform “Serre” at FR 41 (Université Lyon 1), as well as “Centre d’Etude des Substances Naturelles” (UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne).

## References:

- Argun, N., Momol, M.T., Maden, S., Momol, E.A., Reid, C.L., Celek, H., Burr, T.J., 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Dis.* 86, 162–166.
- Bini, F., Kuczmog, A., Putnoky, P., Otten, L., Bazzi, C., Burr, T.J., Szegedi, E., 2008. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47, 181–189.
- Bouri, M., Chattaoui, M., Gharsa, H., Mcclean, A., Kluepfel, D., Nesme, X., Rhouma, A., 2016. ANALYSIS OF *Agrobacterium* POPULATIONS ISOLATED FROM TUNISIAN SOILS: GENETIC STRUCTURE, AVIRULENT-VIRULENT RATIOS AND CHARACTERIZATION OF TUMORIGENIC STRAINS. *J. Plant Pathol.* 98, 212–239.
- brisbane, P.G., Kerr, A., 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Microbiol.* 54, 425–431.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L., 1998. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82, 1288–1297.
- Burr, T.J., Katz, B.H., 1984. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Dis* 68.
- Burr, T.J., Otten, L., 1999. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 53–80.
- Campillo, T., Lavire, C., Shams, M., Pothier, J.F., Pulawska, J., 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 fof bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *J. Plant Pathol.* 94, 97–104.
- Chilton, W.S., Petit, A., Chilton, M.-D., Dessaux, Y., 2001. Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. *Phytochemistry* 58, 137–142.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y., Nesme, X., 2010. Rapid and Efficient Identification of *Agrobacterium* Species by recA Allele Analysis: *Agrobacterium recA* Diversity. *Microb. Ecol.* 60, 862–872. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7>
- Creasap, J.E., Burr, T.J., 2006. Grape Crown Gall. Cornell Univ. Cornell Univ. Ext. N. Y. State Integr. Pest Manag. Program Ithaca N. Y.
- Crouzet, P., Otten, L., 1995. Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from *Agrobacterium vitis*. *J. Bacteriol.* 177, 6518–6526.
- Dessaux, Y., Petit A., Farrand S. K., Murphy P.J., 1998. Opines and Opine-Like Molecules Involved in Plant-*Rhizobiaceae* Interactions. Kluwer Acad. Publ. Chapitre 9, 171–197.
- Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., Deeken, R., 2016. Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5542–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
- Genov, I., Atanassov, I., Tsvetkov, I., Atanassov, A., 2006. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. *VITIS-J. Grapevine Res.* 45, 97.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Haudecoeur, E., Tannières, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., Faure, D., 2009. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 529–537.

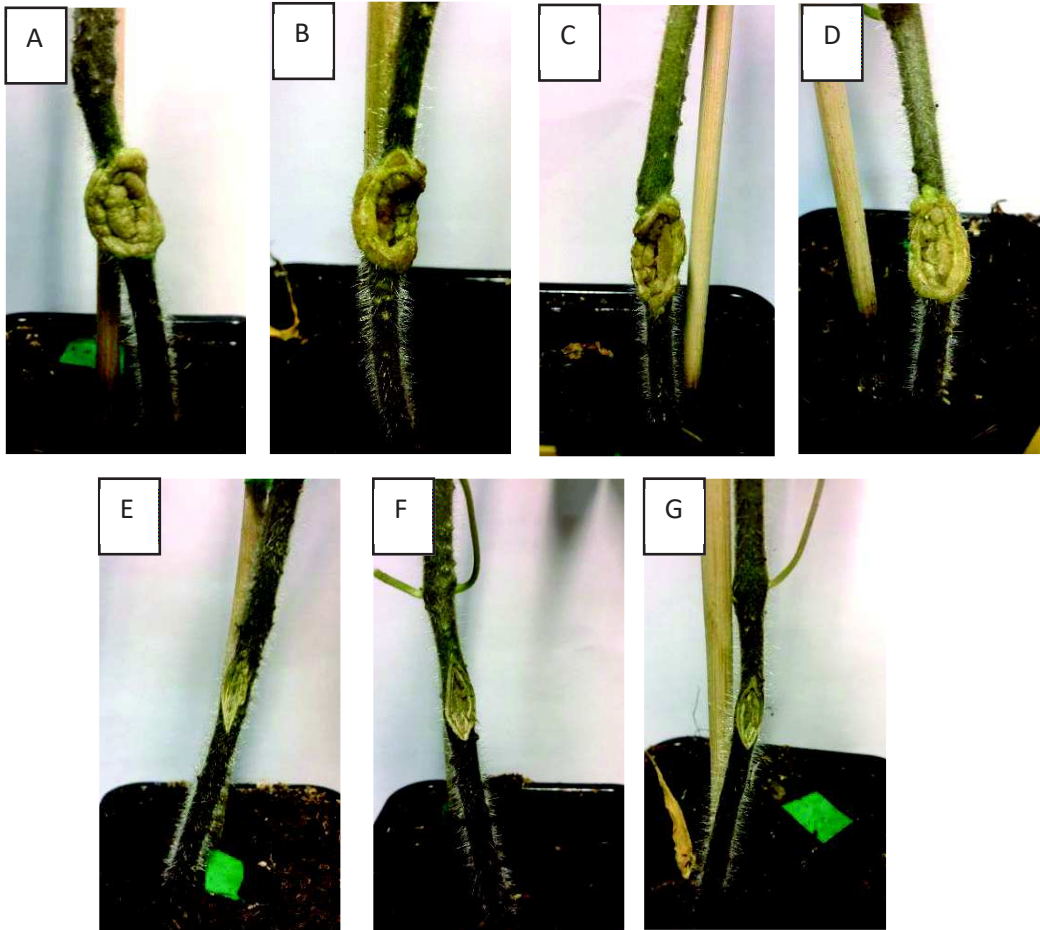


- Herlache, T.C., Zhang, H.S., Ried, C.L., Carle, S.A., Zheng, D., Basaran, P., Thaker, M., Burr, A.T., Burr, T.J., 2001. Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology* 91, 966–972.
- Kado, C.I., 2014. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
- Kawaguchi, A., 2009. Studies on the diagnosis and biological control of grapevine crown gall and phylogenetic analysis of tumorigenic *Rhizobium vitis*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 462–463. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0196-7>
- Kawaguchi, A., Inoue, K., Nasu, H., 2005a. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 422–430. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0234-z>
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Inoue, K., Nasu, H., 2005b. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 54–59. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0160-5>
- Kerr, A., Panagopoulos, C.G., 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control.pdf. *Phytopathology* 90, 172–179.
- Kerstens, K., De Ley, J., Sneath, P.H.A., Sackin, M., 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *Microbiology* 78, 227–239.
- Kliwer, W.M., 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 41, 923–931.
- Kuzmanović, N., Biondi, E., Bertaccini, A., Obradović, A., 2015. Genetic relatedness and recombination analysis of *Allorhizobium vitis* strains associated with grapevine crown gall outbreaks in Europe. *J. Appl. Microbiol.* 119, 786–796. <https://doi.org/10.1111/jam.12858>
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Zlatković, N., Obradović, A., 2014. Characterization and phylogenetic diversity of *Agrobacterium vitis* from Serbia based on sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 757–768. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0507-5>
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2013. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 467–481. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130199bl>
- Lamovèk, J., Stare, B.G., Gregor, U., 2014. Isolation of non-pathogenic *Agrobacterium* spp. biovar 1 from agricultural soils in Slovenia. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 130–139.
- Mougel, C., Cournoyer, B., Nesme, X., 2001. Novel Tellurite-Amended Media and Specific Chromosomal and Ti Plasmid Probes for Direct Analysis of Soil Populations of *Agrobacterium* Biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 65–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.65-74.2001>
- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., Lindström, K., 2014. Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., Lindström, K., 2015. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>
- Ophel, K., Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 40, 236–241.
- Orel, D.C., Reid, C.L., Fuchs, M., Burr, T.J., 2017. Identifying Environmental Sources of *Agrobacterium Vitis* in Vineyards and Wild Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic. ajev.* 2016.16085. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16085>

- Palacio-Bielsa, A., González-Abolafio, R., Álvarez, B., Lastra, B., Cambra, M.A., Salcedo, C.I., López, M.M., Penyalver, R., 2009. Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumours. *Plant Pathol.* 58, 584–593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01984.x>
- Popoff, Y., Kersters, K., Kiredjan, M., Miras, I., Coynault, C., 1984. Position taxonomique de souches de *Agrobacterium* d'origine hospitalière. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 135, 427–442.
- Ramírez-Bahena, M.H., Vial, L., Lassalle, F., Diel, B., Chapulliot, D., Daubin, V., Nesme, X., Muller, D., 2014. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium*/Rhizobium supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Mol. Phylogenet. Evol.* 73, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.005>
- Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y., Gardan, L., 2000. Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar 1, 2, and 3 strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1818–1825.
- Salomone, J.-Y., Szegedi, E., Cobanov, P., Otten, L., 1998. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 836–838.
- Shams, M., Lavire, C., Muller, D., Vial, L., Campillo, T., Nesme, X., 2012. Rapid and efficient methods to isolate, type strains and determine species of *Agrobacterium* spp. in pure culture and complex environments, Intech. ed, Intech. INTECH Open Access Publisher.
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X., Lavire, C., 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.002>
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K.L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H., Wood, D.W., 2009. Genome Sequences of Three *Agrobacterium* Biovars Help Elucidate the Evolution of Multichromosome Genomes in Bacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2501–2511. <https://doi.org/10.1128/JB.01779-08>
- Süle, S., Burr, T.J., 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars. *Plant Pathol.* 47, 84–88.
- Szegedi, E., Bottka, S., Mikulás, J., Otten, L., Sule, S., 2005. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis* 44, 49–54.
- Szegedi, E., Czakó, M., Otten, L., Koncz, C.S., 1988. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 237–247.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tolba, I.H., Zaki, M.F., 2011. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Ann. Agric. Sci.* 56, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2011.06.001>
- Vial, L., Cuny, C., Gluchoff-Fiasson, K., Comte, G., Oger, P.M., Faure, D., Dessaux, Y., Bally, R., Wisniewski-Dyé, F., 2006. N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule: AHL-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 155–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00153.x>
- Wood, D.W., 2001. The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317–2323. <https://doi.org/10.1126/science.1066804>

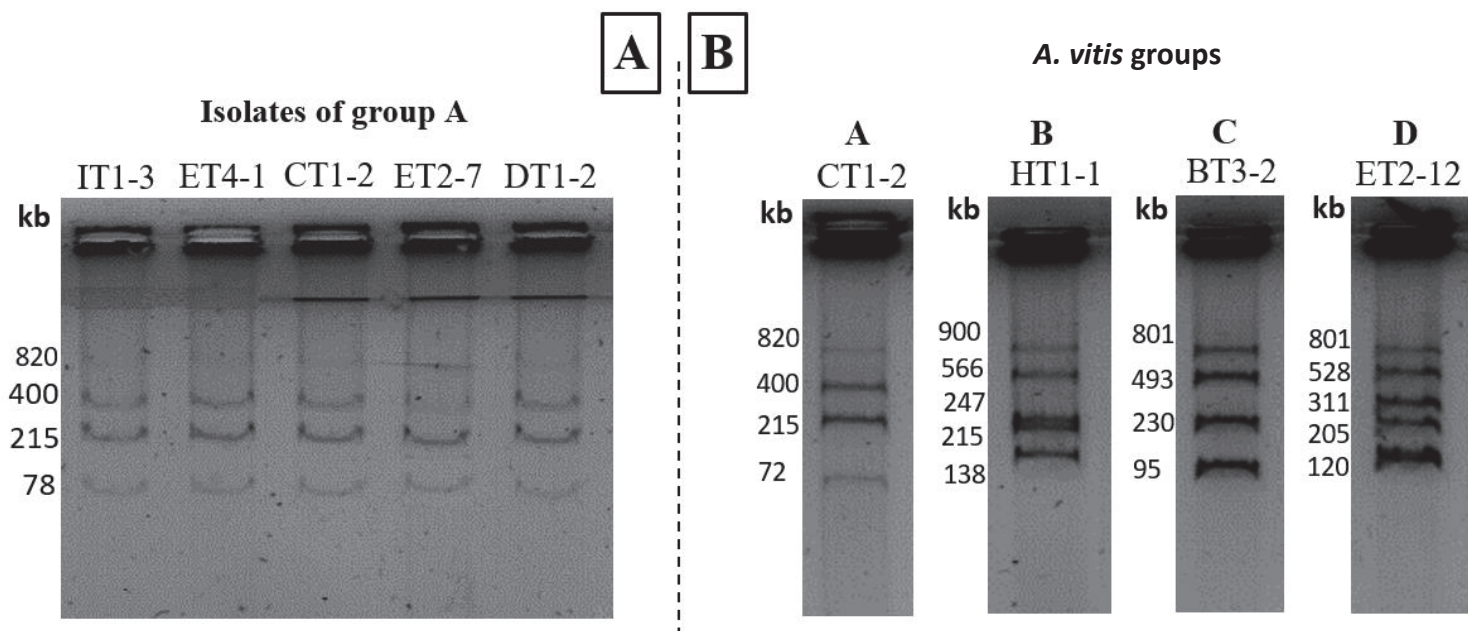


**Supplemental Figure 1:** Grapevine showing crown gall symptoms from vineyard B.



**Supplemental Figure 2 : Pathogenicity of different *A. vitis* and *A. tumefaciens* strains on tomato plants.**

A : *A. vitis* ET2-4 (*Avi-1*, group A), B : *A. vitis* BT2-2 (*Avi-8*, group B), C : *A. vitis* GT2-4 (*Avi-3*, group C), D : *A. vitis* ET2-12 (*Avi-11*, group D), E : *A. tumefaciens* AT2-1 (*recA-G1*), F : *A. tumefaciens* BT4-3 (*recA-G4*), G : *A. tumefaciens* JT5-2 (*recA-G7*).



Supplemental Figure 3: Plasmid profiles of *A. vitis* isolates.

**Supplemental Table 1 : recA alleles of *A. tumefaciens* G4, G7 and *A. vitis* species.**

Allele name	Allele reference strain	Accession n°	Reference
<b><i>A. tumefaciens</i> genomovar G1</b>			
<i>recA</i> -G1-1	ICPB TT111	FM164286	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-2	CFBP 5771	FM164294	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-3	S56	FM164289	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-4	CFBP 5622	FM164291	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-5	CFBP 2712	FM164292	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-6	CFBP 2517	FM164293	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-7	CFBP 7067	FM164295	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-8	CFBP 7064	FM164297	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-9	CFBP 7066	FM164298	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G1-10	Fb243	deposit in progress	Shams <i>et al.</i> , 2013
<i>recA</i> -G1-11	H13-3	AGROH133_07016	Wibberg <i>et al.</i> , 2011
<i>recA</i> -G1-12	Foundi	deposit in progress	Shams <i>et al.</i> , 2013
<i>recA</i> -G1-13	5A	AGVZ00000000	Hao <i>et al.</i> , 2012
<i>recA</i> -G1-14	R-46040	FR772678	De Meyer <i>et al.</i> , 2011
<i>recA</i> -G1-15	At 8-3	KC291956	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-16	At 4-1	KC291968	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-17	At 26-1	KC291973	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-18	At 13-1	KC291976	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-19	At 51-1	KC291979	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-20	At 55-2	KC291980	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-21	At 72-3	KC291981	Lamovsek <i>et al.</i> , 2014
<i>recA</i> -G1-22	DC13-042	deposit in progress	Unpublished
<b><i>A. tumefaciens</i> genomovar G7</b>			
<i>recA</i> -G7-1	RV3	FM164321	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-2	NCPPB 1641	FM164322	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-3	Zutra 3/1	FM164323	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-4	GF78	FM164339	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-5	AR29	FM164337	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-6	AR94	FM164338	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-7	AR92	FM164340	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-8	AR118	FM164336	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-9	CH6	FM955141	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-10	DC07-029	FM164341	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i> -G7-11	MKS-05	deposit in progress	Shams <i>et al.</i> , 2013
<i>recA</i> -G7-12	MKS-04	deposit in progress	Shams <i>et al.</i> , 2013
<i>recA</i> -G7-13	Cherry2E-2-2	APCCv1_1050002	Unpublished
<b><i>A. vitis</i></b>			
<i>recA</i> -Avi-1	K309 <sup>T</sup>	FR847962	Shams <i>et al.</i> , 2013
<i>recA</i> -Avi-2	S4	CP000633	Slater <i>et al.</i> , 2009
<i>recA</i> -Avi-3	NKZ-2	AB543861	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-4	IS552-1	AB543847	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-5	G-Ag-67	AB543860	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-6	UK-2	AB543845	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-7	MAFF 211677	AB543837	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-8	ARK-2	AB608984	Kawaguchi, unpublished
<i>recA</i> -Avi-9	VAR06-30	AB285087	Kawaguchi, 2011
<i>recA</i> -Avi-10	AB4	BBI04_12375	Unpublished

**Supplemental Table 2 : Characterization of isolates from grapevine tumors of Morocco, Meknes region.**

Station	Grapevine cultivar	Age of grapevine	Isolate	<i>recA</i> allele	Tartrate utilisation	pTi detection
A	Sultanine	1 year	AT1-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			AT1-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			AT1-3	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			AT1-4	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			AT1-5	<i>recA-G1-15</i>	-	-
			AT2-1	<i>recA-G1-14</i>	+	-
B	Red Glob	4-5 years	BT1-1	<i>recA-G7-5</i>	-	-
			BT1-2	<i>recA-G7-5</i>	-	-
			BT2-1	<i>recA-G1-7</i>	-	-
			BT2-2	<i>recA-Avi-8</i>	+	+
			BT3-1	<i>recA-Avi-8</i>	+	+
			BT3-2	<i>recA-Avi-8</i>	+	+
			BT4-1	<i>recA-Avi-2</i>	+	+
			BT4-2	<i>recA-G7-5</i>	+	-
			BT4-3	<i>recA-G4-2</i>	-	-
			BT4-4	<i>recA-G1-7</i>	-	-
			BT4-5	<i>recA-G1-7</i>	-	-
			BT4-6	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
			BT4-7	<i>recA-G7-14</i>	-	-
			BT4-8	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
BT4-9	<i>recA-G7-5</i>	-	-			
BT4-10	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-			
BT4-11	<i>recA-G7-15</i>					
C	Red Glob	3 years	CT1-1	<i>recA-Rrh-2</i>	-	+
			CT1-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			CT1-3	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
			CT1-4	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
D	Red Glob	3 years	DT1-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			DT1-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
E	Red Glob	4-5 years	ET1-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-3	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-4	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-5	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-6	<i>recA-Avi-11</i>	+	+
ET2-7	<i>recA-Avi-1</i>	+	+			

			ET2-8	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-9	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-10	<i>recA-Avi-11</i>	+	+
			ET2-11	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET2-12	<i>recA-Avi-11</i>	+	+
			ET3-1	<i>recA-G1-7</i>	-	-
			ET4-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			ET4-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
<b>F</b>	Red Glob	4-5 years	FT1-1	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			FT1-2	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			FT2-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			FT2-2	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
<b>G</b>	Red Glob	2 years	GT1-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			GT2-1	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			GT2-2	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			GT2-3	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			GT2-4	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			GT3-1	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
<b>H</b>	Red Glob	4 years	HT1-1	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			HT1-2	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
<b>I</b>	Red Glob	3 years	IT1-1	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
			IT1-2	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
			IT1-5	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
			IT1-3	<i>recA-Avi-1</i>	+	+
			IT1-4	<i>recA-Rrh-2</i>	-	-
<b>J</b>	Tidlis	3 years	JT1-1	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT1-2	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT1-5	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT1-3	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT1-4	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT3-1	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT4-1	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT4-4	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT4-2	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT5-1	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT5-2	<i>recA-G7-15</i>	+	-
			JT6-1	<i>recA-G7-15</i>	+	-
			JT6-2	<i>recA-G7-15</i>	-	-
			JT7-1	<i>recA-G7-15</i>	+	-
			JT7-2	<i>recA-G7-15</i>	+	-
JT7-3	<i>recA-Avi-3</i>	+	+			



			JT7-4	<i>recA-G7-15</i>	+	-
			JT7-5	<i>recA-G7-15</i>	-	-
<b>K</b>	Red Glob	5-6 years	KT1-1	<i>recA-Avi-3</i>	+	+
			KT1-2	<i>recA-Avi-3</i>	+	+

## Chapitre 2 : Caractérisation d'un système de quorum sensing atypique chez *Allorhizobium vitis* S4

### Préambule

Les cellules bactériennes ont la particularité d'être en interaction directe avec leur environnement. Cette caractéristique leur permet de capter des signaux environnementaux qui ont de nombreuses répercussions sur la physiologie de la bactérie. Si ces signaux sont de nature biotique, un phénomène de communication entre l'émetteur du signal et la bactérie s'établit. Certains de ces signaux sont détectés au niveau de la membrane externe entraînant ainsi l'activation d'un régulateur intracellulaire grâce à un système à deux composants, d'autres pénètrent dans la cellule par diffusion et interagissent directement avec des protéines régulatrices. De nombreux systèmes de communication via des molécules signal diffusant facilement de l'extérieur vers l'intérieur des cellules bactériennes existent (Hughes and Sperandio, 2008; West and Stock, 2001). Ces mécanismes permettent des communications entre individus de la même espèce mais aussi entre individus d'espèce, de genre voire de règnes différents (Federle and Bassler, 2003).

Au sein des bactéries, le quorum sensing (QS) est un mécanisme de communication permettant de réguler l'expression de gènes de manière synchronisée grâce à la synthèse de molécules signal appelées autoinducteurs. Différents types de systèmes QS existent, classés en fonction du type de molécules signal utilisé. Chez les bactéries à Gram positif, des peptides sécrétés grâce à des transporteurs ABC permettent l'activation de système à deux composants des bactéries réceptrices. Ces systèmes à deux composants vont par la suite entraîner une cascade de phosphorylation/déphosphorylation aboutissant à la régulation des gènes cibles (Kleerebezem *et al.*, 1997; West and Stock, 2001). Chez les bactéries à Gram négatif, plusieurs systèmes QS sont connus, et peuvent parfois être retrouvés au sein d'une même bactérie. Le système de communication basé sur la synthèse d'autoinducteurs AI-2 permet l'activation de systèmes à deux composants qui vont par la suite réguler les gènes cibles (Galloway *et al.*, 2011). Le deuxième type de système QS se caractérise par la présence d'un couple de gènes généralement de type *luxI-luxR*. La protéine LuxI permet la synthèse des molécules signal de type *N*-acyle homosérine lactone (AHL) et la protéine LuxR est un régulateur qui, une fois complexé à des AHL, se fixe sur les régions promotrices des gènes cibles (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009).

Le système de QS *tral-traR*, de type *luxI-luxR*, est présent sur le plasmide Ti (pTi) connu pour conférer à ces bactéries hôtes la capacité d'induire la galle du collet, une phyto bactériose provoquant d'importantes pertes économiques (Fuqua and Winans, 1994). Il est retrouvé chez des bactéries du

genre *Agrobacterium* lui permettant ainsi d'induire la galle du collet chez large gamme d'espèces de plante et chez des *Allorhizobium vitis* pouvant provoquer la galle du collet uniquement chez la vigne (Burr and Otten, 1999; Kado, 2014). Le système *traI-traR* étant impliqué dans la régulation du transfert conjugatif du pTi et par conséquent dans la transmission de la capacité à induire la galle du collet, il a fait l'objet de nombreuses études (Lang and Faure, 2014). Au contraire, d'autres plasmides présents chez des souches de *Agrobacterium* et *Allorhizobium* possèdent également des mécanismes de QS mais demeurent très peu étudiés (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016). *Allorhizobium vitis* S4 héberge 5 plasmides parmi lesquels le pTi ainsi que deux autres plasmides possèdent des systèmes QS. Des premières analyses phylogénétiques ont révélé que le système QS présent sur le p212 est un système *traI-traR* très proche de celui porté par le pTi alors que celui porté par le p130 semble permettre la synthèse d'une molécule atypique.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la molécule signal synthétisée par ce système QS porté par le p130, puis nous avons recherché les gènes et les mécanismes régulés par ce système QS par une analyse du transcriptome de la souche sauvage en parallèle de celui d'une souche mutée pour ce système de QS. Les résultats ont été complétés par une comparaison de différents phénotypes de la souche sauvage et de la souche mutée.

## **Contributions personnelles**

Cet axe a été initié au début de ma thèse : des mises au point ont donc été nécessaires afin de transposer au modèle *A. vitis* de nombreux protocoles (transformations, conjugaisons...) développés et maîtrisés au sein de l'équipe sur le modèle *A. fabrum* C58. J'ai conduit l'ensemble des expériences présentées dans l'article, que ce soit les constructions génétiques, les analyses pour la caractérisation des molécules signal (en testant différents protocoles d'extraction des molécules de QS et en réalisant la quantification des molécules). L'utilisation de la vigne comme plante modèle n'était pas disponible au sein de l'équipe au début de ce travail, j'ai ainsi pu développer la culture *in vitro* de la vigne grâce à des échanges avec des équipes de recherche maîtrisant cette culture. D'autres protocoles ont été mis au point ou adaptés en utilisant des données de la littérature (nécrose, HR, swarming...). J'ai enfin réalisé la majorité des analyses bio-informatiques comprenant les comparaisons des séquences protéiques, l'alignement et la comparaison des gènes et les analyses phylogénétiques.

# A new plasmidic quorum sensing system in *Allorhizobium vitis* S4 regulates conjugal transfer

Quentin DUPLAY<sup>1</sup>, Aurélie MIOMANDRE<sup>1</sup>, Gilles COMTE<sup>1</sup>, Isabelle KERZAON<sup>1</sup>, Florence WISNIEWSKI-DYÉ<sup>1</sup> and Ludovic VIAL<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>CNRS, INRA, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

\* Corresponding author:

Ludovic Vial, Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne cedex, France, E-mail: ludovic.vial@univ-lyon1.fr

Informative title: **Quorum sensing in *Allorhizobium vitis* S4**

Key words: quorum sensing, *Allorhizobium vitis*, plasmid, *N*-acyl homoserine lactone, crown gall, *Agrobacterium*

## Introduction

Bacteria often use an intercellular communication system, known as quorum sensing (QS), to regulate functions in a population-density-dependent manner. Due to the production and detection of signaling molecules called “autoinducers”, bacteria of a given population are able to evaluate their cell density. Gram-negative bacteria mainly use LuxI/LuxR-like QS system for communication (d’Angelo-Picard *et al.*, 2005; Sanchez-Contreras *et al.*, 2007; Wisniewski-Dyé and Downie, 2002), which was first described in the marine bacterium *Vibrio fischeri* (Stevens and Greenberg, 1997). This system relies on *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) as signaling molecules. AHLs are mainly produced by LuxI-type AHL synthases and consist of a homoserine lactone (HSL) ring bound to an acyl chain via an amide bond. A LuxI synthase can drive the synthesis of one or several different AHLs (Wagner-Döbler *et al.*, 2005; Wisniewski-Dyé and Downie, 2002). Binding of AHLs to their cognate LuxR-like regulators triggers gene expression from specific promoters (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009; Papenfort and Bassler, 2016).

Within the *Rhizobiaceae* family, LuxI/LuxR-like QS regulatory systems are often carried by plasmids (He *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2009; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016; Tun-Garrido *et al.*, 2003). One of the most studied system controls the conjugative transfer of pTi (for tumour inducing plasmid). This plasmid, which is present in some *Agrobacterium tumefaciens* and *Allorhizobium vitis* strains, carries genes required for plant pathogenicity, as those genes direct the transformation of plant cells, an event leading to plant tumors (Christie *et al.*, 2014; Fuqua and Winans, 1994; García-Rodríguez *et al.*, 2006). Conjugative transfer of pTi between agrobacteria results in dissemination of the genetic determinants causing the disease (Fuqua and Winans, 1994; Lang and Faure, 2014; Piper *et al.*, 1993). The pTi QS system is composed of *traI*, the product of which directs the synthesis of 3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone (3-O-C<sub>8</sub>-HSL), and of *traR* encoding the LuxR-like regulator. The binding of 3-O-C<sub>8</sub>-HSL molecules to TraR dimers induces expression of genes involved in replication (*rep*) and conjugal transfer (*tra* and *trb* operons encoding products of a type 4 secretion system) of pTi (Fuqua *et al.*, 1994; Lang and Faure, 2014). *traR* expression, 3-O-C<sub>8</sub>-HSL production and consequently pTi transfer solely occur within tumors, as these events require compounds synthesized by transformed plant cells, i.e. opines (Piper *et al.*, 1993, 1999). The *traI-traR* system, which has been extensively studied in *A. fabrum* C58 (formerly known as *A. tumefaciens* C58), appears to be present on all the pTi studied to date, always drives the synthesis of 3-O-C<sub>8</sub>-HSL and solely regulates replication and conjugal transfer of pTi (Lang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

pTi is also harboured by pathogenic strains of *Allorhizobium vitis* (formerly *Agrobacterium vitis* Mousavi *et al.*, 2014). Those strains are able to trigger crown gall disease but exclusively on grapevine, leading to poor vine growth, reduced production of grape and sometimes plant death (Burr *et al.*,

1998). Among the 5 plasmids hosted by the model strain *A. vitis* S4, three QS systems have been identified: (i) the *tral-traR* system, Avi\_8335-Avi\_8300, of pTi (p259) supposedly regulating plasmid transfer due to its identity to that of pTiC58 (Lowe *et al.*, 2009) ; (ii) a *tral-traR* system, Avi\_9270-Avi\_9195 located on the p212 tartrate-catabolic plasmid (Szegedi *et al.*, 1992) that is also likely to regulate plasmid transfer given the high gene identities and similar gene organization compared to the pTi QS system (Lowe *et al.*, 2009); (iii) a third *luxI-luxR* system, Avi\_9666-Avi\_9665, located on the p130 plasmid (Slater *et al.*, 2009). *A. vitis* strains also possess chromosomal QS genes, two of which, *avsI-avsR*, that have been characterized in strain F2/5 and found to be associated with swarming motility, induction of a hypersensitive response on tobacco and necrosis on grape (Burr and Otten, 1999; Herlache *et al.*, 2001; Süle *et al.*, 2009).

Interestingly, the synthase encoded by p130 (Avi\_9666) seems to belong to a family of atypical AHL synthases that prefer acyl-CoA substrate over acyl-ACP substrate, classically used by AHL synthases (Dong *et al.*, 2017; Lindemann *et al.*, 2011). The other relevant features of these atypical synthases is that they produce their cognate AHL molecule at relatively low concentrations (Dong *et al.*, 2017; Lindemann *et al.*, 2011) and some direct the synthesis of atypical aryl-HSL (Ahlgren *et al.*, 2011a; Schaefer *et al.*, 2008).

The objective of this study was to investigate the role of the QS system of the p130 plasmid. We first undertook the characterization of the molecule synthesized by Avi\_9666 (named Apil), an atypical AHL related to 3-O-C<sub>12</sub>-HSL, and then demonstrated that although this QS system regulates p130 transfer as suspected, it regulates other functions.

## Material and methods

### Media and bacterial growth conditions

Bacterial strains and plasmid used in this study are listed in Table S1. Strains of *A. vitis* were grown on TY agar or broth (Atlas, 2010) complemented with 6 mM of CaCl<sub>2</sub> at 28 °C. *Agrobacterium tumefaciens* UIA5 was grown on YPG (yeast extract 5g/L; Bacto peptone 5g/L; glucose 10 g/L; pH 7.2) agar or broth (Campillo *et al.*, 2012). *Escherichia coli* was cultured on LB agar or broth at 37 °C (Atlas, 2010). Antibiotics were used at the following concentrations (µg/mL): for *E. coli*, ampicillin (75) and gentamycin (15), for *A. vitis* kanamycin (25), neomycin (25) and gentamycin (15); and for *A. tumefaciens* gentamycin (15), and tetracycline (12.5).

For extraction and purification of QS molecules, *A. vitis* strains were grown on AT medium (Petit *et al.*, 1978) supplemented with 10 mM succinate as a carbon source and 10 mM ammonium sulphate as a nitrogen source.

### Strains constructions

The S4Δ*apil* and S4Δ*avsl* strains were constructed by double recombination using the suicide vector pJQ200sk according to a strategy described previously (Lassalle *et al.*, 2011). The vector containing the recombinant region (amplified by PCR with specific primers listed in Table S2), flanking downstream and upstream of the selected gene, was electroporated into *E. coli* SM10 cells. The resulting plasmid was mobilized from *E. coli* SM10 into *A. vitis* S4 by biparental mating (Taylor *et al.*, 1989). Single-crossover integration was selected by gentamycin resistance on TY medium plates. Gentamycin-resistant colonies were spread on TY plates containing 5% of sucrose to obtain plasmid excision and double-crossover events. Deletions were confirmed by PCR analysis. The *A. vitis* S4p130::NeoKan<sup>R</sup> and *A. vitis* S4pTi::Gm<sup>R</sup> strains were respectively constructed by insertion of the *aphT* gene from pKD4 in the non-coding region (neutral genetic locus) between genes *Avi\_9525* and *Avi\_9526* of the p130 and by insertion of the gene *aacC1* from pOT1e in the non-coding region between genes *Avi\_8020* and *Avi\_8021* of the pTi.

The gene *Avi\_9665* (*apiR*) was inactivated by a single cross-over event. A 420 bp internal fragment of *apiR* was amplified using primers *apiR-F* and *apiR-R* (Table S2 in the supplemental material) and cloned into the pJQ200sk. A single crossover event was then realized leading to the integration of the pJQ200sk-*apiR* in *apiR* causing its inactivation (S4 *apiR*::Gm). Clones were selected by gentamycin resistance on TY medium plates and confirmed by PCR analysis.

To complement the *apil* deletion, a fragment containing the *apil* gene and its flanking regions was amplified using primers *apilcompF* and *apilcompR*, digested using *Apal* and *SpeI* enzymes and

cloned into the plasmid pBBR1-MCS5 digested with the same enzymes. The pBBR1-MCS5::*apil* was then introduced into *S4Δapil* strain by electroporation and gentamycin-resistant colonies were selected on TY medium plates.

A reporter strain was constructed with the pOT1e plasmid carrying a promoterless *egfp* gene (Allaway *et al.*, 2001). The promoter region of *apil* ( $P_{apil}$ -*egfp*) was amplified and cloned into the pGEM-Teasy vector prior to sub-cloning of the ClaI-SalI fragment into the pOT1e digested with the same enzymes. The construction  $P_{apil}$ -*egfp* was confirmed by PCR using pOT1e-F and pOT1e-R primers and by sequencing. This plasmid construct was then introduced into *S4Δapil* strain by electroporation, and gentamycin-resistant colonies were selected on TY medium plates.

### Measurement of *apil* promoter activity

AHL bioassays were performed with the  $P_{apil}$ -*egfp* fusion in the *S4Δapil* strain (reporter strain) as follows. An overnight culture of the reporter strain was diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in microplates well (200 μL), 2 μL of extracts or pure AHL were added and the plate was incubated at 28°C. Absorbance at 600 nm and fluorescence (excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 530 nm) were measured with a TECAN infinite 200 (Tecan Trading AG, Switzerland). Results were normalized by dividing fluorescence values by OD<sub>600nm</sub> values, and compared with values obtained from the strain containing the empty pOT1e vector.

For experiments with addition of AHLs, stocks solutions of the following AHLs were prepared in acetonitrile at 1 mg/mL: C<sub>4</sub>-L-HSL, C<sub>8</sub>-L-HSL, 3-OH-C<sub>8</sub>-L-HSL, 3-O-C<sub>8</sub>-L-HSL, C<sub>10</sub>-L-HSL, 3-OH-C<sub>10</sub>-L-HSL, 3-O-C<sub>10</sub>-L-HSL, C<sub>12</sub>-L-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-L-HSL, and C<sub>14</sub>-L-HSL (from Sigma-Aldrich) and 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL (from University of Nottingham). Controls were incubated with acetonitrile only. Experiments were performed with three replicates and repeated at least twice.

### Extraction and separation of AHL

Cell-free culture supernatants were acidified (0.1% glacial acetic acid) and extracted twice with dichloromethane (1:1). The organic phases were pooled, dried and the extract obtained was dissolved in acetonitrile with 1 μL of extract equivalent to 1 mL of culture. For *apil* promoter activity, cultures of 50 mL from the wild-type strain (*A. vitis* S4) and the various mutants were extracted. For purification and identification of the Apil-made molecules, these extractions were performed on 3.6 L of late-exponential growth phase cultures of *A. vitis* S4 and *S4Δapil*. Compounds of these extracts were first separated by semi-preparative HPLC (1100 series, Agilent technologies) on a Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> column (5 μm particle size; 250 mm × 10 mm; Macherey-Nagel) with elution over an acetonitrile-H<sub>2</sub>O gradient (0.1% formic acid in each solvent) from 25:80 to 100:0 (vol/vol) at a flow rate of 3.5 mL/min and fraction collected each 0.8 min (73 fractions). All fractions were evaporated to dryness at 30°C in



a Centrivap concentrator (Labconco, USA) and were dissolved in acetonitrile (at a concentration a thousand times greater than in the culture), and then tested with the  $P_{apil}$ -*egfp* fusion as described above. The bioactive fraction from the wild-type strain extract was subjected to a second HPLC fractionation, using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (5  $\mu$ m particle size, 150 mm  $\times$  4.6 mm) with a pre-column (5  $\mu$ m, 12.5  $\times$  4.6mm, Agilent technologies) at 35°C and an elution with the same solvent but a gradient from 52% to 100% of the organic solvent at a flow rate of 1mL/min and fraction collected each 0.4 min. All fractions were dried, dissolved in acetonitrile and tested with the  $P_{apil}$ -*egfp* fusion as before.

### **Qualitative and quantitative UHPLC-MS QTOF analyses**

Bioactive and surrounding fractions were analyzed on an UHPLC Agilent 1290 coupled to an Accurate-Mass Q-TOF 6530 spectrometer (Agilent Technologies). Liquid chromatography was carried out using a Poroshell 120 EC-C8 column (2.7  $\mu$ m particle size, 100 mm  $\times$  3 mm, Agilent technologies) at 35°C, and with injection of 2.5  $\mu$ L of sample (either extracts, fractions or culture supernatants) or 1  $\mu$ L of standard solution at a concentration of 50 mM. The mobile phase was a mix of acidified water and acetonitrile (0.1% formic acid in each solvent) applied at a flow rate of 0.3 mL/min and the following gradient: starting at 50:50 for 3 min, increasing to 25:75 in 11 min, then to 0:100 in 11 min and maintained for 2 min, before returning to the start conditions in 1 min and equilibrating for 2 min.

The QTOF-MS instrument was operated for MS and MS<sup>2</sup> analyses under the following conditions: the ion source ESI Agilent Jet Stream Technology was in positive ionization modes with 320°C gas temperature, 11 L/min gas flow, 350°C sheath gas temperature, 11 L/min flow rate, with the capillary, nozzle and fragmentor voltage at 3700 V, 500 V and 100 V, respectively. The acquisition mass range was  $m/z$  60-2000, and the MS<sup>2</sup> experiment was done with the collision energy set at 10 V. The UHPLC-MS QTOF device was managed by the Mass Hunter Workstation Acquisition B.07.00 software and the data reworks were done with Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software (Agilent Technologies).

For quantification, an internal standard, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), was added to culture supernatants before extraction and quantification was performed as previously described (Lépine and Déziel, 2011).

### **Conjugation assays**

For conjugation assays *in vitro*, donor strains (S4 p130::NeoKan<sup>R</sup> or S4 pTi::Gm<sup>R</sup>) and recipient strain (plasmidless strain UIA5) were cultured overnight at 28°C respectively in TY or YPG broth. After overnight incubation, the donor and recipient strains were washed with sterile NaCl 0.8 % and resuspended in NaCl 0.8 % at DO<sub>600</sub> 2. 100  $\mu$ L of each strain were mixed, spotted onto an YPG plate,

and incubated for 15 h at 28°C. Following incubation, the bacterial mix was scrapped off and washed thoroughly with 1 ml sterile NaCl 0.8 % to dissociate cells. Transconjugants were selected by plating bacterial mixtures onto selective media with the appropriate antibiotics: tetracycline plus either neomycin and kanamycin (to detect the transfer of p130) or gentamycin (to detect the transfer of pTi). Recipient and donor were enumerated respectively onto TY with tetracyclin and YPG with neomycin and kanamycin or gentamycin. Transfer frequencies were expressed as the number of transconjugants over the number of recipients. Results were based on at least three independent experiments.

For conjugation assays *in planta*, 10 µL of the mixture of donor and recipient (grown in the same way as above) were inoculated in a cutoff scalpel of a three-week-old tomato stem (Marmande). Tomatoes were incubated in a climatic chamber and after 4 weeks the tumors were collected and crushed into NaCl 0.8 % before being plated on the selective media supplemented with appropriate antibiotics and cycloheximide (0.2 mg/mL). Three independent assays were performed with five plants each.

The presence of Api or Ti plasmid in putative transconjugants was assessed by PCR with appropriate primers, and was confirmed in a subset of transconjugants by plasmid analysis using a modified Eckhard agarose gel electrophoresis technique as described previously (Vial *et al.*, 2006).

### **Transcriptomic analysis**

Overnight cultures of *A. vitis* strains S4 and S4Δ*apiI* were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in 10 mL of AT medium. Cells were grown at 28°C up to an OD<sub>600</sub> of 0.9 and harvested by centrifugation (10 min, 7000 rpm, 4°C). For transcriptomic analysis, RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel Ltd., Oensingen, Switzerland) and further treated using RNase-free DNase (Ambion, Austin, TX, USA) according to manufacturer's instructions. Absence of genomic DNA contamination was checked by PCR with a primers pair used for quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) (Table S2). RNA concentration and purity were assessed using a nanodrop NP80 (Implen, Germany) visualized on an agarose gel to check quality, and stored at 80°C until further use.

Depletions of rRNA were performed using Bacteria Ribo-zero rRNA removal kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The quality and concentration of RNA in each sample were assessed using a RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA-seq was performed at MGX-Montpellier GenomiX (Montpellier Genomics and Bioinformatics Facility, Montpellier, France), using an Illumina HiSeq2500. Data quality was assessed using FastQC (Babraham Institute, USA). RNA-seq reads (100 pb) were quality filtered using Illumina purity filter and aligned onto the *A. vitis* S4 genome using BWA-backtrack and Bowtie2. Gene counting was calculated using HTSeq v0.6.1p1 in union mode. Reads not aligned or with multiple hits were disregarded. HTSeq-count (EMBL, Heidelberg, Germany)

was used to evaluate the number of reads by gene. The DESEQ package was used to analyze the differential expression of genes between the *S4Δapil* mutant and the reference strain S4 and. Sequence reads were deposited at NCBI Sequence Read Archive (SRA).

### **qRT-PCR analysis**

For qRT-PCR experiments, total RNAs were extracted as previously described (Hommais *et al.*, 2008). 1.5 µg of the total RNAs were reversed-transcribed using OneScript® Reverse (Applied Biological Materials, Canada) and random hexamer primers, according to the manufacturer's protocol (First Strand cDNA synthesis). The SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, United Kingdom) was used with 0.1 µL of the cDNA reaction mixture and gene-specific primers. The thermal cycling reactions were performed using the LC480 Lightcycler from Roche according to the following conditions: an initial step at 95°C for 7 min, followed by 45 cycles at 95°C for 10 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 20 s. Data normalization were performed using gene *Avi\_1866* (encoding the 30S ribosomal protein S11), as its expression is constant in the growth conditions tested (30S listed in Supplementary Table 2) (Dequivre *et al.*, 2015). The specificity of the PCR primers was verified with a melting curve analysis.

### **Competition assays**

Co-inoculation of S4 p130::NeoKan (as a wild-type) and S4 p130::NeoKan-*apiR*::Gm strains were performed on tumors of grape plants (Chardonnay). The rationale for using an *apiR* mutant is due to the fact that an *apil* mutant is still responsive to QS molecules synthesized by the wild-type strain. Bacterial suspension of each strain were adjusted in 0.8% NaCl, the suspensions were mixed in equal ratio, and then used to inoculate plants in order to obtain a number of  $2.10^6$  CFU. Tumors were harvested after 5 weeks, crushed, and the obtained suspension was diluted in 0.8% NaCl before spreading on AT succinate medium supplemented with cycloheximide (0.2mg/mL), crystal violet (0.1 %) neomycin and kanamycin. After 48 h of incubation, 96 clones were recovered and tested for their sensitivity to gentamycin. The percentage of each strain was estimated on at least eight plants.

### **Swarming and assays on plants**

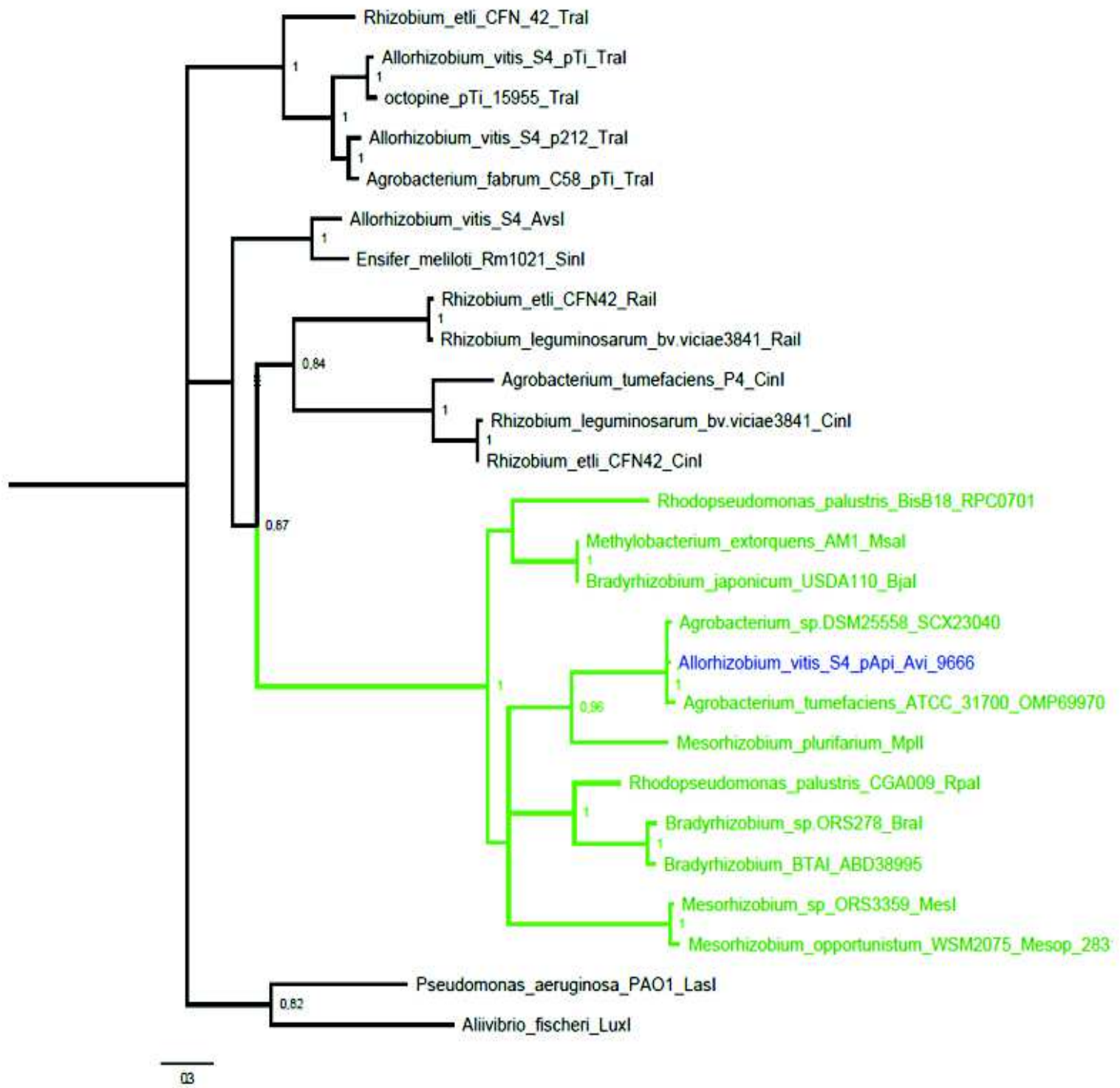
For swarming, overnight cultures of the different strains were centrifuged, and pellets were resuspended in TY to an OD<sub>600</sub> of 2.5. 15 µL of each concentrated culture were applied to the center of petri dish containing 0.5X TY pH 6 solidified with 0.6 % (wt/vol) agar and plates were incubated at 28°C for 48 h.

For the necrosis tests, explants were excised from greenhouse-grown vines and surface-disinfected during 20 min in ethanol 50 % and 5 min in ethanol 70 % (Herlache *et al.*, 2001). They were

rinsed in sterile distilled water and cut into 1 cm long sections. Explants were supported vertically, with their basal end up, in 10 % water agar plates, and their aerial ends were inoculated with 2  $\mu$ L of bacterial suspension ( $10^7$  CFU/mL). Development of necrosis was scored over a period of 5 days. Water was used as a negative control. For virulence assays, three-week-old tomato plants (Marmande) were inoculated with *A. vitis* S4 wild-type or mutants and grown in a phytotron growth cabinet (Sanyo Gallenkamp, Leicester, UK) with 70 % hygrometry and a 16 h-photoperiod at 25°C followed by 8 h at 22°C. Virulence assays were performed as previously described (Haudecoeur *et al.*, 2009). Briefly, plants were wounded at the top of the stem just under the second leaf, and were infected with  $2.5 \cdot 10^6$  bacterial cells. Tumors were observed and counted 4 weeks post-infection. Ten plants were used for each strain.

### **Phylogeny of LuxI synthases**

Amino acid sequences of selected LuxI family members were obtained from NCBI and aligned with muscle in Seaview (Galtier *et al.*, 1996). Construction of phylogenetic trees using the Maximum Likelihood method was performed using MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013) and visualized by using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Bootstrap analyses were performed with 500 replicates.



**Fig. 1 Phylogenetic tree of LuxI-like members in selected Rhizobiales.**

The tree was constructed using the Maximum Likelihood method based on the Le and Gascuel (2008) model with bootstrap values obtained from 500 replicates. Nodes with bootstrap values of more than 80% are labeled. The CoA-dependent AHL synthases are indicated in green and Apil in blue. LasI from *Pseudomonas aeruginosa* and LuxI from *Aliivibrio fischeri* were used as the outgroup.

## Results

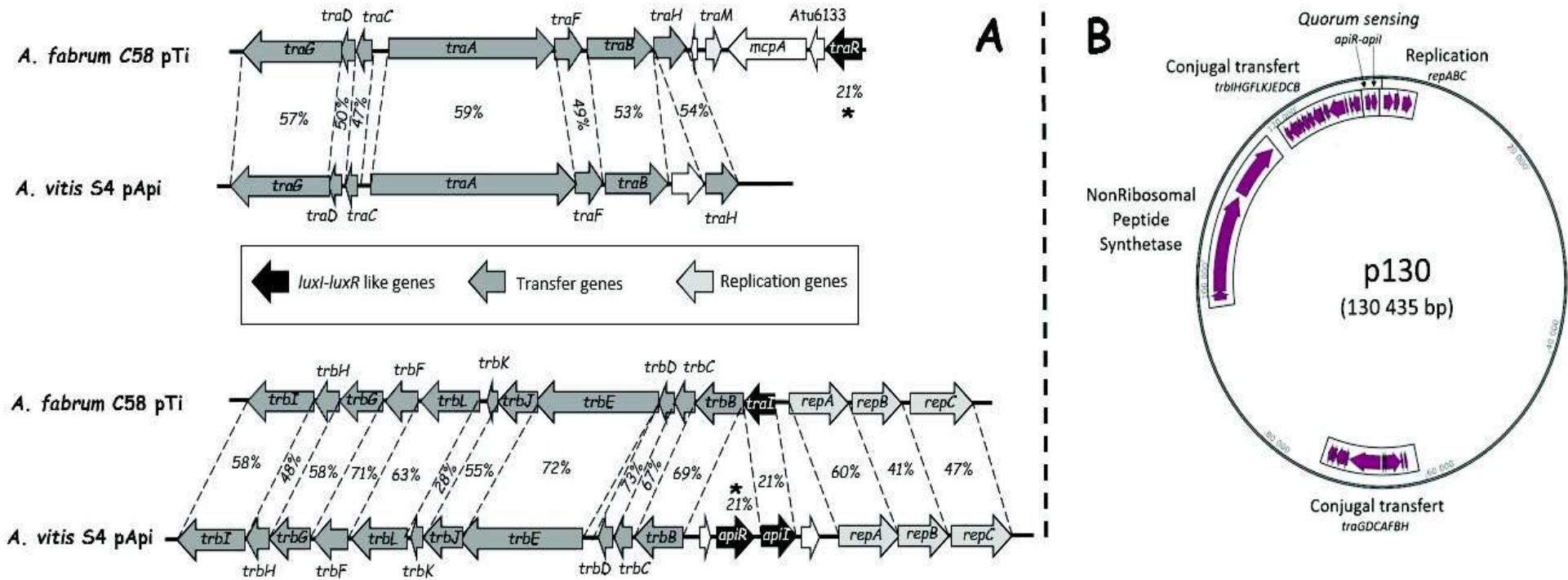
### Apil belongs to a family of CoA-dependent AHL synthases

A phylogenetic tree was constructed with Apil closest protein sequences that had been functionally characterized, as well as sequences extracted from *A. tumefaciens*, *A. vitis*, and *Rhizobium* genomes. Apil clusters in a group containing atypical LuxI synthases shown to use acyl-CoA instead of acyl-ACP as substrates (Fig. 1); indeed, Apil displays 43% identity with MplI of *Mesorhizobium plurifarium* (A0A090DF89), 40% identity with Rpal of *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Q6NCZ6) and 36% with Bjal of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Q89VI2). Moreover, amino-acid residues described as being critical for the interaction with acyl-CoA substrates are present in Apil (Fig. S1). Classical LuxI-like Tral synthases of *A. vitis* and *A. tumefaciens* that display weak identity with Apil (up to 21 %) form a second cluster (Fig. 1). A blast search revealed that Apil closest proteins are DSM25558\_3281 of *Agrobacterium sp.* DSM 25558 (95% identity) and BV900\_22170 of *A. tumefaciens* ATCC 31700 (93% identity), for which no functional characterization has been performed.

Upstream of *apil* and in the same orientation, lies a gene encoding a LuxR-like transcriptional regulator, named ApiR (Fig. 2). ApiR displays the two classical domains of LuxR-like proteins, i.e. a domain for AHL binding (IPR005143) in the N terminus and a domain for DNA binding (IPR000792) at the C terminal end, as well as 8 critical amino acids out of the 9 described for all LuxR homologues (Fig. S2) (Whitehead *et al.*, 2001). However, ApiR shows a weak identity (~22 %) with TraR-like proteins of *A. vitis* and *A. tumefaciens*. *apiR* and *apil* are separated by 80 pb and no *lux* box could be identified within this region; transcripts corresponding to *apiR* or to *apil* could be detected by RT-PCR whereas amplification of a transcript corresponding to both *apiR* and *apil* was unsuccessful (data not shown), suggesting that each gene is transcribed from its own promoter. Moreover, *apiR* transcription level remained unchanged in the *S4Δapil* mutant compared to wild-type (data not shown), indicating that ApiR does not regulate its own transcription.

*apiR* and *apil* are surrounded by the *trb* transfer operon and the replication (*repABC*) genes, like in pTi of *A. fabrum* C58 (Fig. 2). Synteny between p130 and pTi over this region is well conserved, except the fact that *traI* and *traR* genes of pTi are not adjacent and are included in different operons (respectively *trb* and *arc* operons) (Piper *et al.*, 1999).

Interestingly, whereas protein identity for transfer (Trb and Tra) and replication proteins is relatively high (up to 73 %), protein identity between LuxI-like and LuxR-like proteins is low (21 %). A search in genomes of *Agrobacterium sp.* DSM 25558 and *A. tumefaciens* ATCC 31700 (available in contigs), which harbor the closest orthologues of *apil*, showed that a *luxR*-like gene is present next to



**Fig. 2 (A) Genetic organization of *A. vitis* S4 p130 *tra* and *trb* operons, *apiI* and *apiR* genes.**

Genetic organization was compared to that of *A. fabrum* C58 pTi. Genes and intergenic regions are drawn to scale. Most of the genes are present on both plasmids in the same organization. *traM* is present only on the C58 pTi. **(B)** Organization of the replication, conjugal transfer, quorum sensing and NRPS genes of the *A. vitis* S4 p130. Genes and intergenic regions are drawn to scale.

the *luxI* and the corresponding proteins display 89% of identity with ApiR. As observed for *apil* and *apilR* of *A. vitis* S4, these QS genes are surrounded by *trb* operons and *repABC* genes, suggesting a plasmidic localization for this region.

### **The *apil* promoter is only weakly induced by unsubstituted long AHLs**

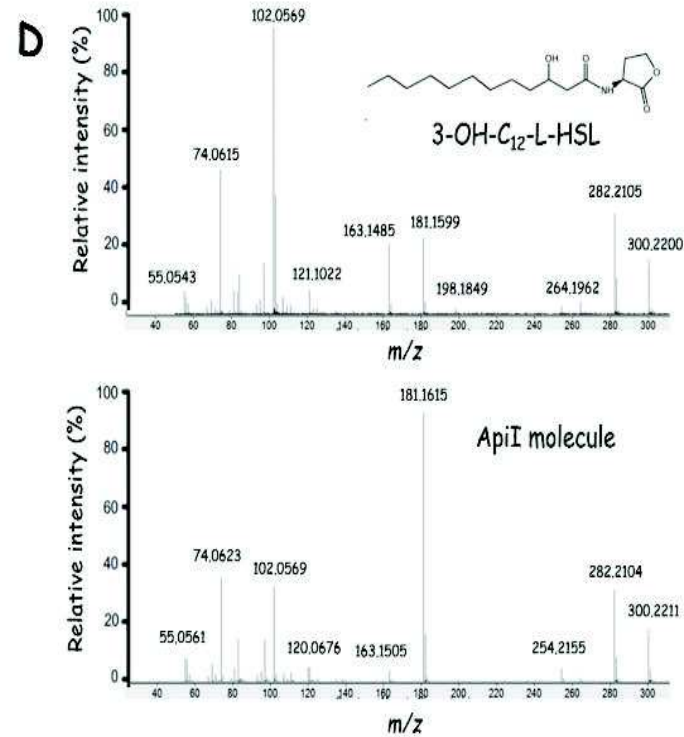
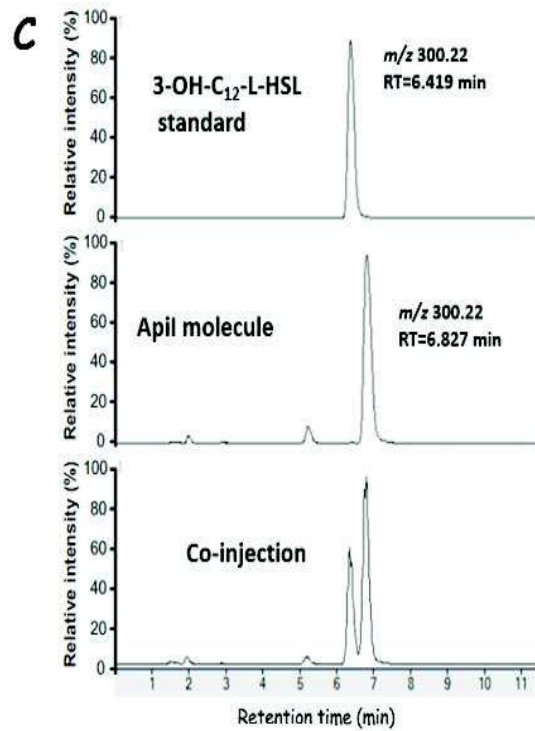
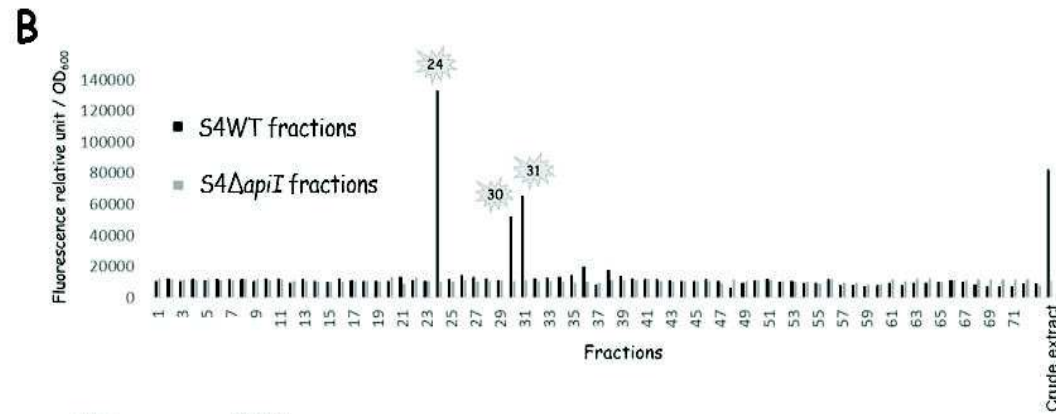
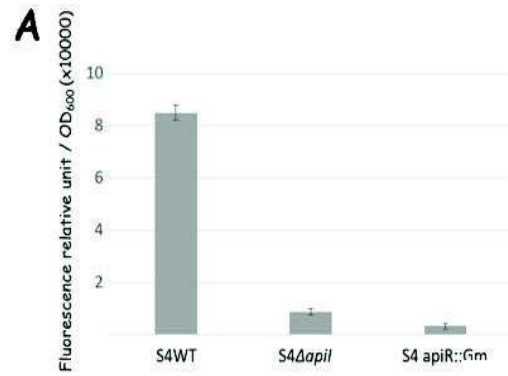
The approach undertaken to identify the bioactive AHL of *A. vitis* S4 is based on the fact that many *luxI*-like genes are positively autoregulated by their cognate LuxR homologue and their AHL product. To this end, an *A. vitis* reporter strain was constructed with the *apil* promoter ( $P_{apil}$ ) inserted upstream the promoterless gene of *egfp* of the pOT1e vector, ( $P_{apil}$ -*egfp*).  $P_{apil}$ -*egfp* expression in the *A. vitis* S4 $\Delta$ *apil* strain was shown to be activated by acidified dichloromethane extracts of cell-free supernatant from late exponential growth phase cultures of the wild-type *A. vitis* strain; as expected, the reporter strain was not activated by crude extracts from the *A. vitis* S4 $\Delta$ *apil* and S4*apilR*::Gm mutants, indicating that production of the bioactive compound was dependent on Apil and ApiR (Fig. 3A). A panel of commercial unsubstituted, hydroxyl- and oxo-AHLs was tested with the *A. vitis* reporter strain: induction was observed only with unsubstituted long acyl chain AHLs, i.e. C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL and C<sub>14</sub>-HSL and at relatively high concentration (> 5  $\mu$ M) (Fig. 4).

### **Apil directs the synthesis of an atypical AHL**

The active and inactive crude extracts, from S4 and S4 $\Delta$ *apil* cultures respectively, were submitted to a first fractionation step by C<sub>18</sub> reverse-phase HPLC. All the fractions were tested with the reporter strain in order to localize the compounds synthesized by Apil and able to induce *apil* transcription. The fluorescence of the reporter strain indicated the presence of molecules inducing the reporter strain in fractions 24, 30 and 31 (Fig. 3B). No fraction obtained from the S4 $\Delta$ *apil* strain extract induced the reporter strain.

Each of these active fractions and the surrounding inactive fractions were analyzed by UHPLC-MS/MS QTOF and compared to those obtained from the S4 $\Delta$ *apil* strain. The daughter ion at *m/z* 102.05, characteristic of the lactone moiety, was searched in order to detect the AHL-like compounds (Churchill *et al.*, 2011). In fraction 24, three ions observed at *m/z* 282.20, 300.22 and 302.23, and absent from the S4 $\Delta$ *apil* extract, showed a fragment ion corresponding to the lactone moiety. However, the latest ion was also present in the inactive fraction 25. Surprisingly, ions at *m/z* 282.20 and 300.22 were observed exactly at the same retention time of 6.83 min and seemed to be two ions of the same compound: they could be ionic species  $[M+H]^+$  and  $[M+H-18]^+$  of the same molecule, due to the loss of an H<sub>2</sub>O during the ionization process. Indeed, the MS/MS spectra of the ion at *m/z* 300.20 showed a first daughter ion at *m/z* 282.20 (Fig. 3D).





**Fig. 3 Characterization attempt of the Apil molecule. (A)** Induction assays with crude extract of S4 wild-type strain and *A. vitis* S4Δapil strain with P<sub>apil</sub>-egfp bioreporter strain. **(B)** Induction assays of the P<sub>apil</sub>-egfp strain with the S4 wild-type and S4Δapil fractions. **(C)** UHPLC-MS QTOF extract ion chromatogram (EIC) of ion at m/z 300.22 from the S4 wild type culture extract and 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL standard analyzed separately or co-injected. **(D)** MS/MS mass spectra of 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL standard and Apil molecule from a S4WT culture extract, showing the same parent ion [M + H]<sup>+</sup> at m/z 300.22.

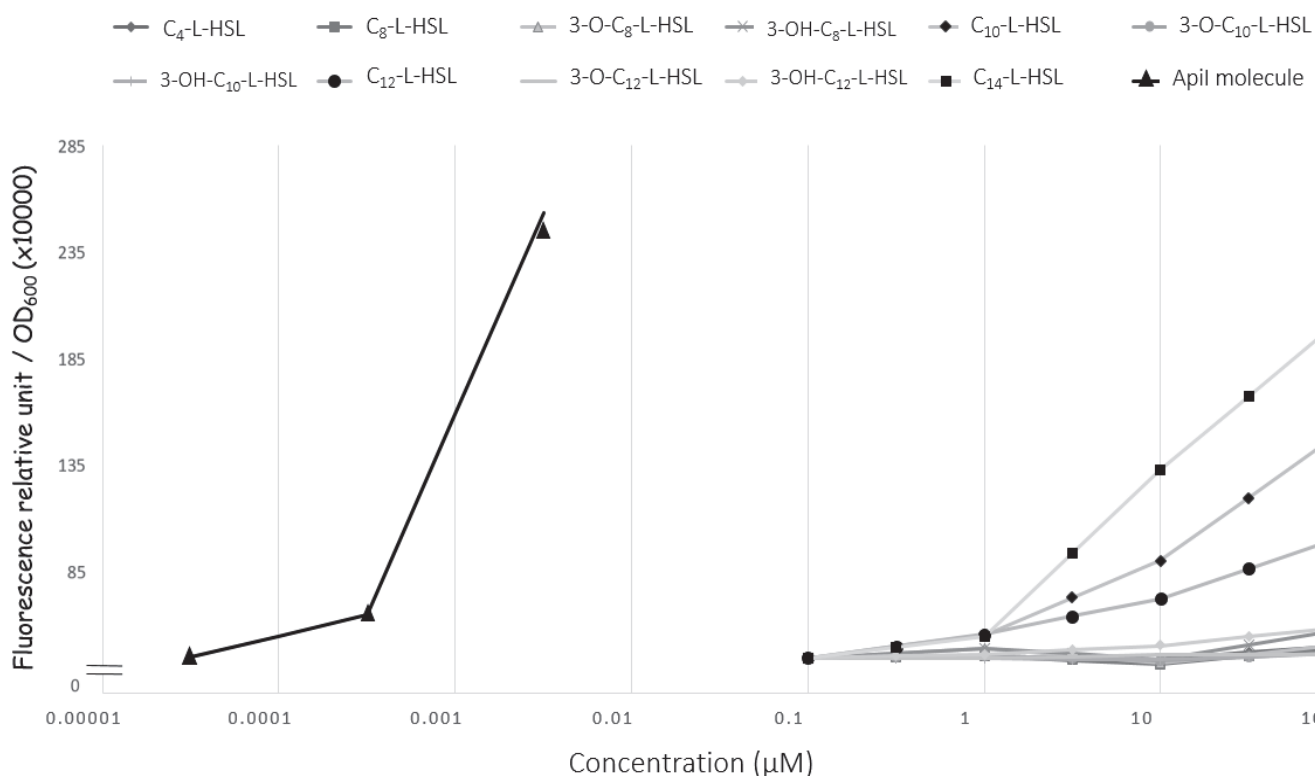
Similar analyses were performed on active fractions 30 and 31 allowing the detection of two AHL-like ions:  $m/z$  282.20 at 10.4 min and  $m/z$  328.25 at 10.58 min, this latter being present only in fraction 31.

A second fractionation step was thus performed in order to increase the purity of the active compounds. This allowed to demonstrate that among the two compounds initially found in fractions 30 and 31, the only biologically active compound was the ion at  $m/z$  282.20 eluted at 10.4 min (data not shown). Regarding the active compounds initially identified in fraction 24, UHPLC-MS QTOF analyses and activity tests revealed two active sub-fractions: one always containing the two AHL-like ions at  $m/z$  282.20 and 300.22 at the same retention time (6.83 min) and surprisingly another new one with the AHL-like ion at  $m/z$  282.20 detected at 10.4 min (like in fractions 30 and 31). The molecular formula ( $C_{16}H_{28}NO_3$ ) and the MS/MS spectra of these ions at  $m/z$  282.20 being identical, there are likely dehydration products of the major ion at  $m/z$  300.22: one appearing during the ionization (eluted at 6.83 min) and the other one generated during the fractionation experiment (eluted at 10.4 min). This hypothesis was confirmed with the direct analysis of the culture supernatant as only the major ion at  $m/z$  300.22 could be detected (data not shown).

The active compound (major ion at  $m/z$  300.22 eluted at 6.83 min) was further characterized. Its positive MS spectrum showed a major ion at  $m/z$  300.2167 and ions at  $m/z$  322.1993, 621.4081 and 282.2059, which corresponded to the ionic species  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[2M+Na]^+$  and  $[M+H-18]^+$ , respectively (Fig. S3). Thus, this Apil molecule would be a compound with a mass of 299 Da, with the molecular formula  $C_{16}H_{29}NO_4$  (theoretical mass for  $[M+H]^+$ , 300.216935, calculated for  $C_{16}H_{30}NO_4$ ; mass error, -0.78 ppm). Among the AHL-like compounds described in the literature, these data seemed to be consistent with an *N*-(3-hydroxydodecanoyl)-L-homoserine lactone (3-OH- $C_{12}$ -L-HSL). However, comparative analyses between the Apil molecule and the standard 3-OH- $C_{12}$ -L-HSL showed discrepancies. First, they displayed different retention times (6.42 min for the standard versus 6.83 min for the Apil molecule), a feature that was confirmed by co-injection of both compounds (Fig. 3C).

Second, their MS/MS spectra showed similar major fragment ions but with different intensities (Fig. 3D): the base peak for the MS<sup>2</sup> spectrum of the 3-OH- $C_{12}$ -L-HSL was the ion of the lactone moiety at  $m/z$  102.05 whereas the Apil molecule gave as major peak the ion at  $m/z$  181.16.

Based on a previous published method that makes uses of an internal standard (Lépine and Déziel, 2011), the concentration of the Apil molecule was estimated ~800 pM at the end of the exponential phase.

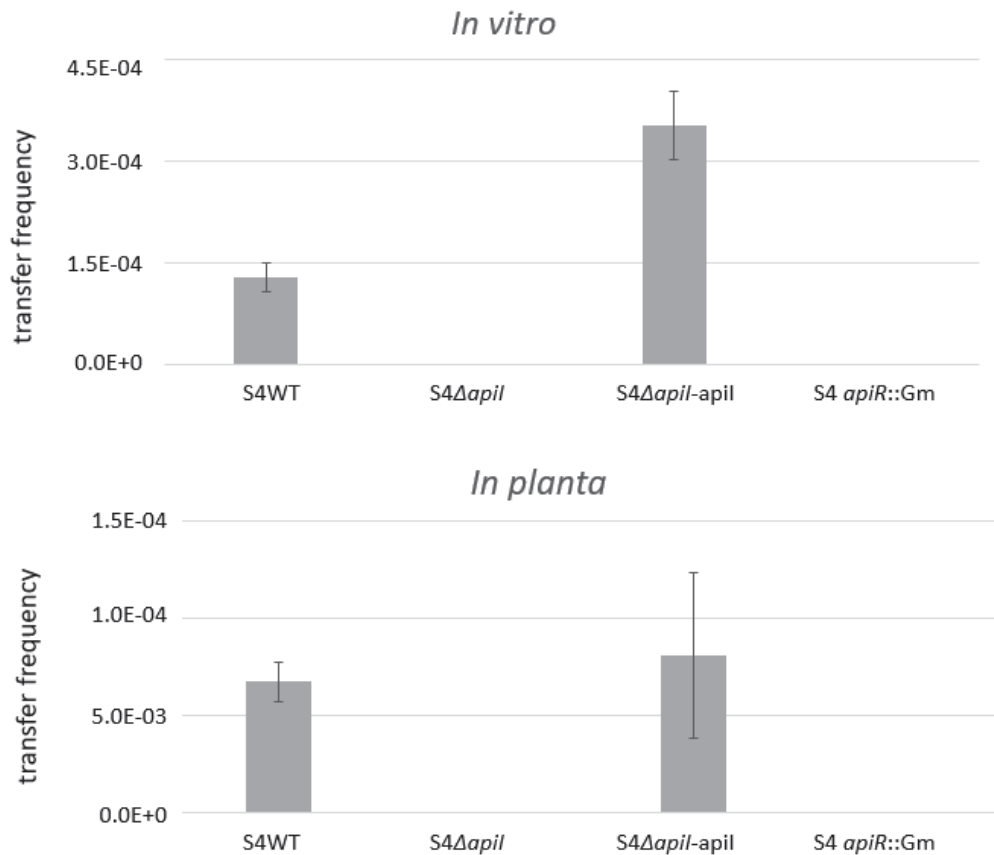


**Fig.4 Dose-responses of the *P<sub>apil</sub>-egfp* reporter strain exposed to commercial AHL and to the Apil molecule.**

Moreover, using the active fraction 24, we were able to estimate that a concentration as low as 10 pM of the active compound was enough to activate the reporter strain (Fig. 4), whereas the standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL was not able to induce the reporter, even at the highest concentration tested.

It is noteworthy to indicate that searching the ion at *m/z* 102.05 in fractions that were not biologically active on our reporter strain allowed us to detect other AHL compounds that seemed to be produced in very low concentration: (i) an ion at *m/z* 284.22 that displayed the same retention time and mass spectrum as the unsubstituted standard C<sub>12</sub>-L-HSL (Fig. S4); (ii) two ions at *m/z* 272.19 and 328.25 that could match 3-OH-C<sub>10</sub>-L-HSL and 3-OH-C<sub>14</sub>-L-HSL molecular formula but compared to standards, they displayed different retention times and showed similar fragment ions in MS/MS spectra but with different intensities (Fig. S4).

Thus, given the discrepancies on chemical features, stability and biological activity (very weak induction of *P<sub>apil</sub>-egfp* by the standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL), it appears that the Apil molecule is likely an analogue of 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL, with a more unstable hydroxyl group.



**Fig. 5 Transfer frequencies of p130 *in vitro* and *in planta*.**

Frequencies were calculated as transconjugant colonies (CFU/mL) per recipient (CFU/mL) for S4WT, S4Δapil, S4Δapil–apil and S4 apiR::Gm as donor strains and *A. tumefaciens* IUA5 as recipient strain.

### The Apil-ApiR QS system controls the transfer of p130

The p130 harbouring *tra* and *trb* operons, it is expected to be self-conjugative. Indeed, like the pTi, the p130 can be transferred *in planta* at a frequency of  $6.73 \cdot 10^{-3} (\pm 1.01 \cdot 10^{-3})$  transconjugant per recipient (Fig. 5). Interestingly, the p130 can be transferred *in vitro* at a frequency of  $1.29 \cdot 10^{-4} (\pm 2.12 \cdot 10^{-5})$ , an event that is never observed for all known pTi as opines synthesized by transformed plant cells are essential for initiating pTi transfer. We have indeed checked that pTi of S4 strain could not be transferred *in vitro* (data not shown), despite the fact that a T4SS machinery is implemented for p130 transfer.

Given the localization of *apil* and *apiR* next to the *trb* operon (Fig. 1), we suspected that the transfer of the p130 was regulated by QS. When conjugation assays were performed with S4Δapil or S4apiR::Gm as donors, no transconjugant was obtained *in vitro* and *in planta* (Fig. 5). As expected, the S4Δapil strain kept its ability to transfer its pTi *in planta* (data not shown). For the S4Δapil

complemented strain, frequencies of  $3.53 \cdot 10^{-4} (\pm 5.00 \cdot 10^{-5})$  and  $8.07 \cdot 10^{-3} (\pm 4.27 \cdot 10^{-3})$  transconjugant per recipient were recovered, respectively *in vitro* and *in planta* assays (Fig. 5).

### **QS regulation by Apil-ApiR is not restricted to plasmid transfer**

We wondered if p130 transfer was the only phenotype regulated by the Apil-ApiR QS system. To that end, a transcriptome analysis by RNA-seq was performed on RNA extracted from late exponential phase cultures of wild-type S4 and *S4Δapil* strains. Using a threshold of a  $|\text{Log}_2(\text{FC})|$  cutoff of 2, 73 genes were found to be down-regulated in the mutant versus the wild-type, and among these, 48 genes are located on the p130 (Table 1). RNA-seq data were confirmed by qRT-PCR using one gene per identified operon. Up-regulation was only confirmed for plasmidic genes (Table 1 and data not shown).

As expected, the *tra* and *trb* operons involved in plasmid transfer as well as the *rep* genes representing a total of 22 genes, revealed to be positively regulated by the Apil-ApiR QS system. These data are in accordance with the absence of p130 transfer in the *S4Δapil* mutant. RNA-Seq also confirmed that *apiR* was not regulated by Apil.

Among the other 26 regulated genes, a putative operon from Avi\_9638 to Avi\_9643 comprising two NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase) genes is also positively regulated by Apil-ApiR. This prompted us to analyze necrosis and virulence, as a NRPS cluster was shown to be involved in the induction of necrosis on grape by *A. vitis* (Zheng and Burr, 2013).

**Table 1 : List of plasmidic down-regulated genes in the *apil* mutant compared to *A. vitis* S4 wild-type identified by RNA-seq and RTqPCR.** When several continues lines appear in the same color, the corresponding genes are likely to form an operon (Softberry, BPRM).

Gene name	Name	Product	Interproscan protein domain	RNAseq Log <sub>2</sub> (FC)	P-value	RT-qPCR Log <sub>2</sub> fold change	P-value (t.test)
Avi_9501	repA	replication protein A	IPR017818 : Plasmid partitioning protein, RepA	3.3501	7.73E-73	3.3910	0.001944
Avi_9502	repB	replication protein B	IPR017819 : Plasmid partitioning protein, RepB	2.3278	5.42E-38		
Avi_9503	repC	replication protein C	IPR005090 : Replication protein C and IPR021760 : Replication protein-C C-terminal	2.1139	1.16E-17		
Avi_9514	_	hypothetical Protein	-	2.5648	1.17E-45		
AVI_RS23010	_	hypothetical protein	-	2.0808	1.75E-05		
Avi_9524	_	hypothetical protein	-	2.5964	3.65E-23		
Avi_9525	_	hypothetical protein	-	2.8366	1.63E-53		
AVI_RS23040	-	conserved hypothetical protein	-	2.2859	6.02E-37		
Avi_9557	-	conserved hypothetical protein	-	2.81751	0.00562		
Avi_9587	-	conserved hypothetical protein	IPR008893 : WGR domain	4.1622	1.47E-64		
Avi_9589	traG	Ti-type conjugative transfer system protein TraG	IPR014135 : Ti-type conjugative transfer system, TraG	5.2643	1.38E-140	5.8976	0.00357
AVI_RS23215	traD	conjugal transfer protein Dtr system	IPR009444 : Conjugal transfer, TraD, alpha-type	5.6463	3.58E-143		
Avi_9593	traC	conjugal transfer protein Dtr system	IPR012930 : TraC-like	5.4007	5.75E-134		
Avi_9595	traA	Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	IPR014136 : Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	2.5093	8.29E-41	4.0326	0.007321
Avi_9596	traF	conjugative transfer signal peptidase TraF	IPR014139 : Peptidase S26C, conjugative transfer signal peptidase TraF	2.551	1.74E-30		
Avi_9597	traB	conjugal transfer protein Dtr system	IPR003010 : Carbon-nitrogen hydrolase	2.3667	3.44E-27		
AVI_RS23265	_	aspartate 1-decarboxylase	IPR003190 : Aspartate decarboxylase	2.4577	2.39E-37	1.9747	0.03423
Avi_9606	_	hypothetical protein	-	2.5419	9.97E-41		
Avi_9607	hisC	histidinol-phosphate aminotransferase	IPR005861: Histidinol-phosphate aminotransferase family	2.3581	2.54E-37		
Avi_9608	-	isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthase	IPR000891 : Pyruvate carboxyltransferase	1.9046	2.19E-26	2.6611	0.04835
Avi_9609	-	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	IPR006115 : 6-phosphogluconate dehydrogenase, NADP-binding and IPR029154 : 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, NAD-binding domain	2.9669	5.78E-51		
Avi_9610	-	ABC transporter nucleotide binding/ATPase protein	IPR011527 : ABC transporter type 1, transmembrane domain	2.0702	8.32E-27		
Avi_9611	-	conserved hypothetical protein	IPR005331: Sulfotransferase	2.1528	9.16E-33		
Avi_9612	-	GntR family transcriptional regulator	IPR000524 : Transcription regulator HTH, GntR	2.0848	1.72E-32	1.6200	0.048
Avi_9626	-	glycosyltransferase	IPR002213 : UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase	2.5511	1.44E-39		
Avi_9629	-	sulfate adenylate transferase subunit 1	IPR011779 : Sulphate adenyltransferase, large subunit and IPR002891 : Adenyl-sulfate kinase	2.7194	7.32E-48	3.0035	0.008418
Avi_9630	-	sulfate adenylate transferase subunit 2	IPR011784 : Sulphate adenyltransferase, small subunit	3.0060	3.37E-50		
Avi_9632	-	conserved hypothetical protein	IPR003819 : TauD/TfdA-like domain	3.8237	5.13E-86		

Avi_9634	leuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	IPR004431 : 3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	4.3011	1.14E-59		
Avi_9636	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	IPR001030 : Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase large subunit, alpha/beta/alpha domain	3.6445	2.52E-75	6.5767	0.0141
Avi_9638	-		IPR003819 : TauD/TfdA-like domain	5.6830	8.83E-153		
AVI_RS23380	-	non ribosomal peptide synthetase	3 x IPR010071 : Amino acid adenylation domain 2 x IPR025110 : AMP-binding enzyme C-terminal domain	3.7418	2.34E-85	4.2812	0.00262
Avi_9643	-	non ribosomal peptide synthetase	3 x IPR009081 : Phosphopantetheine binding ACP domain 2 x IPR001242 : Condensation domain IPR002376 : Formyl transferase, N-terminal 2 x IPR010071 : Amino acid adenylation domain 2 x IPR025110 : AMP-binding enzyme C-terminal domain 2 x IPR009081 : Phosphopantetheine binding ACP domain 3 x IPR001242 : Condensation domain	2.8934	1.37E-53		
Avi_9646	-	hypothetical protein	-	5.1772	3.19E-121		
Avi_9647	trbI	conjugal transfer protein	IPR005498 : Type IV secretion system, VirB10 / TraB / TrbI	5.4724	2.07E-141		
Avi_9648	trbH	conjugal transfer protein	IPR010837 : Conjugal transfer, TrbH	5.8103	4.13E-130		
Avi_9650	trbG	P-type conjugative transfer protein TrbG	IPR014142 : P-type conjugative transfer protein TrbG	5.6903	1.46E-144	5.9745	0.0003811
Avi_9651	trbF	conjugal transfer protein	IPR007430 : Bacterial virulence protein VirB8	5.7312	1.50E-135		
Avi_9653	trbL	P-type conjugative transfer protein TrbL	IPR014150 : Conjugal transfer, TrbL	5.7524	4.85E-147		
AVI_RS23430	trbK	DUF2749 domain-containing protein	IPR024475 : Type IV conjugative transfer protein TrbJ/K, C-terminal	6.0392	4.43E-114		
Avi_9655	trbJ	P-type conjugative transfer protein TrbJ	IPR014147 : Type IV conjugative transfer protein TrbJ	6.1513	1.24E-167		
Avi_9656	trbE	conjugal transfer protein	IPR018145 : CagE, TrbE, VirB component of type IV transporter system, central domain	5.9297	6.72E-164	8.5608	0.0001086
Avi_9658	trbD	conjugal transfer protein	IPR007792 : Type IV secretion system, VirB3 / TrbD / AvhB	6.0137	1.70E-139		
Avi_9659	trbC	conjugal transfer protein	IPR007039 : Conjugal transfer TrbC/type IV secretion VirB2	6.3603	3.98E-163		
Avi_9661	trbB	P-type conjugative transfer ATPase TrbB	IPR014149 : Conjugative transfer, TrbB	6.4182	6.58E-186		
AVI_RS23460	-	hypothetical protein	-	2.1642	1.72E-20		
Avi_9666	apil	autoinducer (N-acyl homoserine lactone) synthase	IPR001690 : Autoinducer synthase	11.792	2.95E-249		
AVI_RS23475	-	hypothetical protein	-	6.9572	1.17E-211		

For these two assays (necrosis on grape and virulence on tomato), no difference was observed between the wild-type strain and the S4Δ*apil* mutant (Fig. S5). In addition, co-inoculation of S4 p130::NeoKan (as a wild-type) and S4 p130::NeoKan, *apilR*::Gm strains performed on tumors of grape plants showed that no strain overcompeted the other one (i.e. a final ratio of 1:1 was scored) (data

not shown). Finally, swarming ability, which is often implicated in plant colonization, was also investigated, and the wild-type strain and the S4Δ*apil* mutant appeared to behave identically (Fig. S5).

## Discussion

### The Apil synthase likely uses acyl-CoA intermediates

Our phylogenetic analysis and the fact that key amino acids proposed to interact with acyl-CoA intermediates are present in Apil, strongly suggests that Apil belongs to the family of AHL synthases using acyl-CoA rather than acyl-ACP substrates. To date, three CoA-dependent synthases have been characterized and found to direct the synthesis of atypical AHLs: Bral of *Bradyrhizobium sp.* BTAi1 synthesizing cinnamoyl-HSL, an aryl AHL (Ahlgren et al., 2011a), Bjal of *B. japonicum* USDA110 making isovaleryl-HSL, a branched-chain fatty acyl-HSL (Lindemann et al., 2011) and Rpal of *R. palustris* CGA009 directing the synthesis of *p*-coumaroyl-HSL when provided with an exogenous source of *p*-coumarate (Schaefer et al., 2008). Our results show that Apil does not need an exogenous source to synthesize the active compound.

A recent study demonstrates that CoA-dependent AHL synthases can be separated in four clades based on the CoA-linked acyl donor. Apil (B9K345) falls into clade 2 along with MplI of *Mesorhizobium plurifarium* (AOA090DF89) that experimentally displays a strong preference for acyl-CoA substrate over the corresponding acyl-ACP (Dong et al., 2017).

As CoA is found linked to more structurally diverse carboxylated compounds (of biosynthetic or biodegradation pathways), more diverse atypical structures of AHL can theoretically be generated by this LuxI family (Lindemann et al., 2011).

### The AHL synthesized by Apil is likely an atypical AHL

The AHL compound made by Apil, although related to 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL, is clearly a different molecule. Indeed, the two compounds display different analytical features, such as retention time and intensity of fragment ions in MS/MS spectra, as well as different chemical stability; moreover, whereas the cognate Apil-made molecule is able to induce the reporter fusion, the standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL exhibits no biological activity.

It is noteworthy that hydroxylated AHLs carry two chiral centers: the asymmetric carbon of the lactone moiety determining the L/D status of a given AHL, and the third carbon of the acyl chain bearing the hydroxyl group (Fig. 3D). As the lactone moiety derived from S-adenosyl-L-methionine, natural AHL have the (L)-stereochemistry (Parsek et al., 1999). Moreover, synthetic D-AHLs revealed to have no or



a weak biological activity (Ikeda *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2018) hence the majority of commercial AHLs, including the ones used in our study, have the (L)-configuration.

As for the second chiral center of hydroxylated AHLs, native AHLs synthesized from acyl-ACP donors have been reported to have the (R)-stereochemistry. Indeed, FabG, the enzyme that reduces  $\beta$ -ketoacyl-ACP to  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP, produces (R)-3-hydroxyacyl-ACP stereoselectively (Cao and Meighen, 1993; Stacy *et al.*, 2012). In *Acinetobacter baumannii*, a strain that makes 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL, the use of synthetic diastereoisomers revealed that (R)-3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL was ~40-fold more active than (S)-3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL, suggesting that (R)-3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL is likely the native QS signal (Stacy *et al.*, 2012). However, the stereochemistry of this second carbon is unknown for the 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL standard used throughout our study. This also holds true for the AHL made by Apil that may, in addition, originate from acyl-CoA substrates unlike the classical AHLs.

Although not identical to 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL, the Apil-made compound is structurally related as both compounds bear a lactone ring, display the same mass (299 Da) and molecular formula (C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>). One possibility is that Apil synthesizes a branched-chain fatty AHL, rather than a straight-chain AHL. Such unusual AHLs have been characterized previously, notably in *Aeromonas culicicola* (Thiel *et al.*, 2009) and *B. japonicum* (Lindemann *et al.*, 2011). Interestingly, the branched-chain AHL of *B. japonicum*, isovaleryl-AHL, is generated by Bjal, an AHL-synthase that prefers acyl-CoA substrates (Dong *et al.*, 2017). Another possibility is that the hydroxyl group is branched at an unorthodox position (i.e. not on carbon 3 of the acyl chain) and this may account for the relative instability of the Apil-made compound; such unusual AHLs have recently been described in a marine bacterium (Doberva *et al.*, 2017).

It appears that the hydroxyl group of the Apil-made compound is not an important part of the structure for its biological activity as the dehydration compound observed as an ion at *m/z* 282.20 remains active (Fig. 3B, fractions 30 and 31).

### **The AHL synthesized by Apil is active at a very low concentration**

The Apil-made AHL reaches concentration ~800 pM in culture fluids, a concentration that is at the low end of the range (0.1 to 10  $\mu$ M) classically observed for AHLs (Chapalain *et al.*, 2017; Pearson *et al.*, 1995). Most AHL-dependent promoters respond to 1 to 100 nM signals, with TraR of *A. tumefaciens* able to respond to 1-2 nM of the cognate signal 3-O-C<sub>8</sub>-HSL (Zhu *et al.*, 1998). Our reporter strain responds to the Apil-made AHL at a concentration of 10 pM. These features (production and activity at low concentration) are shared by other atypical AHL synthesized by atypical AHL synthases that prefer acyl-CoA substrates over acyl-ACP substrates: (i) Bjal of *B. japonicum* USDA110 produces isovaleryl-HSL at a concentration of 5 nM and the cognate regulator BjaR is sensitive to concentrations

of 10 pM (Lindemann *et al.*, 2011); (ii) Bral of *Bradyrhizobium sp.* BTAi1 synthesizes cinnamoyl-HSL that accumulates in culture fluids on the order of 30–65 nM and displays biological activity at 2–5 pM (Ahlgren *et al.*, 2011a).

### **The Apil-made atypical AHL controls plasmid transfer, a common QS-regulated phenotype**

For atypical AHL synthesized by CoA-dependent synthases, the cognate regulated functions are poorly documented, and no phenotype analysis has been reported on mutants inactivated in *luxI*-like or *luxR*-like gene, compared to the wild-type. Only *p*-coumaryl HSL of *R. palustris* was shown to control 17 genes including several that are likely involved in chemotaxis, a result obtained by comparing transcriptome of a wild-type strain with or without the addition of 10 μM synthetic signal (Schaefer *et al.*, 2008).

In our study, the conjugative transfer of the p130 plasmid is the phenotype that is undoubtedly regulated by the Apil compound. Regulation of plasmid transfer by QS is a common feature among *Rhizobiaceae*, with many studies carried on transfer of pTi in *A. tumefaciens*. As demonstrated for pTi, Apil-ApiR regulate *tra*, *trb* and *rep* operons and consequently plasmid transfer. But interestingly the p130 QS system controls other plasmidic genes, the role of which remains to be elucidated. Several other relevant differences between the pTi QS system and the p130 QS system can be underlined. Unlike *traI*, *apil* does not pertain to the transcriptional unit of *trb* (Fig. 2). Whereas *traR* belongs to the *arc* operon whose transcription occurs only in the presence of plant-made compounds (opines), *apiR* is transcribed from its own promoter independently of an exogenous compound; consequently, transfer of p130 can occur *in vitro*. An additional level of regulation of plasmid transfer is found for pTi and for other *Rhizobiaceae* plasmids with TraM, a protein able to form inactive heterodimers with TraR (Fuqua *et al.*, 1995); no *traM* gene is present on the p130 plasmid. Interestingly downstream of *apil*, lies an *rctA*-like gene that is likely co-transcribed with *apil* (Fig. 2). RctA is implicated in control of plasmid transfer in *Rhizobiaceae* when no QS system is present (Ding and Hynes, 2009; Perez-Mendoza *et al.*, 2005). However, an *rctA*-like gene has recently been reported on plasmid pAt of *A. tumefaciens* P4, the transfer of which is regulated by a QS system (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016).

The closest orthologues to Apil and ApiR (>90%) are encoded by genomes of *Agrobacterium sp.* DSM 25558 and *A. tumefaciens* ATCC 31700, and the corresponding genes lie within the same genetic environment. Hence, it is likely that these homologous QS systems control the same function, i.e. plasmid transfer. Next to these *Agrobacterium* orthologues, homologues of Apil and ApiR (with 40–50% identity) are found in several strains of *Mesorhizobium*, including *M. plurifarium*; however, the plasmidic localization of the cognate genes is uncertain as no *tra* genes could be detected in the vicinity of those genes.

LuxI-type synthases using acyl-CoA substrates maybe widespread (Dong *et al.*, 2017), offering a large potential for synthesis of atypical AHLs molecules acting at very low concentrations, implying that new unsuspected phenotypes could be regulated by QS.

## **Acknowledgments**

QD received a doctoral grant from the French Ministère de l'Éducation nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors are grateful to B. Manriquez, T. Garin, T. Meyer, C. Lavire and V. Gaillard from UMR5557 for their technical help, F. Hommais and B. Diel from UMR5240 for advices on RNA experiments, L. Sanchez from EA4707 for advices on grapevine experiments, E. Déziel, S. Milot and MC Groleau from INRS (Laval, Québec, Canada) for helpful discussions. This work made use of the technical platforms "Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité" and "Serre" at FR 41 (Université Lyon 1), as well as "Centre d'Etude des Substances Naturelles" (UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne).

## References:

- Ahlgren, N. A., Harwood, C. S., Schaefer, A. L., Giraud, E., and Greenberg, E. P. (2011). Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7183–7188. doi:10.1073/pnas.1103821108.
- Allaway, D., Schofield, N. A., Leonard, M. E., Gilardoni, L., Finan, T. M., and Poole, P. S. (2001). Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ. Microbiol.* 3, 397–406.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. 4th ed. Washington, D.C. : Boca Raton, FL: ASM Press ; CRC Press/Taylor & Francis.
- Boyer, M., and Wisniewski-Dyé, F. (2009). Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum: Cell–cell signalling in bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 1–19. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x.
- Burr, T. J., Bazzi, C., Süle, S., and Otten, L. (1998). Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82, 1288–1297.
- Burr, T. J., and Otten, L. (1999). Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 53–80.
- Campillo, T., Lavire, C., Shams, M., Pothier, J. F., and Pulawska, J. (2012). Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *J. Plant Pathol.*
- Cao, J.-G., and Meighen, E. A. (1993). Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 175, 3856–3862.
- Chapalain, A., Groleau, M.-C., Le Guillouzer, S., Miomandre, A., Vial, L., Milot, S., et al. (2017). Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and N-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a *Burkholderia cepacia* Complex Clinical Strain. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01021.
- Christie, P. J., Whitaker, N., and González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1578–1591. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.019.
- Churchill, M. E. A., Sibhatu, H. M., and Uhelson, C. L. (2011). “Defining the Structure and Function of Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers,” in *Quorum sensing*, ed. K. P. Rumbaugh (Totowa, NJ: Humana Press), 159–171. doi:10.1007/978-1-60761-971-0\_12.
- Cook, D. M., and Farrand, S. K. (1992). The oriT region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bacteriol.* 174, 6238–6246.
- d’Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., and Dessaux, Y. (2005). Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7, 1796–1808. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00886.x.
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645.
- Dequivre, M., Diel, B., Villard, C., Sismeiro, O., Durot, M., Coppée, J. Y., et al. (2015). Small RNA Deep-Sequencing Analyses Reveal a New Regulator of Virulence in *Agrobacterium fabrum* C58. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 580–589. doi:10.1094/MPMI-12-14-0380-FI.
- Ding, H., and Hynes, M. F. (2009). Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can. J. Microbiol.*
- Doberva, M., Stien, D., Sorres, J., Hue, N., Sanchez-Ferandin, S., Eparvier, V., et al. (2017). Large Diversity and Original Structures of Acyl-Homoserine Lactones in Strain MOLA 401, a Marine Rhodobacteraceae Bacterium. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01152.

- Dong, S.-H., Frane, N. D., Christensen, Q. H., Greenberg, E. P., Nagarajan, R., and Nair, S. K. (2017). Molecular basis for the substrate specificity of quorum signal synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 201705400. doi:10.1073/pnas.1705400114.
- Fuqua, C., Burbea, M., and Winans, S. C. (1995). Activity of the *Agrobacterium* Ti Plasmid Conjugal Transfer Regulator TraR Is Inhibited by the Product of the traM Gene. *J. Bacteriol.* 177, 1367–1373.
- Fuqua, W. C., and Winans, S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176, 2796–2806.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics* 12, 543–548.
- García-Rodríguez, F. M., Schrammeijer, B., and Hooykaas, P. J. J. (2006). The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Res.* 34, 6496–6504. doi:10.1093/nar/gkl877.
- Haudecoeur, E., Tannières, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2009). Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 529–537.
- He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J., and Fuqua, C. (2003). Quorum sensing in *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Regulates Conjugal Transfer (tra) Gene Expression and Influences Growth Rate. *J. Bacteriol.* 185, 809–822. doi:10.1128/JB.185.3.809-822.2003.
- Herlache, T. C., Zhang, H. S., Ried, C. L., Carle, S. A., Zheng, D., Basaran, P., et al. (2001). Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology* 91, 966–972.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligori, S., Expert, D., et al. (2008). PecS Is a Global Regulator of the Symptomatic Phase in the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 190, 7508–7522. doi:10.1128/JB.00553-08.
- Ikeda, T., Kajiyama, K., Kita, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., et al. (2001). The Synthesis of Optically Pure Enantiomers of N-Acyl-homoserine Lactone Autoinducers and Their Analogues. *Chem. Lett.*, 314–315.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. Steven, Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., et al. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Lang, J., and Faure, D. (2014). Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00014.
- Lang, J., Vigouroux, A., Planamente, S., El Sahili, A., Blin, P., Aumont-Nicaise, M., et al. (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. doi:10.1371/journal.ppat.1004444.
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., et al. (2011). Genomic Species Are Ecological Species as Revealed by Comparative Genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.* 3, 762–781. doi:10.1093/gbe/evr070.
- Le, S. Q., and Gascuel, O. (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320. doi:10.1093/molbev/msn067.
- Lépine, F., and Déziel, E. (2011). “Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Detection and Quantification of N-Acyl-L-Homoserine Lactones and 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines,” in *Quorum sensing*, ed. K. P. Rumbaugh (Totowa, NJ: Humana Press), 61–69.

- Li, S.-Z., Xu, R., Ahmar, M., Goux-Henry, C., Queneau, Y., and Soulère, L. (2018). Influence of the d / l configuration of N -acyl-homoserine lactones (AHLs) and analogues on their Lux-R dependent quorum sensing activity. *Bioorganic Chem.* doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.005.
- Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A. L., Mattmann, M. E., Christensen, Q. H., Kessler, A., et al. (2011). Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16765–16770. doi:10.1073/pnas.1114125108.
- Lowe, N., Gan, H. M., Chakravartty, V., Scott, R., Szegedi, E., Burr, T. J., et al. (2009). Quorum-sensing signal production by *Agrobacterium vitis* strains and their tumor-inducing and tartrate-catabolic plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 102–109. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01627.x.
- Mhedbi-Hajri, N., Yahiaoui, N., Mondy, S., Hue, N., Pélissier, F., Faure, D., et al. (2016). Transcriptome analysis revealed that a quorum sensing system regulates the transfer of the pAt megaplasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *BMC Genomics* 17. doi:10.1186/s12864-016-3007-5.
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., et al. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 208–215. doi:10.1016/j.syapm.2013.12.007.
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. doi:10.1038/nrmicro.2016.89.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., and Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4360–4365.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1490–1494.
- Perez-Mendoza, D., Sepulveda, E., Pando, V., Munoz, S., Nogales, J., Olivares, J., et al. (2005). Identification of the rctA Gene, Which Is Required for Repression of Conjugative Transfer of Rhizobial Symbiotic Megaplasms. *J. Bacteriol.* 187, 7341–7350. doi:10.1128/JB.187.21.7341-7350.2005.
- Petit, A., Tempé, J., Kerr, A., Holsters, M., Van Montagu, M., and Schell, J. (1978). Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* 271.
- Piper, K. R., Beck von Bodman, S., Hwang, I., and Farrand, S. K. (1999). Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 32, 1077–1089.
- Piper, K. R., Bodman S. B. V., and Farrand S. K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Lett. Nat.* 362, 448–450.
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21.
- Sanchez-Contreras, M., Bauer, W. D., Gao, M., Robinson, J. B., and Allan Downie, J. (2007). Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1149–1163. doi:10.1098/rstb.2007.2041.
- Schaefer, A. L., Greenberg, E. P., Oliver, C. M., Oda, Y., Huang, J. J., Bittan-Banin, G., et al. (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454, 595–599. doi:10.1038/nature07088.
- Simon et al (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *E coli SM10. Nat. Biotechnol.*
- Slater, S. C., Goldman, B. S., Goodner, B., Setubal, J. C., Farrand, S. K., Nester, E. W., et al. (2009). Genome Sequences of Three *Agrobacterium* Biovars Help Elucidate the Evolution of

- Multichromosome Genomes in Bacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2501–2511. doi:10.1128/JB.01779-08.
- Stacy, D. M., Welsh, M. A., Rather, P. N., and Blackwell, H. E. (2012). Attenuation of Quorum sensing in the Pathogen *Acinetobacter baumannii* Using Non-native N -Acyl Homoserine Lactones. *ACS Chem. Biol.* 7, 1719–1728. doi:10.1021/cb300351x.
- Stevens, A. M., and Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Essential Elements for Activation of the Luminescence Genes. *J. Bacteriol.* 179, 557–562.
- Süle, S., Cursino, L., Zheng, D., Hoch, H. C., and Burr, T. J. (2009). Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 596–601. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02716.x.
- Szegedi, Otten, and Czako (1992). Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 5, 435–438.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Taylor, R. K., Manoil, C., and Mekalanos, J. J. (1989). Broad-host-range vectors for delivery of Tnp<sub>h</sub>oA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 171, 1870–1878.
- Thiel, V., Kunze, B., Verma, P., Wagner-Döbler, I., and Schulz, S. (2009). New Structural Variants of Homoserine Lactones in Bacteria. *ChemBioChem* 10, 1861–1868. doi:10.1002/cbic.200900126.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V., and Brom, S. (2003). Conjugative Transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, Which Is Required for Mobilization of the Symbiotic Plasmid, Is Regulated by Quorum sensing. *J. Bacteriol.* 185, 1681–1692. doi:10.1128/JB.185.5.1681-1692.2003.
- Vial, L., Cuny, C., Gluchoff-Fiasson, K., Comte, G., Oger, P. M., Faure, D., et al. (2006). N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule: AHL-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 155–168. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00153.x.
- Wagner-Döbler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., et al. (2005). Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6, 2195–2206. doi:10.1002/cbic.200500189.
- Wang, C., Yan, C., Fuqua, C., and Zhang, L.-H. (2014). Identification and Characterization of a Second Quorum-Sensing System in *Agrobacterium tumefaciens* A6. *J. Bacteriol.* 196, 1403–1411. doi:10.1128/JB.01351-13.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365–404.
- Wisniewski-Dyé, F., and Downie, J. A. (2002). Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 397–407.
- Zheng, D., and Burr, T. J. (2013). An Sfp-Type PPTase and Associated Polyketide and Nonribosomal Peptide Synthases in *Agrobacterium vitis* Are Essential for Induction of Tobacco Hypersensitive Response and Grape Necrosis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 812–822. doi:10.1094/MPMI-12-12-0295-R.
- Zhu, J., Beaver, J. W., Moré, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180, 5398–5405.

**Table S1 : Bacterial strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Source
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
JM109	F' <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacIq Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Promega
SM10	Rec-derivative of <i>E. coli</i> C600 34 with RP4-2-Tc::Mu integrated into the chromosome	Simon <i>et al</i> , 1983
<b><i>Allorhizobium vitis</i> S4 strains</b>		
S4	Tumorigenic strain, wild-type	Slater <i>et al.</i> 2009
S4 p130::NeoKan <sup>R</sup>	Tumorigenic strain, p130:: <i>aphT</i> , Neo <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	This study
S4 pTi::Gm <sup>R</sup>	Tumorigenic strain, pTi:: <i>aacC1</i> , Gm <sup>R</sup>	This study
<b>S4Δ<i>apil</i></b>	<i>apil</i> mutant of strain S4, p130:: <i>aphT</i> , Δ <i>apil</i> , Gm <sup>R</sup>	This study
<b>S4Δ<i>apil</i> pBBRMCS5::<i>apil</i></b>	Complemented <i>apil</i> mutant of strain S4Δ <i>apil</i> , Gm <sup>R</sup> carrying pBBRMCS5- <i>apil</i> Gm <sup>R</sup>	This study
<b>S4Δ<i>apil</i> P<sub><i>apil</i></sub>-<i>egfp</i></b>	Reporter strain, Gm <sup>R</sup>	This study
<b>S4<i>apilR</i>::Gm<sup>R</sup></b>	Tumorigenic strain, p130:: <i>aphT</i> , <i>apilR</i> ::Gm, Gm <sup>R</sup>	This study
<b>S4Δ<i>avsl</i></b>	Tumorigenic strain, p130:: <i>aphT</i> , <i>avsl</i>	This study
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain</b>		
UIA5	<i>A. fabrum</i> C58 Strain lacking the At and Ti plasmids	Cook and Farrand, 1992
<b>Plasmids</b>		
pBBR1-MCS5	Gm <sup>R</sup> broad-host-range vector, P <sub><i>lac</i></sub>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1-MCS5- <i>apil</i>	Plasmid expressing <i>apil</i> constitutively	This study
pOT1e	Promoter-probe vector based on pBBR1MCS5 replicon; contains promoterless <i>egfp</i> ; Gm <sup>R</sup>	(Allaway <i>et al.</i> , 2001)
pOT1e- P <sub><i>apil</i></sub> - <i>egfp</i>	pOT1e carrying the <i>apil</i> promoter upstream <i>egfp</i>	This study
pJQ200sk	pBluescriptSK MCS, P15A ori, <i>sacB</i> , RP4, Gm <sup>R</sup>	Quandt and Hynes, 1993
pJQ200sk-Δ <i>apil</i>	pJQ200sk used to delete <i>apil</i> in S4Δ <i>apil</i>	This study
pJQ200sk-Δ <i>avsl</i>	pJQ200sk used to delete <i>apil</i> in S4Δ <i>avsl</i>	This study
pJQ200sk-Δ <i>apilR</i>	pJQ200sk used to delete <i>apilR</i> in S4Δ <i>apil</i>	This study
pGEMTeasy	Cloning vector for PCR products, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	Invitrogen
pKD4	Plasmid used for amplifying the kanamycin cassette resistance	Datsenko and Wanner, 2000



**Table S2 : PCR primers used in this study.**

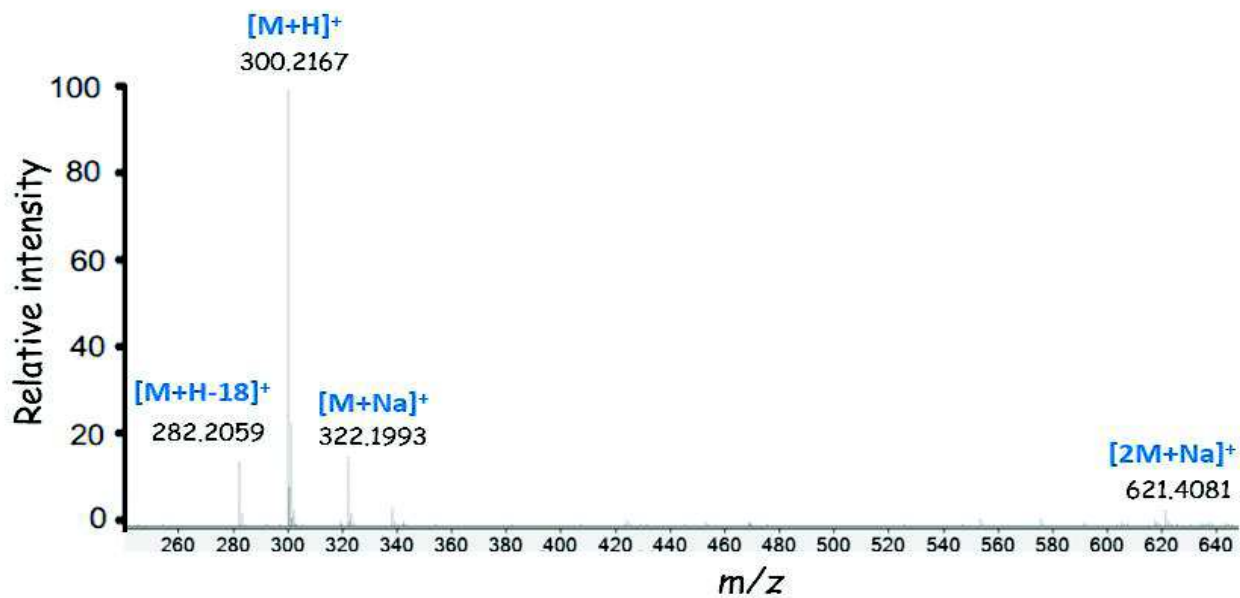
Target gene or region	Sequence of primers
<b>Primers for mutagenesis</b>	
<i>apil</i> Up	F CTGGAAAACCGCAAGAGAAG R GAGAGGGGAAGTTTCAAAGGGTCGGAGCTATACCGCCGAGAATACCATCTGCGCGTCTCTTGAA
<i>apil</i> Down	F GTATTCTCGGCGGTATAGCT R GGCTTTGCAACGTCTAGCTT
p130 neokan Up	F TGAGGGATCGAATTGGTCAT R TAGAAAAGTATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACACAGACCGTTCAAGCCAGTCG
p130 neokan Down	F AGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGTTAGGAAAAGGTCCGCACGC R GTTGATCCGGAGCGTTCTC
neokan gene	F TGTGTAGGCTGGAGCTGCTT R CCATATGAATATCCTCCTTA
pTi genta Up	F TTCGGTCCAGACAAGGACAT R TGCGCCGTTACCACCGTCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACGAGTTTGCCTGCTCGTCG
pTi genta Down	F TTCCCGGCCGCGAGTTGTTCCGGTAAATTGTCACAACGCCGCAAGGATCACGCCAAGCCC R TGATTGCTGCACAGCTAGAGA
genta gene	F GTCCAGAACCTTGACCGAAC R GGCGTTGTGACAATTTACCG
<i>avsl</i> Up	F GAATTCCTGCAGCCCAAACGGAGTTGTCGGTGTTT R TTTTTCATGGCATCGCTGCTTATGTCGGCTGTTCA
<i>avsl</i> Down	F CGATGCCATGAAAAACATTG R ACTAGTGGATCCCCCAACCATATCCTTGGCCTCGT
<i>apiR</i>	F GAATTCCTGCAGCCCATACATTTACACCGGGCTG R ACTAGTGGATCCCCCAACCGATGATCCGCTTGTT
<b>Primers for gfp fusion</b>	
<i>P<sub>apil</sub></i>	F ATCGATAAGACGGATTGGGAGATCG R TGACATGAACCAACATCTGC
pOT1e	F CATTCTTCTCTCCACTAG R CGGTTTACAAGCATAAAGC
<b>Primers for heterologous expression</b>	
<i>apilcomp</i>	F GGGCCCAAGGAACCTGAACTTTCGCG R ACTAGTAATGACCGTGAACAGCCCTA
<b>Primers for RT-PCR</b>	
<i>traA</i>	F AGATTGGGTCTATCACGATG R TACTGAATCTGACCGGACTT
<i>apiR</i>	F AAAACCGCAAGAGAAGAGA R CAATGTTCTCTTTGCCAAT
<i>traG</i>	F TGTCTTCCGTATGAAAGGAT R AGCTCGAAAAGATTACAAG
<i>repA</i>	F CTATTCGCTACGATGACCTT R ATGAAGAACATGTCGGTTTC
<i>Avi_9636</i>	F TCTCTTCAATCTCAGGCACT R GAATATTGGAAATCGCTGAC
<i>AVI_RS23380</i>	F ACATCCTACTAAGGCACGAA R TAAGGTCGTATTGGGACATC
<i>trbE</i>	F CCTTGATTGACTTCTTCTGC R CCTTACAGGATCTCGATACG
<i>Avi_5624</i>	F ATGCGACTGAAGTAGATGGT R GGGTCTGTAAACATTGATGG
<i>avsl</i>	F GTTCACCAACACCACACAT R CGAATATGCTGGATGATACC
<i>Avi_1866</i>	F CGACATTCAACAATACGATG R GTGTTCTGAGCCTTCTTG



**Fig. S1 Sequence alignment of ApiI with BjaI (Q89VI2) BraI (A4YLT1) and RpaI (Q6NCZ6).**

Residues described as conserved within the CoA-synthase family are surrounded in red (Dong *et al.* 2017). Analysis of BjaI from *B. japonicum* USDA110 suggested that Trp142 and Trp143 form an “indole platform” that provides a foundation for binding to the adenine ring of the acyl-CoA. Numerous hydrophobic residues provide a CoA binding tunnel including Ile27, Phe28, Trp34, Tyr104, Val106, and Trp143 (Dong *et al.*, 2017). Conserved residues of the AHL synthase family are surrounded in black (Watson *et al.*, 2002).





**Fig. S3** Mass spectrum of the Apil molecule.

The Apil molecule corresponds to a molecular mass of 299 Da, with the molecular formula  $C_{16}H_{29}NO_4$  (theoretical mass for  $[M+H]^+$ , 300.216935, calculated for  $C_{16}H_{30}NO_4$ ; mass error, -0.78 ppm). The ionic species  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[2M+Na]^+$  and  $[M+H-18]^+$  are shown.

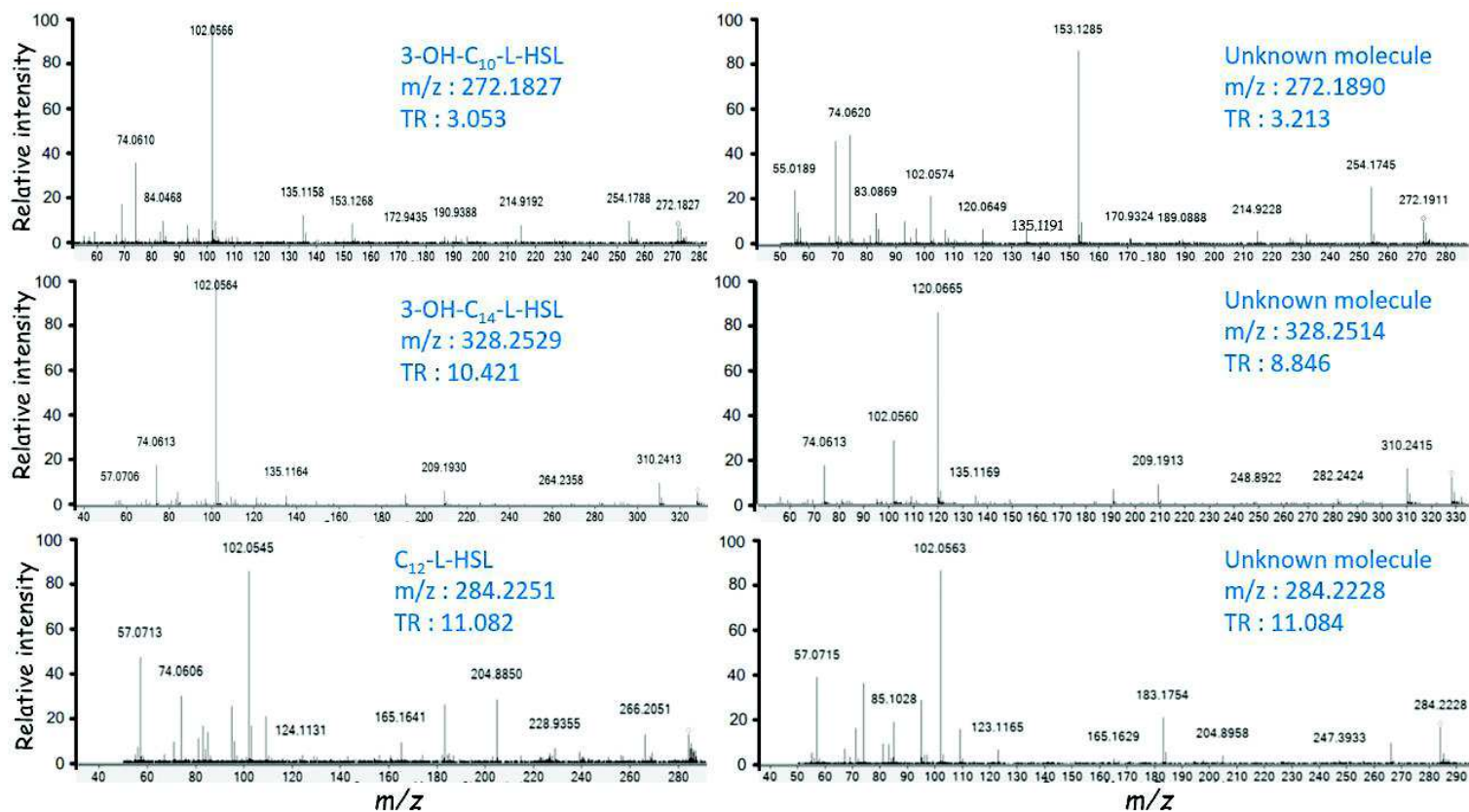
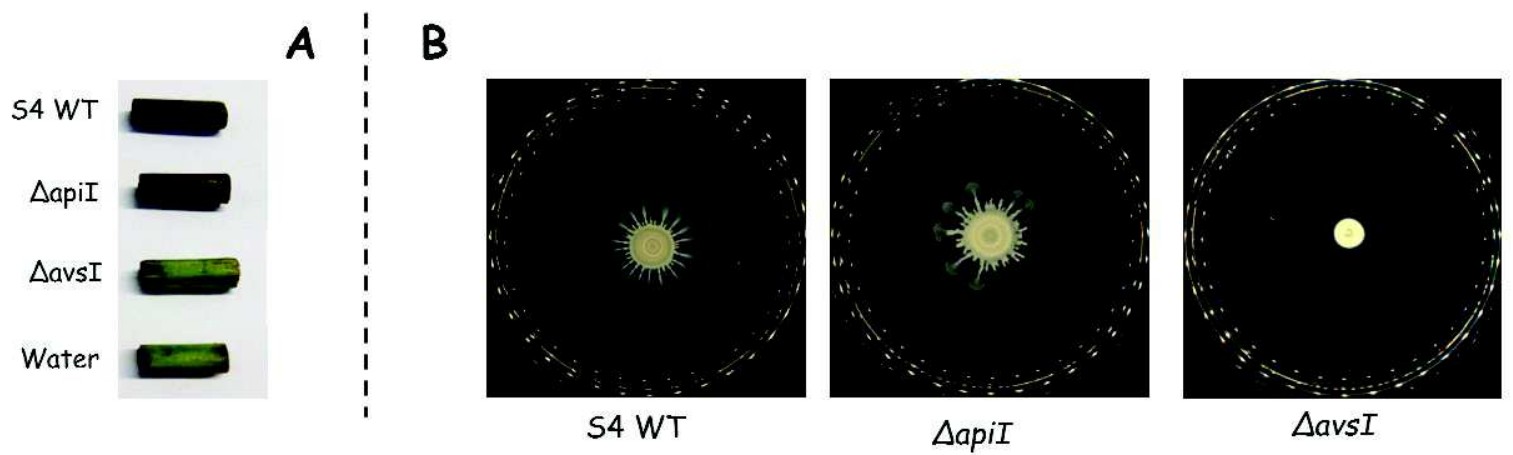


Fig. S4 The MS/MS mass spectra of 3-OH-C<sub>10</sub>-L-HSL, 3-OH-C<sub>14</sub>-L-HSL and C<sub>12</sub>-L-HSL compared with molecules product by *A. vitis* S4.



**Fig. S5 Necrosis on grapevine explants (A) and swarming motility (B) exhibited by *A. vitis* S4 wild-type, *S4 $\Delta apiI$*  and *S4 $\Delta avsI$*  strains.**

Development of necrosis was scored over a period of 5 days and swarming motility was observed after 2 days of incubation. No differences were observed for swarming mobility and necrosis between S4 wild-type and *S4 $\Delta apiI$*  strains. However the *S4 $\Delta avsI$*  strain is incapable of inducing the formation of necrosis nor performing mobility by swarming.



# Chapitre 3 : Implication du plasmide Cu d'*Allorhizobium vitis* S4 dans la résistance au cuivre

## Introduction

Le cuivre est un oligo-élément essentiel pour tous les organismes vivants. Pour de nombreuses enzymes telles que des oxydases, monooxygénases, dioxygénases, et superoxyde dismutases, le cuivre joue un rôle de cofacteur ce qui le rend indispensable au fonctionnement des enzymes (M. D. Harrison *et al.*, 2000). Cependant, à forte concentration le cuivre est hautement toxique pour les cellules aérobies. En effet, il peut réagir avec l'oxygène et former des composés cytotoxiques ou entraîner une détérioration de l'ADN et de certaines protéines (Flemming and Trevors, 1989; Gaetke, 2003). La résistance au cuivre, ou homéostasie du cuivre, est donc un mécanisme très important afin de répondre aux changements de concentration en cuivre dans le milieu environnant et ainsi conserver une concentration intracellulaire adaptée (Cha and Cooksey, 1993; Nawapan *et al.*, 2009; Rensing and Grass, 2003; Solioz and Stoyanov, 2003). Des civilisations anciennes (Aztèques, Grecs, Romaines Egyptiennes) jusqu'à notre civilisation actuelle, le cuivre a toujours été utilisé en santé humaine ou comme intrant agricole. Cette utilisation dans de nombreux domaines ainsi que sur une longue période a entraîné l'apparition de résistances chez une multitude d'organismes vivants tels que les bactéries (Michels, 2006).

Chez les microorganismes, différents modèles bactériens ont été étudiés afin de mieux comprendre les mécanismes de la résistance au cuivre et les gènes impliqués. C'est le cas d'*Enterococcus hirae* qui possède l'opéron appelé *cop* comportant les gènes *copY*, *copZ*, *copA* et *copB* impliqués dans la résistance au cuivre (Solioz and Stoyanov, 2003). CopA permet l'internalisation du cuivre lorsque celui-ci est en conditions limitantes alors que CopB est une ATPase permettant d'exporter le cuivre en dehors de la cellule lorsqu'il atteint une forte concentration. Le rôle de CopA en tant que protéine permettant l'internalisation du cuivre reste toutefois imprécis car le mécanisme n'a pas été caractérisé (Rensing and Grass, 2003). L'expression de cet opéron est régulée par le répresseur transcriptionnel CopY et par la protéine chaperonne CopZ qui lui transfère des molécules de cuivre. Une fois que la protéine régulatrice CopY est complexée au cuivre, elle libère le promoteur de l'opéron permettant ainsi son expression (Multhaup *et al.*, 2001; Stoyanov *et al.*, 2001). Chez *Escherichia coli*, la transcription du gène *copA* est régulée par l'activateur transcriptionnel CueR. Contrairement au rôle qu'il possède chez *E. hirae*, le transporteur CopA d'*E. coli* permet la translocation du cuivre de l'intérieur de la cellule jusque dans le périplasme. Le cuivre est ensuite exporté à



l'extérieur de la cellule grâce à une pompe à efflux codée par l'opéron *cusCFBA*, dont la transcription est régulée par le système à deux composants CusR-CusS (Rensing and Grass, 2003). Les régulateurs CueR et CusR-CusS répondent tous les deux à la présence de cuivre dans le milieu environnant. L'opéron *copABCD* de *Pseudomonas syringae* est également impliqué dans l'homéostasie du cuivre (Cha and Cooksey, 1991, 1993). CopA et CopB permettent toutes les deux d'exporter le cuivre, CopC est une protéine chaperonne située dans l'espace périplasmique possédant deux domaines de fixation au cuivre (Arnesano F. *et al.*, 2002; Koay *et al.*, 2005) et CopD est un transporteur de cuivre situé dans la membrane interne permettant l'internalisation du cuivre (Cooksey, 1993; Puig *et al.*, 2002). Cet opéron est régulé par le système à deux composants CopR-CopS, dont les gènes sont localisés en aval de l'opéron *copABCD*.

Pour les bactéries de la rhizosphère et particulièrement pour celles présentes sur des terrains agricoles, l'homéostasie du cuivre est importante puisque de nombreux intrants agricoles antimicrobiens contiennent une forte concentration en cuivre. Chez les *Rhizobiaceae*, notamment chez *Ensifer meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, plusieurs protéines comme ActA et ActP sont impliquées dans la résistance au cuivre (Reeve *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 1996). ActA est une protéine de la membrane interne qui fixe le cuivre présent dans le cytoplasme puis le transporteur ActP, situé dans la membrane externe, exporte le cuivre en dehors de la cellule lors de concentrations trop élevées. Des gènes de résistance au cuivre ont également été décrits chez certaines agrobactéries, qui sont des *Rhizobiaceae* indigènes du sol pouvant induire la galle du collet chez de nombreuses espèces de plantes. Ainsi, le chromosome circulaire d'*Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (souche dérivée de la souche modèle *A. fabrum* C58) héberge l'opéron *copARZ*. CopR (Atu0938) est un régulateur transcriptionnel régulant positivement l'opéron *copARZ* en présence de cuivre, CopZ (AERS4k1\_0921) est une protéine chaperonne se fixant au cuivre et permettant son transfert à CopA (Atu0937) qui est une pompe à efflux permettant l'export du cuivre en dehors de la cellule (Nawapan *et al.*, 2009). Des gènes paralogues à *copA*, *copR* et *copZ* ont également été mis en évidence dans le génome d'*A. tumefaciens* NTL4 : les protéines codées par *atu1195*, *atu1197* et *atu1203* présentent 56%, 44% et 33% d'identité avec CopA, CopR et CopZ. Les prédictions sur le rôle d'autres protéines codées par les gènes *atu3990*, *atu3991*, et *atu3992* présents sur le chromosome linéaire indiquent que ces protéines pourraient également être impliquées dans la résistance au cuivre. Cependant aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée sur ces gènes (Nawapan *et al.*, 2009).

*Allorhizobium vitis* est une agrobactérie ayant la particularité d'induire la galle du collet uniquement chez la vigne (Burr and Otten, 1999). Elle est donc régulièrement confrontée à une exposition au cuivre via les traitements phytosanitaires appliqués sur la vigne. L'étude des gènes portés par le plus petit plasmide d'*A. vitis* S4 (79 kb, nommé pCu) nous a permis d'identifier une région de 22

kb qui pourrait être impliquée dans la résistance au cuivre. Ceci nous a conduits à analyser la résistance au cuivre d'une collection d'agrobactéries appartenant aux espèces *A. vitis* et *A. tumefaciens* isolées d'environnements variés. Enfin, nous avons analysé la distribution des gènes de résistance au cuivre parmi les génomes séquencés des souches criblées, et tenté de corrélérer cette distribution aux valeurs de CMI.

## Matériels et méthodes

### Milieux et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 1. Les souches d'*A. tumefaciens* ont été mises en culture sur du milieu LPG gélosé (extrait de levure 5 g/L, peptone 5 g/L, glucose 10 g/L, agar 15g/L), les souches d'*A. vitis* sur du milieu TY gélosé supplémenté en CaCl<sub>2</sub> (tryptone 5g/L, extrait de levure 3 g/L, agar 15 g/L et CaCl<sub>2</sub> 7 mM) et toutes ont été incubées à 28°C. Lors des tests de croissance en présence de cuivre, le milieu LBm (extrait de levure 5 g/L, tryptone 10 g/L et NaCl 5g/L) a été utilisé avec différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les tests de résistance au cuivre ont été réalisés par suivi de la croissance bactérienne en milieu liquide LBm par mesure de la densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub> nm) toutes les 20 min. A partir de précultures en LBm, des cultures ont étéensemencées à une DO de 0,1 en microplaque dans 200 µL de LBm supplémenté en cuivre à des concentrations de 0 ; 2,5 mM ; 5 mM ; 7,5 mM et 10 mM. Les tests ont été réalisés en triplicat et la DO a été mesurée grâce à un appareil Bioscreen (Labsystem, Labsystem France SA, Les Ulis, France). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est utilisée pour déterminer la résistance au cuivre des souches.

### Analyse de la distribution des gènes de résistance au cuivre

Les gènes potentiellement impliqués dans la résistance au cuivre ont été recherchés dans la totalité des génomes séquencés des souches étudiées en effectuant des blasts de séquence peptidique de protéines connues. La détection de domaines protéiques a également été réalisée via l'outil InterProScan (Jones *et al.*, 2014) et seuls les domaines caractérisés par les méthodes TIGRFAM et/ou PFAM ont été considérés.

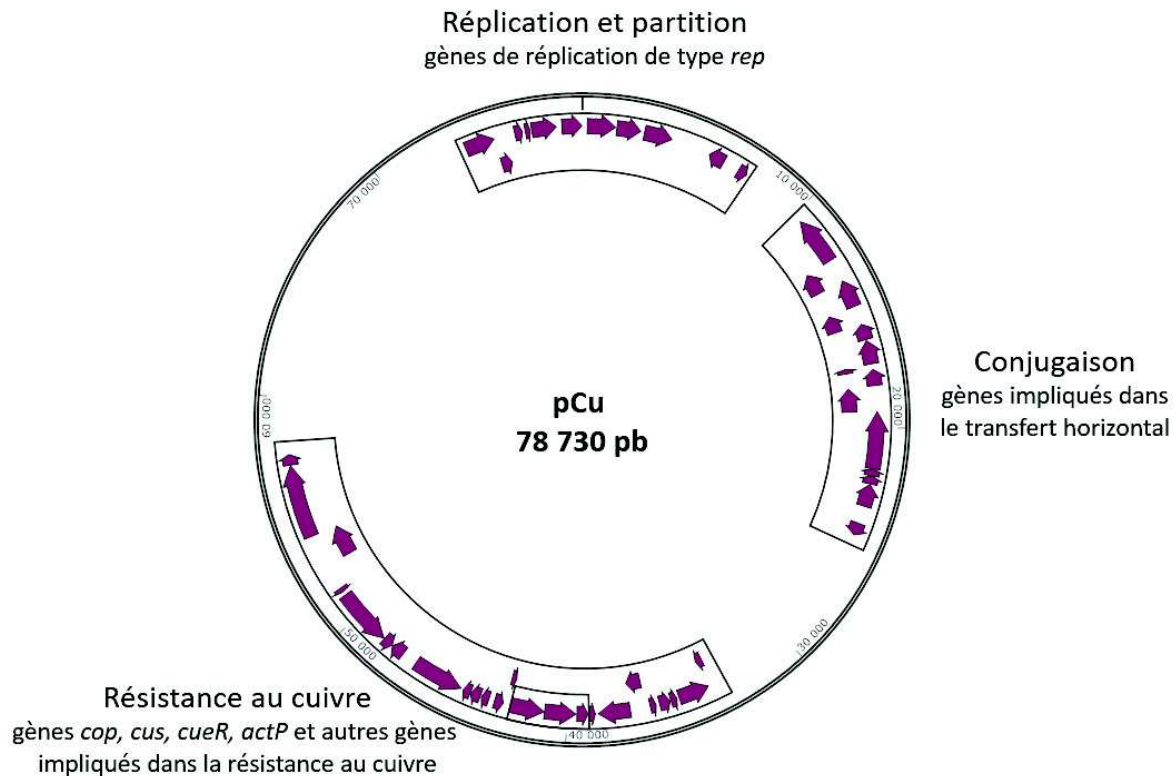
Souche	Génotype et/ou origine	Source	Concentration minimale inhibitrice
<b>Souches d'<i>Allorhizobium vitis</i> (toutes isolées de la vigne)</b>			
S4* <sup>1</sup>	Souche de référence, Hongrie	Slater <i>et al</i> 2009	> 10 mM
KFB 239	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
KFB 242	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
KFB 251	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
KFB 253	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
KFB 254	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
KFB 264	Serbie	Kuzmanović <i>et al.</i> , 2014	5 mM
IVE-013	Bulgarie	Genov <i>et al.</i> , 2015	7,5 mM
IVE-021	Bulgarie	Genov <i>et al.</i> , 2015	2,5 mM
B-29	-	Malenin, 1973	5 mM
RF 2/1	Hongrie	Lowe, 2009	5 mM
CFBP2736	Australie	Ridé <i>et al.</i> , 2000	5 mM
<b>Souches d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>			
C58*	G8, isolée d'un cerisier, USA	Watson <i>et al.</i> , 1975	7,5 mM
CFBP2407	G4, isolée de la vigne, France	Ridé <i>et al.</i> , 2000	7,5 mM
CFBP2682	G1, isolée de la vigne, France	Non publié	7, 5 mM
CFBP1904	G1, Isolée de la vigne, Grèce	Ridé <i>et al.</i> , 2000	7,5 mM
CFBP1873	G6, isolée du Dahlia, France	Digat, non publié	5 mM
NCPPB925*	G6, isolée d'un milieu hospitalier, France	Popoff <i>et al.</i> , 1984	7,5 mM
182	G7, isolée de la vigne, Tunisie	Nabi <i>et al.</i> (en préparation)	7,5 mM
CFBP6625*	G5, isolée de nourriture pour patients, France	Popoff <i>et al.</i> , 1984	7,5 mM
CFBP6624	G3, isolée de prélèvement humain	Kiredjian, 1979	7,5 mM
CIP43-76	G2, isolée d'urine humaine	Popoff <i>et al.</i> , 1984	7,5 mM
Hayward O362*	G9, isolée de terreau, Australie	Kerstens <i>et al.</i> , 1973	7,5 mM
CFBP5875	G2, isolée d'eau d'égout, Belgique	Costechareyre <i>et al.</i> , 2010	7,5 mM
CFBP6623*	G3, isolée de flacon d'antiseptique, France	Popoff <i>et al.</i> , 1984	10 mM
CFBP6626*	G5, isolée de liquide céphalo-rachidien, France	Popoff <i>et al.</i> , 1984	10 mM
82183	G4, isolée de la vigne, France	Ridé <i>et al.</i> , 2000	7,5 mM

**Tableau 1 : Caractéristiques des souches testées pour leur résistance au cuivre.**

CIP : Collection de l'Institut Pasteur ; NCPPB : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Royaume Uni ; CFBP : Collection Française des Bactéries associées aux Plantes, INRA, Angers (France) ; G1-G9 : Génomovar 1 – Génomovar 9 ; \* : génome séquencé.

<sup>1</sup> la souche *A. vitis* S4 se développe en présence de 10mM de cuivre qui est la plus forte concentration en cuivre testée au cours de cette étude

L'annotation manuelle de la région du pCu (Tableau 2) a été réalisée grâce à la plate-forme MicroScope du Génoscope (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php?>). Une fonction a été assignée à la protéine lorsqu'une identité supérieure à 30% (sur une longueur minimale de 80%) a été trouvée avec une protéine caractérisée au niveau fonctionnel (base de données SwissProt).



**Figure 1 : Représentation schématique du plasmide Cu d'*Allorhizobium vitis* S4.**

Les gènes n'étant pas impliqués dans la réplication et le transfert du plasmide ou dans la résistance au cuivre ne sont pas représentés. La longueur des gènes et des régions intergéniques a été respectée.

## Résultats et discussion

### 1) Analyse du plasmide Cu d'*A. vitis* S4

Le génome de la souche *A. vitis* S4 est composé de 7 réplicons : 2 chromosomes et 5 plasmides. Le plus petit réplicon est le pCu, un plasmide de 79 kb qui, à notre connaissance, n'a jamais été décrit chez aucune autre souche d'*Agrobacterium* ou d'*Allorhizobium* (Figure 1). D'après les annotations automatiques, ce plasmide code 100 ORFs, dont un système de réplication de type repABC et des gènes de transfert permettant la mise en place d'un système de sécrétion de type IV. Une région de 22 kb de ce plasmide comporte une grande majorité de gènes dont les annotations automatiques suggèrent

leur implication dans la résistance au cuivre. En dehors de la région impliquée dans la réplication, le transfert et la région de 22 kb, les autres gènes présents sur ce plasmide codent pour la plupart des protéines hypothétiques ou des transposases.

Le pourcentage GC de la région de 22 kb potentiellement impliquée dans la résistance au cuivre (57,6 %) ne diffère que peu de celui du plasmide (56,8 %) ou de celui du génome total d'*A. vitis* S4 (57,6 %). L'annotation manuelle de cette région a révélé que parmi les 25 protéines codées, 7 présentent des identités d'au minimum 30% sur 80% de leur longueur avec des protéines ayant été caractérisées fonctionnellement pour leur implication dans la résistance au cuivre chez différents organismes (Tableau 2) (*E. coli*, *P. syringae*, *E. hirae*) (Cha and Cooksey, 1991; Nawapan *et al.*, 2009; Reeve *et al.*, 2002; Rensing and Grass, 2003; Tiwari *et al.*, 1996). Sept autres protéines possèdent des domaines de fixation au cuivre (Avi\_9842 / 9844 / 9848 / 9849 / 9850 / 9851 / 9867) mais ne présentent pas de fortes homologues avec des protéines ayant été caractérisées. Enfin, dix protéines n'ont pas de fonction prédite.

Les protéines présentant le plus fort pourcentage d'identité avec ces 25 protéines sont toutes retrouvées chez des souches de la famille des *Rhizobiaceae* (Figure 2 et tableau 1). Pour huit de ces protéines le plus fort pourcentage d'identité est retrouvé pour des protéines codées par le génome de la souche *Agrobacterium sp.* SUL3 et sont présentes dans une région génomique présentant une forte synténie avec celle du pCu d'*A. vitis* S4 (Jones *et al.*, 2016). Cependant, le génome d'*Agrobacterium sp.* SUL3 n'étant disponible que sous la forme de contigs, la localisation chromosomique ou plasmidique de cette région ne peut être déterminée.

Il est également à noter que plusieurs gènes de cette région codent des protéines paralogues (Avi\_9844 et Avi\_9849, 93% d'identité / Avi-9859 et Avi\_9864, 52% d'identité), ce qui laisse supposer que plusieurs duplications ont eu lieu au sein de cette région.

## 2) Résistance au cuivre de différentes souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*

Des tests de résistance au cuivre ont été réalisés sur une sélection de souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*. Les souches d'*A. tumefaciens* ont été choisies pour représenter la plupart des espèces génomiques connues. Des souches d'*A. tumefaciens* isolées de la vigne ont également été sélectionnées pour cette analyse (Tableau 1).

La majorité des souches d'*A. vitis* ne peut pas se développer à partir d'une concentration de 5 mM de cuivre, à l'exception de la souche IVE-013 qui peut se développer jusqu'à 7,5 mM et la souche

**Tableau 2 : Annotation manuelle de la région de résistance au cuivre du pCu d'*A. vitis* S4.**

Matricule	Nom	Descriptif	Organisme et pourcentage d'identité le plus proche*	Domaines protéiques
Avi_9842		Protéine putative de fixation au cuivre	<i>Sinorhizobium</i> sp. GL2, 81%	IPR021647 : Protéine périplasmique de fixation au cuivre, CusF
Avi_9844		Protéine putative de fixation au cuivre	<i>Rhizobium</i> sp. CF258, 86%	IPR000923 : Fixation aux ions cuivre
Avi_9845		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749, 57%	Aucun domaine
Avi_9846	<i>copR</i>	Régulateur de réponse se fixant à l'ADN	<i>A. tumefaciens</i> , 85% * <i>P. syringae</i> PS51, 50%	IPR001867 : Fixation à l'ADN IPR001789 : Receveur, régulateur de réponse de transduction de signal
Avi_9847		Histidine kinase senseur	<i>Rhizobium</i> sp. LC145, 66%	IPR003660 : Transduction de signal IPR003594 : Histidine kinase ATPase
Avi_9848		Protéine putative de fixation au cuivre	<i>Rhizobium</i> sp. OK665, 83%	IPR021647 : Protéine périplasmique de fixation au cuivre, CusF
Avi_9849		Protéine putative de fixation au cuivre	<i>Rhizobium</i> sp. CF258, 89%	IPR000923 : Fixation aux ions cuivre
Avi_9850		Oxydase putative impliquée dans la résistance au cuivre	<i>Sinorhizobium</i> sp. M14, 93%	IPR011707 : Fixation aux ions cuivre IPR011706 : Activité d'oxydoréductase
Avi_9851		Protéine putative de résistance au cuivre	<i>R. leguminosarum</i> , 88%	IPR003423 : Activité de transporteur, IPR003423 : Activité de transporteur
Avi_9852		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 81%	
Avi_9853		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 68%	
Avi_9854		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 56%	
Avi_9856		Protéine hypothétique	<i>Rhizobium</i> sp., 58%	IPR005183 : Domaine de fonction inconnu DUF305
Avi_9857		Protéine hypothétique	<i>Rhizobium</i> sp. 9140, 92%	
Avi_9859	<i>copA</i>	ATPase transporteur du cuivre	<i>Rhizobium</i> sp. 9140, 95% * <i>L. pneumophila</i> DSMZ 7513, 65%	IPR001757 : Domaine d'intégration à la membrane, IPR027256 : Activité ATPase de transport de cations et IPR008250 : Fixation aux ions métal
Avi_9861		Protéine hypothétique	<i>Rhizobium</i> sp. Leaf453, 74%	
Avi_9862		Cytochrome C putatif	<i>Rhizobium</i> sp. Leaf453, 80%	IPR002321 : Fixation aux ions fer
Avi_9863	<i>hmrR</i>	Régulateur transcriptionnel cuivre dépendant	<i>Rhizobium giardinii</i> , 97% * <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> WSM710, 52%	IPR011789 : Régulation positive de la transcription (MerR-like)
Avi_9864	<i>actP</i>	ATPase transporteur du cuivre	<i>Rhizobium giardinii</i> , 91% * <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> WSM710, 50%	IPR006122 : Fixation aux ions cuivre (2 domaines) IPR027256 : Domaine d'intégration à la membrane
Avi_9865	<i>copZ</i>	Chaperonne du cuivre	<i>Rhizobium giardinii</i> , 88% * <i>S. aureus</i> NCTC 8325, 34%	IPR006121 : Fixation aux ions métal
Avi_9866		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 66%	
Avi_9867		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 81%	IPR032693 : Domaine de type YtkA retrouvé dans la région C-terminale de la protéine de transport du cuivre YcnJ
Avi_9868	<i>cusB</i>	Protéine membranaire d'efflux du cuivre	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 86% * <i>E. coli</i> K12, 29%	IPR032317 : Transporteur membranaire
Avi_9869	<i>cusA</i>	Protéine membranaire d'efflux de cations	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 95% * <i>E. coli</i> K12, 54%	IPR004763 : Activité de transporteur de cation transmembranaire
Avi_9870		Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium</i> sp. SUL3, 84%	IPR007332 : Domaine de fonction inconnu DUF411

\* Pour chaque protéine d'*A. vitis* S4, l'outil BLASTP a permis d'identifier, parmi les séquences déduites des génomes séquencés, les protéines orthologues présentant le plus fort pourcentage d'identité ; l'organisme hébergeant le gène correspondant ainsi que le pourcentage d'identité ont été indiqués. Lorsqu'un deuxième organisme est mentionné, celui-ci correspond à un organisme chez lequel la protéine correspondante a été validée au niveau fonctionnel.

En rapport avec la figure 2, les gènes de la région A sont indiqués en bleu, ceux de la région B en gris et ceux de la région C en vert.

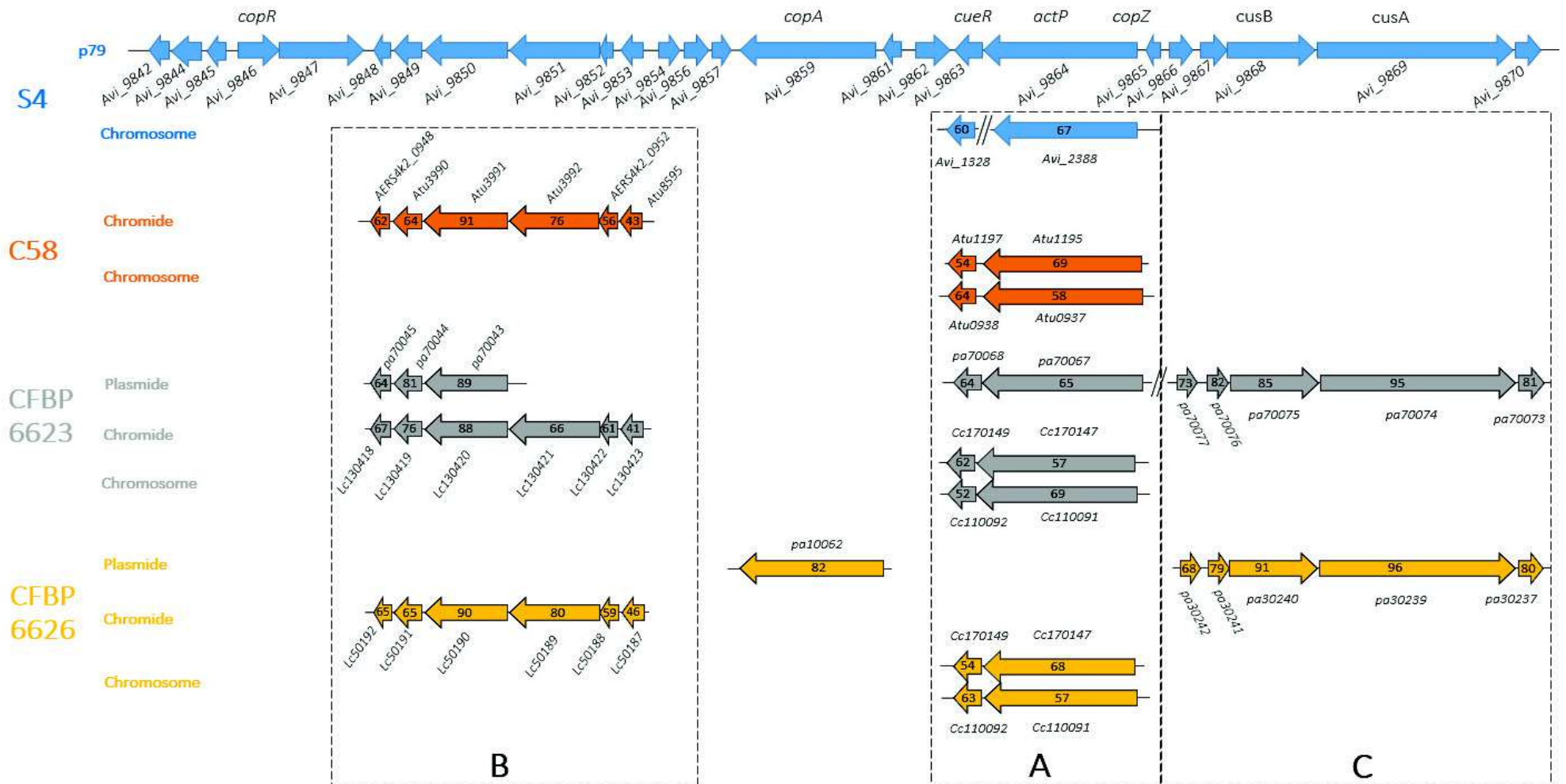
S4 jusqu'à 10 mM. La majorité des souches d'*A. tumefaciens* peut se développer jusqu'à une concentration de 7,5 mM alors que les souches CFBP6623 et CFBP6626 peuvent se développer jusqu'à 10 mM (Tableau 1). Ces résultats sur les souches d'*A. tumefaciens* sont en accord avec ceux obtenus lors d'une étude précédente où la CMI de plusieurs souches d'*A. tumefaciens* a été déterminée à 7 mM de cuivre (Nawapan *et al.*, 2009). Les souches d'*A. vitis* apparaissent en moyenne moins résistantes que les souches d'*A. tumefaciens*. De plus, l'environnement à partir duquel les souches d'*Agrobacterium* ont été isolées ne semble pas influencer cette résistance ; les souches isolées de la vigne n'apparaissent pas plus résistantes que les autres (Tableau 1).

Cette résistance jusqu'à des concentrations d'environ 5 et 7,5 mM de cuivre traduit une résistance au cuivre importante par rapport à d'autres espèces de *Rhizobiaceae*. Ainsi, *Sinorhizobium meliloti* WSM 419 et CCNWSX0020 ou encore *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* WSM710 ne peuvent respectivement croître qu'à des concentrations maximales de cuivre de 1, 1,4 et 2 mM (Fan *et al.*, 2011; Reeve *et al.*, 2002). Pour d'autres genres bactériens, la résistance au cuivre est variable, *P. syringae* PS61 ou *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri* 306 ne résistent qu'à des concentrations respectives 0,2 et 1 mM (Cooksey, 1990; Teixeira *et al.*, 2008). D'autres souches en revanche résistent à des concentrations plus élevées comme *P. putida* S13.1.2 et *E. hirae* qui arrivent à se développer jusqu'à des concentrations respectives de 4 et 8 mM de cuivre ou encore *E. coli* ED8739 qui a une CMI de 8 mM, concentration qui augmente jusqu'à 16 mM après acquisition de la région de résistance du plasmide RIJ1004 (Brown *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 2016; Solioz and Stoyanov, 2003).

### 3) Distribution des gènes impliqués dans la résistance au cuivre.

La souche d'*A. vitis* S4 étant la plus fortement résistante au cuivre, nous avons comparé la distribution des gènes impliqués dans la résistance au cuivre dans les génomes d'*A. vitis* S4, d'*A. fabrum* C58 (souche représentative des *A. tumefaciens*), et d'*A. tumefaciens* CFBP6623 et CFBP6626 (les deux souches les plus résistantes chez les *A. tumefaciens*).

Nous avons tout d'abord recherché les paralogues des gènes de la région de 22 kb du pCu chez les autres souches (Figure 2). Ceci nous a permis de définir 3 sous-régions retrouvées dans les génomes des autres souches (notées A, B et C) ainsi que des gènes spécifiques au pCu en dehors de ces sous-régions (Figure 2). Les gènes présents sur la sous-région B sont retrouvés chez toutes les souches d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis* analysées. La sous-région B a déjà été décrite comme impliquée dans la résistance au cuivre chez *A. tumefaciens* NTL4 (Nawapan *et al.*, 2009). Les gènes présents sur cette sous-région existent en plusieurs exemplaires chez la souche d'*A. tumefaciens* CFBP6623 (figure 2).



**Figure 2 : Région de résistance au cuivre d'*A. vitis* S4 et orthologues chez *A. fabrum* C58, *A. tumefaciens* CFBP6623 et CFBP6626**

La longueur des gènes et des régions intergéniques a été respectée. Le pourcentage d'identité a été déterminé par rapport aux protéines codées par les gènes du p79 via la plateforme MAGE Genoscope.



Comme les autres souches d'*A. tumefaciens* analysées, les souches C58, CFBP6623 et CFBP6626 possèdent la sous-région A (Figure 2) localisée sur le chromide linéaire. Chez *A. vitis*, cette sous-région n'étant pas sur le chromosome ou le chromide des souches analysées, elle ne semble présente que chez *A. vitis* S4. Elle pourrait donc être impliquée dans la résistance au cuivre de toutes les souches d'*A. tumefaciens* testées (et d'*A. vitis* S4), comme déjà suggéré dans une étude antérieure (Nawapan *et al.*, 2009).

La sous-région C, comportant 5 gènes dont *cusA* et *cusB* (Figure 2), n'est retrouvée que chez les souches résistantes au minimum à des concentrations de 7,5 mM comme c'est le cas des souches CFBP6636 et CFBP6626 et de la souche S4. A notre connaissance, cette sous-région est localisée uniquement sur des plasmides et pourrait donc permettre la résistance accrue de ces souches via la mise en place d'une pompe à efflux.

La plus forte CMI vis-à-vis du cuivre observée pour la souche *A. vitis* S4 pourrait provenir de la présence des 3 sous-régions dans une même région plasmidique, des autres gènes de cette région du pCu ou d'autres gènes présents dans le génome d'*A. vitis*. Toutefois, seulement 2 gènes chromosomiques (Avi\_1328 et Avi\_2388) présentant des homologies avec des gènes de la région du pCu ont été détectés dans le génome d'*A. vitis* (Figure 2). Une recherche dans l'ensemble du génome d'*A. vitis* S4, en ciblant tous les domaines InterPro impliqués dans la résistance au cuivre, révèle la présence d'autres gènes candidats (Avi\_2975, Avi\_6254, Avi\_4214 et Avi\_4216). Cependant, des orthologues de ces gènes étant présents chez l'ensemble des souches séquencées nous pouvons en déduire que ces gènes ne participent pas à la résistance accrue de la souche S4.

## Conclusion

Le pCu d'*A. vitis* S4 possède une région de 22kb comportant de nombreux gènes connus pour leur implication dans la résistance au cuivre chez plusieurs espèces bactériennes différentes. Contrairement aux autres souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens* étudiées, la souche S4 peut se développer à une concentration de 10mM de cuivre. Après analyse de la distribution des gènes de résistance au cuivre chez d'autres souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*, et en couplant ces résultats avec les tests de résistance au cuivre, nous proposons que la présence conjointe de régions de résistances sur un même plasmide ainsi que les gènes spécifiques au pCu sont impliqués dans la résistance accrue observée chez la souche S4.

Afin de confirmer cette hypothèse, une approche de mutagenèse dirigée ciblant plusieurs de ces gènes et une analyse du phénotype de résistance au cuivre des mutants obtenus pourraient être envisagées. Le transfert du pCu vers une autre souche ou l'expression hétérologue des gènes de cette

région pourrait également permettre de déterminer l'importance de ce plasmide et de ces gènes dans la résistance au cuivre. De nouvelles souches d'*A. vitis* dont les génomes séquencés indiquent la présence de régions homologues à celles du pCu sont maintenant disponibles au sein de notre équipe. L'étude de leur résistance au cuivre en comparaison des résultats de cette étude devrait nous permettre d'en savoir plus sur l'implication précise des différentes régions.



# Discussion générale



## Diversité au sein de la galle du collet chez la vigne

Le travail présenté dans le chapitre 3 a été réalisé en collaboration avec K. Habbadi et E. H. Achbani (INRA Meknès) dans le cadre d'un projet PRAD. La galle du collet est présente au Maroc depuis longtemps principalement sur les arbres fruitiers mais n'a été diagnostiquée sur la vigne qu'en 2008 et ce projet constitue la première caractérisation de l'agent responsable de la maladie : *Allorhizobium vitis*. Une très faible diversité des *A. vitis* est observée dans les tumeurs de vigne dans la région de Meknès. Quatre groupes génomiques ont été définis (approche de MLSA et profil plasmidique) ; outre les différences génomiques, les quatre groupes se distinguent pas des différences phénotypiques majeures, avec les isolats d'un même groupe présentant des phénotypes similaires.

De nombreuses études portant sur la diversité des *A. vitis* ou des *Agrobacterium* classifient les différents isolats par des approches de phylogénie (Genov et al., 2006; Kawaguchi et al., 2005b; Kuzmanović et al., 2014; Mousavi et al., 2014; Ponsonnet and Nesme, 1994; Shams et al., 2012). Cependant, ces méthodes phylogénétiques n'apportent aucune information sur les caractéristiques phénotypiques ou le profil plasmidique des isolats. A l'inverse, de nombreux travaux ne portent que sur l'identification du pTi (Canaday et al., 1992; Chilton et al., 1977; Gérard et al., 1992; Kreuzsch et al., 1995; Otten and De Ruffray, 1994). Des approches phénotypiques et de typage chromosomique et plasmidiques peuvent permettre d'établir des corrélations entre certains phénotypes et certains modes de vie et ainsi permettre une meilleure compréhension du système étudié.

Un des résultats majeurs de ce travail est la mise en évidence de la production de vitopine et octopine suite à l'infection de plantes par la majorité des isolats d'*A. vitis*. Nous proposons que nos isolats soient porteurs d'un « nouveau » type de pTi vitopine/octopine, ou que deux pTi cohabitent au sein d'une même souche, comme suggéré antérieurement (Federica Bini et al., 2008). Afin de compléter nos données, quatre souches (une pour chaque groupe génomique) ont été séquencées par une technologie Illumina HiSeq. Après assemblage nous pourrions éventuellement déterminer si les gènes codant la synthèse d'octopine et la synthèse de vitopine sont présents sur un même réplicon. Toutefois, nous savons d'expérience qu'il est difficile avec ces données de séquençage d'assembler de manière satisfaisante les réplicons plasmidiques. Actuellement avec les techniques de séquençage couramment utilisées, l'information sur l'organisation du génome (nombre et taille des réplicons plasmidiques) et sur la nature de l'information portée par les plasmides n'est pas accessible. Afin d'améliorer les informations sur l'architecture génomique des génomes qui alimentent aujourd'hui les bases de données, de nouvelles techniques de séquençage telles que la technologie de séquençage en temps réel Pacific Biosciences (dit Pacbio) ou le séquençage par les nanopores sont nécessaires (Deschamps et al., 2016; Teng et al., 2017).

De nombreuses *Agrobacterium* ou *Allorhizobium* non pathogènes peuvent être retrouvées dans une tumeur (Genov *et al.*, 2006; Kumagai and Fabritius, 2008; Szegedi *et al.*, 2005; Faist *et al.*, 2016). Dans le cas des tumeurs récoltées au Maroc, nous retrouvons en plus d'*A. vitis* pathogènes des souches d'*A. tumefaciens* non pathogènes, et dans certains cas, au moment du prélèvement, uniquement des *A. tumefaciens* non pathogènes ont été isolées. En dehors des agrobactéries, la présence de *Pseudomonas* au sein de la tumeur a été documentée, certaines de ces souches sont capables de cataboliser les opines synthétisées par la plante entraînant une compétition pour les sources de carbone et d'azote avec les agrobactéries hébergeant un pTi (Bell *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1997). Peu d'informations existent sur le microbiote de la tumeur de la vigne, les données obtenues récemment montrent que la diversité microbienne au sein des tumeurs est plus importante que dans des tissus d'une vigne saine (Faist *et al.*, 2016). Une connaissance accrue de ce microbiote permettrait de suivre son évolution au cours du temps, et les différentes interactions existantes entre les microorganismes.

## Un système de quorum sensing atypique ?

Au cours de cette thèse, nous avons montré que le système de QS *apil-apiR* présent sur le pApi (p130) d'*A. vitis* S4 permettait la synthèse d'une molécule signal atypique. La synthase Apil fait partie d'une famille utilisant comme précurseurs des molécules de type acyl-CoA et non de type acyl-ACP comme la plupart des AHL synthèses décrites à ce jour (Christensen *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017). L'utilisation de précurseurs acyl-CoA pour la synthèse d'AHL permettrait la synthèse d'une plus grande gamme d'AHLs que l'utilisation de précurseurs acyl-ACP. En effet, les substrats associés au CoA peuvent être de nature très variée puisque des composés possédant un CoA sont retrouvés dans différentes voies de biosynthèse et de dégradation (Ahlgren *et al.*, 2011b; Lindemann *et al.*, 2011; Schaefer *et al.*, 2008). Ces précurseurs peuvent également être de nature exogènes comme le *p*-coumarate nécessaire à la synthèse de la *p*-coumaroyl-HSL (Schaefer *et al.*, 2008). Toutes les AHL synthèses CoA-dépendantes partagent une origine commune et forment donc un groupe monophylétique à l'inverse des AHL synthèses ACP-dépendantes qui forment un groupe paraphylétique (Christensen *et al.*, 2014). Il est à noter que les AHL synthèses CoA-dépendantes sont retrouvées uniquement chez des bactéries appartenant à l'ordre des Rhizobiales (*Nitrobacter*, *Mesorhizobium*, *Rhodopseudomonas*, etc...) (Christensen *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017).

L'utilisation de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à la suite d'un fractionnement bioguidé ont permis d'apporter des informations sur la structure de la molécule, sans

toutefois obtenir sa caractérisation. La molécule produite par la synthase *Apil* a une masse de 299 Da. Cette masse correspond à celle de l' AHL 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL mais possède un temps de rétention différent ainsi qu'un spectre de masse dont l'intensité de certains ions majeurs varie. L'absence d'induction de notre souche reportrice par des concentrations du standard 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL bien supérieures à celles utilisées avec la molécule inconnue nous confirme que ces molécules ne sont pas identiques. Cette molécule est également plus instable que le standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL puisqu'une molécule de masse 282 *m/z*, ayant les mêmes ions majeurs et possédant également une activité biologique, apparaît spontanément lors de l'extraction chimique réalisée sur le surnageant de culture.

Toutes les AHLs peuvent potentiellement exister sous la forme Lévogyre (*L*) et Dextrogyre (*D*) grâce à l'asymétrie présente sur le premier carbone de la chaîne acyl. Un deuxième carbone asymétrique est présent pour les AHLs possédant un groupement hydroxyle sur leur chaîne acyle. Les énantiomères d'une AHL ont souvent des activités biologiques différentes (Li *et al.*, 2018). Il est envisageable que la molécule que nous cherchons à caractériser soit un énantiomère du standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL synthétisé par les synthases de type acyl-ACP. En effet, jusqu'à présent les AHLs ayant une chaîne carbonée de 12 carbones et un hydroxyle en position 3 ont été caractérisées pour des synthases de type acyl-ACP (Garner *et al.*, 2012; Pietschke *et al.*, 2017). Des énantiomères peuvent être différenciés en chromatographie gazeuse via l'utilisation d'une colonne chirale, notamment au niveau de leur temps de rétention (Malik *et al.*, 2009; Osorno *et al.*, 2012). Son utilisation pourrait donc nous apporter des informations sur la stéréoisométrie de notre molécule par rapport au standard 3-OH-C<sub>12</sub>-L-HSL. La chromatographie gazeuse pourrait également être utilisée pour déterminer la présence ou non de ramifications sur la chaîne acyle. En effet, la caractérisation d'une AHL ramifiée synthétisée par une synthase ACP-dépendante a déjà été réalisée grâce à des analyses de chromatographie en phase gazeuse (Thiel *et al.*, 2009).

La synthèse chimique des différentes AHL possédant cette masse n'est pas envisageable, contrairement à ce qui a été réalisé pour la caractérisation de l'isovaléryl-HSL (Lindemann *et al.*, 2011). En effet, la présence d'une chaîne à 12 carbones avec de possibles ramifications ainsi que la localisation incertaine du groupement hydroxyle offre un très grand nombre de structures possibles. L'utilisation d'une technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) serait à envisager mais cette molécule est apparue instable (déshydratation) lors de son extraction, de son analyse et de son stockage. De plus, la RMN du proton nécessitant au minimum 0,1 mg de substance et la molécule active étant synthétisée à une très faible concentration (~800 pM), une extraction d'au moins 400 litres serait à envisager (Schaefer *et al.*, 2008). Une alternative serait une surexpression de *apil* sous la dépendance d'un promoteur fort ou inductible ; cependant, cette surproduction doit être envisagée dans la souche



d'origine afin que les mêmes composés précurseurs soient présents, notamment dans le cas de précurseurs acyl-CoA.

Chez les *Rhizobiaceae*, la régulation du transfert des plasmides par leur propre système QS a été démontrée chez de nombreuses souches (Freiberg *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1996; He *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 1994; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016; Tun-Garrido *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2002). D'après nos données, il apparaît que le transfert conjugatif du plasmide pApi est régulé par QS. Cette régulation du transfert du plasmide par le système *apil-apiR* est actuellement le seul phénotype connu pour être régulé par un système QS utilisant une synthase CoA-dépendante. Deux systèmes QS LuxI-LuxR retrouvés chez deux souches d'*Agrobacterium* possèdent respectivement 95%-89% et 93%-90% d'homologie protéique avec Apil-ApiR et les analyses de synténie suggèrent une localisation plasmidique pour les gènes correspondants. Le plasmide pApi d'*A. vitis* S4 n'est donc pas le seul plasmide à héberger ces gènes, et nous pouvons émettre raisonnablement l'hypothèse que ces deux autres souches d'*Agrobacterium* synthétisent des molécules proches utilisées pour la régulation du transfert conjugatif.

La synthèse de cette nouvelle molécule par le pApi montre que le 3-OH-C<sub>8</sub>-HSL et le 3-O-C<sub>8</sub>-HSL ne sont pas les seules AHL pouvant être synthétisées par des déterminants plasmidiques d'*Agrobacterium* et d'*Allorhizobium*. L'accès à un nombre accru de génomes révèle la présence d'homologues *tral-traR* sur de nombreux plasmides (pTi et non pTi), ainsi que d'autres gènes de type *luxI* et *luxR* potentiellement impliqués dans le transfert de plasmides. Ainsi, la régulation par QS du transfert de plasmide n'est pas limitée au pTi et au couple *tral-traR*, comme récemment démontré pour le plasmide pAt de *A. tumefaciens* P4 (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016).

En plus des 22 gènes impliqués dans le transfert et la réplication, d'autres gènes présents sur le pApi sont régulés par le système *apil-apiR*. Au total, 48 gènes (soit 1/3 des gènes portés par le pApi) sont régulés positivement par QS. Il est difficile de prédire les fonctions codées par les autres gènes régulés par le système *apil-apiR*. Toutefois, un opéron codant une Synthétase de Peptide Non Ribosomique (NRPS) apparaît fortement induit (~10 fois). Afin d'attribuer un rôle au plasmide pApi, la fonction de cette NRPS a été recherchée. Il est à noter que, chez *A. vitis* S4, un opéron chromosomique et codant une NRPS est notamment impliqué dans l'induction de nécrose, de réponse hypersensible et dans la mobilité par swarming et est régulé par le couple chromosomique de QS AvsI-AvsR (Carle *et al.*, 2008; Süle *et al.*, 2009a; Zheng and Burr, 2013). Chez les bactéries, les NRPS ont des rôles variés (synthèse d'antibiotiques, de composés antifongiques, de sidérophores, de composés phytotoxiques, etc...) et leur expression peut également être régulée par QS (Du and Lou, 2010; Duerkop *et al.*, 2009; Mootz and Marahiel, 1997; Rondon, 2004). Ainsi, par analogie avec les différents rôles possibles d'une

NRPS, des expériences d'antagonisme, de pathogénie (induction de nécrose, test de réaction hypersensible, intensité de virulence) et de swarming ont été menées mais n'ont pas montré de différence entre la souche sauvage et un mutant inactivé dans *apil*.

Chez les *Agrobacterium* et les *Rhizobium*, plusieurs systèmes de QS plasmidiques régulent la réplication et le transfert du plasmide mais, à notre connaissance, aucun autre phénotype n'est régulé par ces systèmes (Lang and Faure, 2014; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2016; Wisniewski-Dyé and Downie, 2002). Pour le pTiC58 à nopaline et le pTiR10 à octopine, une étude de transcriptomique a montré que 31 gènes et 28 gènes sont respectivement régulés par leur système *traI-traR*. La très grande majorité de ces gènes appartiennent aux opérons *tra*, *trb* et *rep*, quelques gènes en plus sont régulés mais aucune fonction n'a pu leur être associée (Cho and Winans, 2007).

## Le quorum sensing chez *A. vitis* S4

L'analyse du génome d'*A. vitis* S4 révèle la présence de 3 couples *luxI-luxR* sur les plasmides p259 (pTi), p212 (pTar) et p130 (pApi), et un couple chromosomique *avsl-avsr*. Chez la souche F2/5, Avsl, une synthase de type acyl-ACP, permet la synthèse de plusieurs AHLs à longues chaînes (Savka *et al.*, 2011). Quatre régulateurs de types *luxR*, dont *aviR* et *avhR*, non liés à un gène *luxI* et donc considérés comme *luxR* orphelins sont aussi présents sur le chromosome circulaire de S4. Ces 4 LuxR orphelins possèdent bien un domaine de fixation aux AHLs, mais seulement deux (AviR et AvhR) ont été étudiés. AvhR réprimerait l'expression de *avsl* puisque la délétion de *avhR* entraîne une augmentation de la concentration en AHL synthétisées par Avsl. En revanche, la délétion de *aviR* ne modifie pas la concentration en AHL (Hao *et al.*, 2005; Savka *et al.*, 2011; Süle *et al.*, 2009b; Zheng *et al.*, 2003).

Chez plusieurs espèces bactériennes, il existe des communications croisées entre des systèmes QS présents au sein d'une même bactérie, comme par exemple chez *Burkholderia cenocepacia* K56-2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Rhizobium etli* CNPAF512 ou encore *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 8401pRL1JI (Daniels *et al.*, 2002; Lithgow *et al.*, 2000; Malott *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 1997; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2002). Ces données et la multiplicité des systèmes QS chez *A. vitis* S4 suggère la possibilité d'une régulation croisée entre ces systèmes.

Pour le système *apil-apiR*, l'expression d'*apil* ne peut pas être activée par des AHL classiques à des concentrations retrouvées dans l'environnement (données obtenues avec la souche reportrice). De plus, des concentrations identiques de la molécule synthétisée par Apil sont retrouvées dans

l'extrait de la souche S4 sauvage et dans celui d'une souche d'*A. vitis* S4 inactivée pour le gène *avsl* (données non montrées). Une régulation de l'expression de *apil-apiR* par le couple Avsl-AvsR semble peu probable (Savka *et al.*, 2011). Les données de transcriptomique obtenues au cours de cette thèse permettent également de confirmer que le couple *apil-apiR* ne régule pas l'expression de *avsl-avsR*.

Nous avons souhaité confirmer que Apil et ApiR n'étaient pas impliqués dans la régulation de *avsl-avsR* et plus précisément dans la synthèse des AHL liées à ce couple. De manière surprenante, aucune AHL n'a pu être détectée dans un mutant *apil* (en d'autres termes, la synthèse de toutes les AHLs présentes dans le surnageant de la souche sauvage peut être attribuée à la synthase Apil). Différents protocoles d'extraction en utilisant différents solvants, réalisés sur des cultures liquides ou sur gélose n'ont curieusement jamais permis d'extraire les AHLs produites par Avsl. Or, nous avons confirmé que le système *avsl-avsR* de la souche S4 était fonctionnel puisqu'une inactivation de *avsl* abolit la mobilité par swarming et la formation de nécroses.

Les données de transcriptomique ont également révélé que Apil-ApiR ne régule pas l'expression des gènes *tral-traR* présents sur le pTi et le pTar. De plus, la souche reportrice *A. tumefaciens* NTLR4 (portant une fusion entre le promoteur de *tral* de pTiC58 et le gène *lacZ*) connue pour répondre à toute une gamme d'AHL, n'est pas activée par la molécule synthétisée par Apil (données non montrées). Inversement, l'absence d'induction de notre souche reportrice (*S4Δapil P<sub>apil</sub>-egfp*) par la 3-O-C<sub>8</sub>-HSL suggère l'absence de régulation de l'expression de *apil-apiR* par les systèmes TraI-TraR connus pour synthétiser du 3-O-C<sub>8</sub>-HSL. Le système *apil-apiR* semble donc fonctionner indépendamment des autres systèmes QS présents chez la souche S4.

Les AHL synthétisées par une espèce bactérienne peuvent être perçues par une autre espèce et participer à l'activation du système QS de cette dernière. Ainsi, les AHLs produites par *Burkholderia cenocepacia* peuvent activer le système RhII-RhIR de *P. aeruginosa*, et réciproquement (Lewenza *et al.*, 2002; McKenney *et al.*, 1995). Les quelques molécules déjà caractérisées provenant de synthèses CoA-dépendantes (3 publiées actuellement) possèdent des structures très différentes. De plus, les molécules synthétisées par les synthèses CoA-dépendantes pouvant être plus variées, il est probable que les phénomènes de communication croisée soient nettement plus rares.

## **Transfert conjugatif des plasmides au sein de la souche *A. vitis* S4**

La plupart des informations disponibles sur les plasmides des bactéries des genres *Agrobacterium* ou *Allorhizobium* est concentrée sur le plasmide Ti (Burr and Otten, 1999a; Pitzschke and Hirt, 2010; Van Labereke *et al.*, 1974). Le transfert du pTi est régulé par QS et ne se réalise qu'en

présence d'opines, au sein de la tumeur et donc lorsque des conditions bien précises sont réunies (Petit et al., 1983, 1978). La régulation du transfert du pTi par QS et les opines a été principalement étudiée sur quelques pTi, notamment le pTi de la souche modèle *A. fabrum* C58, et cette régulation peut être transposée à l'ensemble des pTi. Au cours de ces travaux, nous confirmons l'absence de transfert du pTiS4 *in vitro* ainsi que son transfert au sein de la tumeur (données non montrées).

Le transfert du pApi est régulé par QS grâce au couple Apil-ApiR et la concentration de la molécule synthétisée par Apil nécessaire à l'activation du transfert est très faible. De plus, contrairement au pTi, le pApi peut se transférer aussi bien en condition *in vitro* qu'au sein de la tumeur. Ainsi, aucune molécule de la plante (opines ou autres) n'est nécessaire pour activer le système QS et ainsi le transfert du plasmide. Toutes ces données indiquent que les conditions requises pour l'induction du mécanisme du transfert du pApi peuvent facilement être réunies et ne sont pas dépendantes d'un habitat particulier comme pour le pTi. Sur le pApi, aucun gène homologue au gène *traM* connu pour inhiber le transfert du pTi dans certaines conditions, n'a été détecté (Fuqua et al., 1995; Hwang et al., 1999). En aval de *apil* est retrouvé un cadre de lecture codant un régulateur transcriptionnel présentant une faible homologie avec *rctA* connu pour réguler le transfert de différents plasmides chez les *Rhizobiaceae* (Mhedbi-Hajri et al., 2016; Perez-Mendoza et al., 2005). Non seulement les conditions d'activation du transfert sont différentes de celles du pTiC58 mais les conditions de contrôle du QS le sont aussi.

Le pApi (ou le système QS *apil-apiR*) n'est pas retrouvé fréquemment au sein des *Rhizobiaceae* alors que le transfert de ce plasmide semble optimisé (pas de nécessité de signal exogène et activation à faible concentration du QS). Bien que nous ne l'ayons pas constaté lors de cultures *in vitro*, la présence du pApi pourrait imposer un coût énergétique à la cellule hôte et ainsi expliquer sa faible fréquence. Cependant, les études étant principalement centrées sur la présence du pTi (recherche de souches pathogènes) ou sur celle du pSym, il est probable que notre connaissance sur la diversité des plasmides des *Rhizobiaceae* ne soit pas représentative de la diversité réelle dans le sol ou d'autres environnements.

La création d'une niche écologique particulière par le pTi propice à sa propre propagation représente un modèle dans lequel le pTi se comporterait comme un plasmide égoïste, par analogie avec la théorie du gène égoïste (Dawkins, 1976). Le pTi utiliserait la cellule bactérienne pour se préserver et se disséminer. En effet, il manipule la plante et la bactérie hôte afin de se disséminer tout en conférant à la bactérie la capacité de « se voir offrir le gîte et le couvert » (via la formation de tumeurs). Quel est l'avantage pour la bactérie hôte de posséder le pApi ? Le pApi se comporte-t-il comme un plasmide égoïste ? La présence sur le pApi de gènes dont le rôle est encore inconnu, comme

les gènes NRPS, suggère la présence d'une fonction pouvant conférer un avantage à la bactérie. Ce concept de plasmide égoïste se maintenant au fil des générations par simple réplication, maintenance et transfert est remis en cause par différents auteurs qui suggèrent que ce comportement ne serait pas viable sur le long terme d'un point de vue évolutif (Slater *et al.*, 2008).

## Le plasmidome

Le terme de plasmidome provient de la fusion des deux mots anglais « plasmid » et « kingdom ». Le plasmidome représente l'ensemble des plasmides ou l'ADN plasmidique retrouvé au sein d'une unité, que ce soit à l'échelle d'une bactérie ou à l'échelle d'un microenvironnement (Fondi *et al.*, 2010). L'étude du plasmidome d'une souche bactérienne, comme nous l'avons abordé au cours de notre étude pour *A. vitis* S4, permet de connaître le nombre, la diversité et le contenu génique des plasmides. La principale difficulté est de pouvoir déterminer les fonctions qui leur sont associés qui nécessitent des approches de génétique microbienne (inactivation, surexpression) et physiologie microbienne, approches qui ont été utilisées dans le cadre de l'étude du QS du pApi. Ces approches sont coûteuses en temps à une époque où il est possible d'obtenir d'importantes données via le séquençage en un temps record.

Avons-nous aujourd'hui la technologie nécessaire pour étudier le plasmidome d'un microbiote et ainsi accéder à l'ensemble des plasmides et des fonctions qu'ils codent, et ce plus particulièrement dans le cas de la tumeur ou du nodule ? L'étude du plasmidome d'un microenvironnement nécessite des approches de métagénomique dont une des limites actuelles est de différencier l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique. A défaut d'apporter des connaissances sur le nombre, la taille et la fonction des plasmides, cette approche permet d'avoir des informations sur l'ensemble des fonctions plasmidiques retrouvées chez les bactéries d'un environnement donné. De plus, cette méthode ne passant pas obligatoirement par une étape de mise en culture, elle permet d'étudier le contenu plasmidique de toutes les bactéries d'un environnement et pas seulement celui des bactéries cultivables. Toutefois, l'attribution des plasmides à un fond chromosomique nécessite une étape de culture, sans cela nous ne pourrions pas affilier le pTi (ou un autre plasmide) à une espèce d'agrobactérie donnée. La culturomique est dans ce cas complémentaire des approches métagénomiques.

Tout au long de cette étude nous avons abordé les plasmides à l'échelle de la cellule. La présence d'une fonction ou d'un plasmide peut être considérée à l'échelle d'une population et non pas limitée à l'échelle d'une souche ou d'une espèce. Au sein d'une population, si quelques individus

possèdent une fonction conférant un avantage, celle-ci pourra être transmise aux autres individus de la population. Si cette fonction devient un fardeau métabolique, son occurrence dans la population va diminuer. Cependant il suffit que quelques individus au sein de la population la conservent pour qu'elle puisse être transmise à nouveau au plus grand nombre lors de la réapparition de conditions propices. Les fonctions portées par les plasmides pourraient contribuer largement à cette mise en commun des fonctions, notamment chez les *Rhizobiaceae* chez qui les plasmides peuvent être transmis entre bactéries de genres différents. Grâce à cela, la capacité d'adaptation mais aussi la résistance et la résilience de la population d'un environnement sont plus conséquentes pour une population présentant une importante diversité, notamment plasmidique.

« Il s'agit de redonner consistance au mot peuple [...] de montrer qu'il n'existe qu'au pluriel, qu'il ne peut être saisi que dans sa diversité et sa complexité. »

Le parlement des invisibles - **Pierre Rosanvallon**



# Références





- Abdellatif, E., Valentini, F., Janse, J.D., Bouri, M., Rhouma, A., Chebil, S., D'Onghia, A.M., 2013. Occurrence of crown gall of the grapevine in Tunisia and characterization of Tunisian *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* strains. *J. Plant Pathol.* 115–126.
- Achbani E. H., Habbadi K., Vial L., Lavire C., Benkirane A. R., 2016. La galle du collet de la vigne au Maroc (région de Fes-Méknès). *Agric. Maghreb* 101–103.
- Ahlgren, N.A., Harwood, C.S., Schaefer, A.L., Giraud, E., Greenberg, E.P., 2011a. Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7183–7188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103821108>
- Ahlgren, N.A., Harwood, C.S., Schaefer, A.L., Giraud, E., Greenberg, E.P., 2011b. Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7183–7188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103821108>
- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L., Ramuz, M., 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* 175, 7869–7874.
- Allaway, D., Schofield, N.A., Leonard, M.E., Gilardoni, L., Finan, T.M., Poole, P.S., 2001. Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ. Microbiol.* 3, 397–406.
- Allen, Huang, Sequeira, 1991. Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*
- Argun, N., Momol, M.T., Maden, S., Momol, E.A., Reid, C.L., Celek, H., Burr, T.J., 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Dis.* 86, 162–166.
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Thompsett A. R., 2002. Solution Structure of CopC: A Cupredoxin-like Protein Involved in Copper Homeostasis. *Structure* 10, 1337–1347.
- Atlas, R.M., 2010. Handbook of microbiological media, 4th ed. ed. ASM Press ; CRC Press/Taylor & Francis, Washington, D.C. : Boca Raton, FL.
- Badawy, M.E.I., Abdelgaleil, S.A.M., 2014. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Ind. Crops Prod.* 52, 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>
- Baldani, J.I., Weaver, R.W., Hynes, M.F., Eardly, B.D., 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2308–2314.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., others, 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9883–9888.
- Barran, L.R., Ritchot, N., Bromfield, E.S.P., 2001. *Sinorhizobium meliloti* Plasmid pRm1132f Replicates by a Rolling-Circle Mechanism. *J. Bacteriol.* 183, 2704–2708. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2704-2708.2001>
- Bauer, C., Schulz T. F., Lorenz D., K. W. Eichhorn, R. Plapp, 1994. Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period. *Vitis* 33, 25–29.
- Beijersbergen, A., Den Dulk-Ras, A., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J.J., 1992. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 256, 1321–1325.
- Bell, C.R., Cummings, N.E., Canfield, M.L., Moore, L.W., 1990. Competition of octopine-catabolizing *Pseudomonas* spp. and octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* for octopine in chemostats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2840–2846.
- Benjama, A., Alami, N., Saadaoui, E.M., 1996. Étude sérologique des souches marocaines d'*Agrobacterium tumefaciens*, agent de la galle du collet des rosacées fruitières. *Agronomie* 16, 517–522.

- Bi, Z., Li, J., Guo, Y., Zheng, H., Hu, B., Wang, J., Wang, H., 2012. A Plating-PCR Technique for Detection and Quantification of the Biological Control Agent *Agrobacterium vitis* Strain E26 in Soil under Controlled Conditions: *Agrobacterium* Detection. *J. Phytopathol.* 160, 496–499. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01929.x>
- Bini, F., Geider, K., Bazzi, C., 2008. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel virD2 gene-specific primers that discriminate two subgroups. *Eur. J. Plant Pathol.* 122, 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9307-0>
- Bini, F., Kuczmog, A., Putnoky, P., Otten, L., Bazzi, C., Burr, T.J., Szegedi, E., 2008. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47, 181–189.
- Bishop, A.I., Katz, B.H., Burr, T.J., 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology* 78, 945–948.
- Bishop, A.L., Burr, T.J., Mittak, V.L., Katz, B.H., others, 1989. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology* 79, 995–998.
- Bonnard, G., Tinland, B., Paulus, F., Szegedi, E., Otten, L., 1989. Nucleotide sequence, evolutionary origin and biological role of a rearranged cytokinin gene isolated from a wide host range biotype III *Agrobacterium* strain. *Mol. Gen. Genet.* MGG 216, 428–438.
- Boring, R.L., T. Swank W., B. Waide J., S. Henderson G., 1988. Sources, fates, and impacts of nitrogen inputs to terrestrial ecosystems: review and synthesis. *Biogeochemistry*.
- Bouri, M., Chattaoui, M., Gharsa, H., Mcclean, A., Kluepfel, D., Nesme, X., Rhouma, A., 2016. ANALYSIS OF *Agrobacterium* POPULATIONS ISOLATED FROM TUNISIAN SOILS: GENETIC STRUCTURE, AVIRULENT-VIRULENT RATIOS AND CHARACTERIZATION OF TUMORIGENIC STRAINS. *J. Plant Pathol.* 98, 212–239.
- Bouzar, H., Jones J. B., Hodge N. C., 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon source utilization patterns and fatty acid profiles. *Physiol. Biochem.* 83, 733–739.
- Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F., 2009. Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum: Cell–cell signalling in bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x>
- Brewin, N.J., 2004. Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*–Legume Symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 293–316. <https://doi.org/10.1080/07352680490480734>
- brisbane, P.G., Kerr, A., 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Microbiol.* 54, 425–431.
- Brisset, M.-N., Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T.J., Collmer, A., 1991. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3178–3182.
- Britton, M.T., Escobar, M.A., Dandekar, A.M., 2008. The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*.
- Brown, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T.O., Rouch, D.A., 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from Escherichia coli plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 17, 1153–1166.
- Burr, T.J., A.L. Bishop, L.M. Blanchard, B.H. Katz, C. Bazzi, 1987. A Root-Specific Decay of Grapevine Caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* Biovar 3. *Am. Phytopathol. Soc.*
- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L., 1998a. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82, 1288–1297.

- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L., 1998b. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82, 1288–1297.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L., 1998c. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82, 1288–1297.
- Burr, T.J., Katz, B.H., 1984. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Dis.* 68.
- Burr, T.J., Katz, B.H., 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73, 163–165.
- Burr, T.J., Ophel K, Katz B. H., Kerr A., 1989. Effect of hot water treatment on systemic *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in dormant grape cuttings. *Plant Dis.* 73, 242–245.
- Burr, T.J., Otten, L., 1999a. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 53–80.
- Burr, T.J., Otten, L., 1999b. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 53–80.
- Burr, T.J., Reid, C.L., 1995. Survival and Tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in Living and Decaying Grape Roots and Canes in Soil. *Plant Dis.* 79, 677–682.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Adams, C.E., Momol, E.A., 1999. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant Dis.* 83, 102–107.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Tagliati, E., Bazzi, C., Süle, S., 1997. Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells. *Phytopathology* 87, 706–711.
- Campillo, T., Lavire, C., Shams, M., Pothier, J.F., Pulawska, J., 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 of bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *J. Plant Pathol.* 94, 97–104.
- Canaday, J., Gérard, J.-C., Crouzet, P., Otten, L., 1992. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4. *Mol. Gen. Genet.* MGG 235, 292–303.
- Cao, J.-G., Meighen, E.A., 1993. Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 175, 3856–3862.
- Carle, S.A., Hao, G., Zheng, D., Sanni-Sanoussi, T., Talarico, M.J., Hilton, J.S., Burr, T.J., 2008. A gene cluster in *Agrobacterium vitis* homologous to polyketide synthase operons is associated with grape necrosis and hypersensitive response induction on tobacco. *FEMS Microbiol. Lett.* 289, 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01371.x>
- Carlier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y., Faure, D., 2004. The assimilation of  $\gamma$ -butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 951–957.
- Castillo-Ramírez, S., Vázquez-Castellanos, J.F., González, V., Cevallos, M.A., 2009. Horizontal gene transfer and diverse functional constraints within a common replication-partitioning system in Alphaproteobacteria: the repABC operon. *BMC Genomics* 10, 536. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-536>
- Cevallos, M.A., Cervantes-Rivera, R., Gutiérrez-Ríos, R.M., 2008. The repABC plasmid family. *Plasmid* 60, 19–37. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.001>
- Cha, J.S., Cooksey, D.A., 1993. Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1671–1674.
- Cha, J.S., Cooksey, D.A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *PNAS* 88, 8915–8919.

- Chang, C.-C., Chen, C.-M., 1983. Evidence for the presence of N<sup>2</sup>-(1,3-dicarboxypropyl)-L-amino acids in crown-gall tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* strains 181 and EU6. Fed. Eur. Biochem. Soc.
- Chang, C.-C., Chen, C.-M., Adams, B.R., Trost, B.M., 1983. Leucinopine, a characteristic compound of some crown-gall tumors. Biochemistry 41, 3573–3576.
- Chapalain, A., Groleau, M.-C., Le Guillouzer, S., Miomandre, A., Vial, L., Milot, S., Déziel, E., 2017. Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and N-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a Burkholderia cepacia Complex Clinical Strain. Front. Microbiol. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01021>
- Chebil, S., 2013. Occurrence of *Agrobacterium Vitis* Carrying Two Opine-Type Plasmids in Tunisian Vineyards. J. Plant Pathol. Microbiol. 04. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000175>
- Chebil, S., Fersi, R., Chenenaoui, S., Emma, A., Giuseppe, D., Zacchi, E., Rhouma, A., Mliki, A., 2013. First Report of *Agrobacterium vitis* as Causal Agent of Crown Gall Disease of Grapevine in Tunisia. Plant Dis.
- Chen, F., Guo, Y.B., Wang, J.H., Li, J.Y., Wang, H.M., 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. Plant Dis. 91, 957–963.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D.W., Nester, E.W., 2002. A New Type IV Secretion System Promotes Conjugal Transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 184, 4838–4845. <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4838-4845.2002>
- Chesnokova, O., Coutinho J.B., Khan I.H., Mikhail M.S., Kado I., 1997. Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. Mol. Microbiol. 23, 579–590.
- Chilton, M.-D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sclaky, D., Montoya, A.L., Gordont, M.P., Nester, E.W., 1977. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Agrobacterium tumefaciens* Plant Pathol. Biotechnol. 68.
- Chilton, W.S., Petit, A., Chilton, M.-D., Dessaux, Y., 2001. Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. Phytochemistry 58, 137–142.
- Chilton, W.S., Stom, A.M., Beringue, V., Bouzar, H., Vaudequin-Dransart, V., Petit, A., Dessaux, Y., 1995. THE CHRYSOPINE FAMILY OF AMADORI-TYPE CROWN GALL OPINES. Phytochemistry 40, 619–628.
- Chilton, W.S., Tempé, J., Matzke, M., Chilton, M.D., 1984. Succinamopine: a New Crown Gall Opine. J. Bacteriol. 157, 357–362.
- Cho, H., Winans, S.C., 2007. TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: Ti plasmid Relaxosome. Mol. Microbiol. 63, 1769–1782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05624.x>
- Chong, T.M., Yin, W.-F., Chen, J.-W., Mondy, S., Grandclément, C., Faure, D., Dessaux, Y., Chan, K.-G., 2016. Comprehensive genomic and phenotypic metal resistance profile of *Pseudomonas putida* strain S13.1.2 isolated from a vineyard soil. AMB Express 6. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0269-x>
- Christensen, Q.H., Brecht, R.M., Dudekula, D., Greenberg, E.P., Nagarajan, R., 2014. Evolution of Acyl-Substrate Recognition by a Family of Acyl-Homoserine Lactone Synthases. PLoS ONE 9, e112464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112464>
- Christie, P.J., Whitaker, N., González-Rivera, C., 2014. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1843, 1578–1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.019>
- Christou, P., Platt, S.G., Ackerman, M.C., 1986. Opine Synthesis in Wild-Type Plant Tissue. Plant Physiol 82, 218–221.

- Churchill, M.E.A., Sibhatu, H.M., Uhlon, C.L., 2011. Defining the Structure and Function of Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers, in: Rumbaugh, K.P. (Ed.), Quorum sensing. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 159–171. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_12)
- Clément, B., Perot, J., Geoffroy, P., Legrand, M., Zon, J., Otten, L., 2007. Abnormal accumulation of sugars and phenolics in tobacco roots expressing the *Agrobacterium* T-6b oncogene and the role of these compounds in 6b-induced growth. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 53–62.
- Cook, D.M., Farrand, S.K., 1992. The oriT region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bacteriol.* 174, 6238–6246.
- Cooksey, D.A., 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 7, 1–5.
- Cooksey, D.A., 1990. Plasmid-Determined Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* from Impatiens. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 13–16.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y., Nesme, X., 2010. Rapid and Efficient Identification of *Agrobacterium* Species by recA Allele Analysis: *Agrobacterium* recA Diversity. *Microb. Ecol.* 60, 862–872. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7>
- Coxon, D.T., Davies, A.M.C., Fenwick, G.R., Self, R., 1980. AGROPINE, A NEW AMINO ACID DERIVATIVE FROM CROWN GALL TUMORS. *Tetrahedron Lett.* 21, 495–498.
- Creasap, J.E., Burr, T.J., 2006. Grape Crown Gall. Cornell Univ. Cornell Univ. Ext. N. Y. State Integr. Pest Manag. Program Ithaca N. Y.
- Crews, T.E., 1999. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations, in: *New Perspectives on Nitrogen Cycling in the Temperate and Tropical Americas*. Springer, pp. 233–246.
- Crouzet, P., Otten, L., 1995. Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from *Agrobacterium vitis*. *J. Bacteriol.* 177, 6518–6526.
- d'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y., 2005. Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7, 1796–1808. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00886.x>
- Daniels, R., De Vos, D.E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2002. The *cin* Quorum sensing Locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 Affects Growth and Symbiotic Nitrogen Fixation. *J. Biol. Chem.* 277, 462–468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106655200>
- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., others, 2006. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14965–14970.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 261–289. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.004>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645.
- Dawkins, R., 1976. *The selfish gene*, 30th anniversary ed. ed. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Deakin, W.J., Parker, V.E., Wright, E.L., Ashcroft, K.J., Loake, G.J., Shaw, C.H., 1999. *Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagellin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility. *Microbiology* 145, 1397–1407.
- Deng, W., Xin-an Pu, R.N. Goodman, M.P. Gordon, EW Nester, 1995. T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 8, 538–548.
- Dequivre, M., Diel, B., Villard, C., Sismeiro, O., Durot, M., Coppée, J.Y., Nesme, X., Vial, L., Hommais, F., 2015. Small RNA Deep-Sequencing Analyses Reveal a New Regulator of Virulence in

- Agrobacterium fabrum* C58. Mol. Plant. Microbe Interact. 28, 580–589.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0380-FI>
- Deschamps, S., Mudge, J., Cameron, C., Ramaraj, T., Anand, A., Fengler, K., Hayes, K., Llaca, V., Jones, T.J., May, G., 2016. Characterization, correction and de novo assembly of an Oxford Nanopore genomic dataset from *Agrobacterium tumefaciens*. Sci. Rep. 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep28625>
- Dessaux, Y., Petit A., Farrand S. K., Murphy P.J., 1998. Opines and Opine-Like Molecules Involved in Plant-*Rhizobiaceae* Interactions. Kluwer Acad. Publ. Chapitre 9, 171–197.
- Ding, H., Hynes, M.F., 2009. Plasmid transfer systems in the rhizobia. Can. J. Microbiol. 55.
- Ding, H., Yip, C.B., Geddes, B.A., Oresnik, I.J., Hynes, M.F., 2012. Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation. Microbiology 158, 1369–1378. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057281-0>
- Doberva, M., Stien, D., Sorres, J., Hue, N., Sanchez-Ferandin, S., Eparvier, V., Ferandin, Y., Lebaron, P., Lami, R., 2017. Large Diversity and Original Structures of Acyl-Homoserine Lactones in Strain MOLA 401, a Marine Rhodobacteraceae Bacterium. Front. Microbiol. 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01152>
- Dong, S.-H., Frane, N.D., Christensen, Q.H., Greenberg, E.P., Nagarajan, R., Nair, S.K., 2017. Molecular basis for the substrate specificity of quorum signal synthases. Proc. Natl. Acad. Sci. 201705400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705400114>
- Du, L., Lou, L., 2010. PKS and NRPS release mechanisms. Nat Prod Rep 27, 255–278.  
<https://doi.org/10.1039/B912037H>
- Duerkop, B.A., Varga, J., Chandler, J.R., Peterson, S.B., Herman, J.P., Churchill, M.E.A., Parsek, M.R., Nierman, W.C., Greenberg, E.P., 2009. Quorum-Sensing Control of Antibiotic Synthesis in *Burkholderia thailandensis*. J. Bacteriol. 191, 3909–3918. <https://doi.org/10.1128/JB.00200-09>
- Eastwell, K.C., Sholberg, P.L., Sayler, R.J., 2006. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. Crop Prot. 25, 1191–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.03.004>
- Eastwell, K.C., Willis L. G., Cavileer T. D., 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. Plant Dis. 79, 822–827.
- Ellis, J.G., Murphy, P.J., 1981. Four new opines from crown gall tumours their detection and properties. Mol. Gen. Genet. MGG 181, 36–43.
- Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., Deeken, R., 2016. Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 82, 5542–5552.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
- Fan, L.-M., Ma, Z.-Q., Liang, J.-Q., Li, H.-F., Wang, E.-T., Wei, G.-H., 2011. Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings. Bioresour. Technol. 102, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.046>
- Farrand, S.K., 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1681–1687. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02445-0>
- Federle, M.J., Bassler, B.L., 2003. Interspecies communication in bacteria. J. Clin. Invest. 112, 1291–1299. <https://doi.org/10.1172/JCI200320195>
- Ferreira, J.H.S., Van Zyl, F.G.H., 1986. Susceptibility of Grapevine Rootstocks to Strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. South Afr. J. Enol. Vitic. 7, 101–104.
- Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F., Signer, E.R., 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol. 167, 66–72.
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment : a review. Water. Air. Soil Pollut. 146–158.

- Flores-Mireles, A.L., Eberhard, A., Winans, S.C., 2012. *Agrobacterium tumefaciens* can obtain sulphur from an opine that is synthesized by octopine synthase using S-methylmethionine as a substrate: A sulphur-containing opine. *Mol. Microbiol.* 84, 845–856. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08061.x>
- Fondi, M., Bacci, G., Brilli, M., Papaleo, M.C., Mengoni, A., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Fani, R., 2010. Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol. Biol.* 10, 59.
- Fournier, P., De Ruffray P., Otten L., 1993. Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 23-kb DNA fragment. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 7, 164–172.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X., 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387, 394–401.
- Fuqua, C., Burbea, M., Winans, S.C., 1995. Activity of the *Agrobacterium* Ti Plasmid Conjugal Transfer Regulator TraR Is Inhibited by the Product of the traM Gene. *J. Bacteriol.* 177, 1367–1373.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176, 2796–2806.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269.
- Gaetke, L., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
- Gage, D.J., 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280–300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., Spring, D.R., 2011. Quorum sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum sensing Pathways. *Chem. Rev.* 111, 28–67. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics* 12, 543–548.
- García-de los Santos, A., Brom, S., 1997. Characterization of Two Plasmid-borne *lpsB* Loci of *Rhizobium etli* Required for Lipopolysaccharide Synthesis and for Optimal Interaction with Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 10, 891–902.
- García-de Los Santos, A., Brom, S., Romero, D., 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 119–125.
- García-Rodríguez, F.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., 2006. The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Res.* 34, 6496–6504. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl877>
- Garner, A.L., Kim, S.K., Zhu, J., Struss, A.K., Watkins, R., Feske, B.D., Kaufmann, G.F., Janda, K.D., 2012. Stereochemical Insignificance Discovered in *Acinetobacter baumannii* Quorum sensing. *PLoS ONE* 7, e37102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037102>
- Genov, I., Atanassov, I., Tsvetkov, I., Atanassov, A., 2006. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. *VITIS-J. Grapevine Res.* 45, 97.
- Genov, N., Llop, P., López, M.M., Bobev, S.G., Álvarez, B., 2015. Molecular and phenotypic characterization of *Agrobacterium* species from vineyards allows identification of typical *Agrobacterium vitis* and atypical biovar 1 strains. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1465–1477. <https://doi.org/10.1111/jam.12791>
- Gérard, J.-C., Canaday J., Szegedi E., De La Salle H., Otten L., 1992. Physical Map of the Vitopine Ti Plasmid pTiS4. *Plasmid* 28.



- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater, S., 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2323–2328.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Gray, K.M., Pearson, J.P., Downie, J.A., Boboye, B.E., Greenberg, E.P., 1996. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J. Bacteriol.* 178, 372–376.
- Haas, J.H., Zveibil, A., Zutra, D., Tanne, E., Manulis, S., 1991. The presence of crown gall of grape incited by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in Israel. *Phytoparasitica* 19, 311–318.
- Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., Kerzaon, I., Achbani, E.H., Lavire, C., 2017. Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1008-9>
- Hao, G., Burr, T.J., 2006. Regulation of Long-Chain N-Acyl-Homoserine Lactones in *Agrobacterium vitis*. *J. Bacteriol.* 188, 2173–2183. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2173-2183.2006>
- Hao, G., Zhang, H., Zheng, D., Burr, T.J., 2005. luxR Homolog avhR in *Agrobacterium vitis* Affects the Development of a Grape-Specific Necrosis and a Tobacco Hypersensitive Response. *J. Bacteriol.* 187, 185–192. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.185-192.2005>
- Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M., Dameron, T., 2000. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. See Front Matter.
- Harrison, P.W., Lower, R.P.J., Kim, N.K.D., Young, J.P.W., 2010. Introducing the bacterial ‘chromid’: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010>
- Harshey, R.M., 1994. Bees aren’t the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 13, 389–394.
- Haudecoeur, E., Tannières, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., Faure, D., 2009. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 529–537.
- He, X., Chang, W., Pierce, D.L., Seib, L.O., Wagner, J., Fuqua, C., 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Regulates Conjugal Transfer (tra) Gene Expression and Influences Growth Rate. *J. Bacteriol.* 185, 809–822. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.809-822.2003>
- Hedgcock, G.G., 1910. FIELD STUDIES OF THE CROWX-GALL.pdf.
- Herlache, T.C., Triplett, E.W., 2002. Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolitoxin production and resistance genes. *BMC Biotechnol.* 2, 2.
- Herlache, T.C., Zhang, H.S., Ried, C.L., Carle, S.A., Zheng, D., Basaran, P., Thaker, M., Burr, A.T., Burr, T.J., 2001. Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology* 91, 966–972.
- Hoekema, A., De Pater, B.S., Fellinger, A.J., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., 1984. The limited host range of an *Agrobacterium tumefaciens* strain extended by a cytokinin gene from a wide host range T-region. *EMBO J.* 3, 3043.
- Holmes, B., 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. *Bact. Bact.- Contam. Plant Tissue Cult. ISHS Acta Hortic.*

- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligori, S., Expert, D., Nasser, W., Reverchon, S., 2008. PecS Is a Global Regulator of the Symptomatic Phase in the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 190, 7508–7522. <https://doi.org/10.1128/JB.00553-08>
- Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A., Rorsch, A., 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium* ex planta. *Microbiology* 98, 477–484.
- Hughes, D.T., Sperandio, V., 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 111–120. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1836>
- Hwang, I., Li, P.-L., Zhang, L., Piper, K.R., Cook, D.M., Tate, M.E., Farrand, S.K., 1994. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 4639–4643.
- Hwang, I., Smyth, A.J., Luo, Z.-Q., Farrand, S.K., 1999. Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Mol. Microbiol.* 34, 282±294.
- Hynes, M.F., McGregor, N.F., 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4, 567–574.
- Ikeda, T., Kajiyama, K., Kita, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H., 2001. The Synthesis of Optically Pure Enantiomers of N-Acyl-homoserine Lactone Autoinducers and Their Analogues. *Chem. Lett.* 314–315.
- Irelan, N.A., Meredith, C.P., 1996a. Genetic Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Am. Soc. Enol. Vitic.*
- Irelan, N.A., Meredith, C.P., 1996b. Genetic Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 145.
- Johnson, K.L., Cronin, H., Reid, C.L., Burr, T.J., 2016. Distribution of *Agrobacterium vitis* in Grapevines and Its Relevance to Pathogen Elimination. *Plant Dis.* 100, 791–796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0931-RE>
- Johnson, K.L., Zheng, D., Kaewnum, S., Reid, C.L., Burr, T., 2013. Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in grapevines. *Phytopathology* 103, 633–640.
- Jones, K.J., Moore, K., Sambles, C., Love, J., Studholme, D.J., Aves, S.J., 2016. Draft Genome Sequences of *Achromobacter piechaudii* GCS2, *Agrobacterium* sp. Strain SUL3, *Microbacterium* sp. Strain GCS4, *Shinella* sp. Strain GWS1, and *Shinella* sp. Strain SUS2 Isolated from Consortium with the Hydrocarbon-Producing Alga *Botryococcus braunii*. *Genome Announc.* 4, e01527-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01527-15>
- Jones, P., Binns, D., Hsin-Yu Chang, Matthew Fraser, Weizhong Li, Craig McAnulla, Hamish McWilliam, John Maslen, Alex Mitchell, Gift Nuka, Sebastien Pesseat, Antony F. Quinn, Amaia Sangrador-Vegas, Maxim Scheremetjew, Siew-Yit Yong, Rodrigo Lopez, and Sarah Hunter, 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M., Allardet-Servent, A., 1998. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 180, 2749–2755.
- Kado, C.I., 2014. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>

- Kaewnum, S., Zheng, D., Reid, C.L., Johnson, K.L., Gee, J.C., Burr, T.J., 2013. A host-specific biological control of grape crown gall by *Agrobacterium vitis* strain F2/5: its regulation and population dynamics. *Phytopathology* 103, 427–435.
- Kakiuchi, Y., Gàlis, I., Tamogami, S., Wabiko, H., 2006. Reduction of polar auxin transport in tobacco by the tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* AK-6b gene. *Planta* 223, 237–247. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0080-4>
- Kaufmann, M., Kassemeyer, H.H., Otten, L., 1996. Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis* 35, 151–153.
- Kawaguchi, A., 2015. Biological control agent *Agrobacterium vitis* strain ARK-1 suppresses expression of the *virD2* and *virE2* genes in tumorigenic *A. vitis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 789–799. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0730-8>
- Kawaguchi, A., 2013. Biological Control of Crown Gall on Grapevine and Root Colonization by Nonpathogenic *Rhizobium vitis* Strain ARK-1. *Microbes Environ.* 28, 306–311. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13014>
- Kawaguchi, A., 2009. Studies on the diagnosis and biological control of grapevine crown gall and phylogenetic analysis of tumorigenic *Rhizobium vitis*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 462–463. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0196-7>
- Kawaguchi, A., Inoue, K., 2012. New Antagonistic Strains of Non-Pathogenic *Agrobacterium vitis* to Control Grapevine Crown Gall: Biocontrol of Grape Crown Gall by Non-Pathogenic *A. vitis*. *J. Phytopathol.* 160, 509–518. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01939.x>
- Kawaguchi, A., Inoue, K., Nasu, H., 2007. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *J. Gen. Plant Pathol.* 73, 133–138. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0327-3>
- Kawaguchi, A., Inoue, K., Nasu, H., 2005a. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 422–430. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0234-z>
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Ichinose, Y., 2008. Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathol.* 57, 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01829.x>
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Inoue, K., Nasu, H., 2005b. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 54–59. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0160-5>
- Kerr, A., 1969. Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*. *Nature* 223, 1175–1176.
- Kerr, A., Panagopoulos, C.G., 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control.pdf. *Phytopathology* 90, 172–179.
- Kerstens, K., De Ley, J., Sneath, P.H.A., Sackin, M., 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *Microbiology* 78, 227–239.
- Kim, H.S., Yi, H., Myung, J., Piper, K.R., Farrand, S.K., 2008. Opine-Based *Agrobacterium* Competitiveness: Dual Expression Control of the Agrocinopine Catabolism (*acc*) Operon by Agrocinopines and Phosphate Levels. *J. Bacteriol.* 190, 3700–3711. <https://doi.org/10.1128/JB.00067-08>
- Kleerebezem, M., Quadri, L., Kuipers, O., de Vos, W., 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and twocomponent signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895–904.
- Kliwer, W.M., 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 41, 923–931.
- Koay, M., Zhang, L., Yang, B., Maher, M.J., Xiao, Z., Wedd, A.G., 2005. CopC Protein from *Pseudomonas syringae* : Intermolecular Transfer of Copper from Both the Copper(I) and Copper(II) Sites. *Inorg. Chem.* 44, 5203–5205. <https://doi.org/10.1021/ic0506198>

- Körber, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J., Koncz, C.S., 1991. T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J.* 10, 3983–3991.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D. steven, Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Kreusch, D., von Lintig, J., Schröder, J., 1995. Ti plasmid-encoded octopine and nopaline catabolism in *Agrobacterium*: specificities of the LysR-type regulators OccR and NocR, and protein-induced DNA bending. *Mol. Gen. Genet. MGG* 249, 102–110.
- Kumagai, L., Fabritius, A.-L., 2008. Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex bio-PCR, in: Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference. pp. 42–43.
- Kuzmanović, N., Biondi, E., Bertaccini, A., Obradović, A., 2015. Genetic relatedness and recombination analysis of *Allorhizobium vitis* strains associated with grapevine crown gall outbreaks in Europe. *J. Appl. Microbiol.* 119, 786–796. <https://doi.org/10.1111/jam.12858>
- Kuzmanović, N., Biondi, E., Ivanović, M., Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., Obradović, A., 2016. Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. *J. Plant Pathol.* 98, 311–319.
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Zlatković, N., Obradović, A., 2014. Characterization and phylogenetic diversity of *Agrobacterium vitis* from Serbia based on sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 757–768. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0507-5>
- Kuzmanović, N., Puławska, J., Prokić, A., Ivanović, M., Zlatković, N., Gašić, K., Obradović, A., 2015. Draft Genome Sequences of *Agrobacterium nepotum* Strain 39/7<sup>T</sup> and *Agrobacterium* sp. Strain KFB 330. *Genome Announc.* 3, e00331-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00331-15>
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2013. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 467–481. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130199bl>
- Lamovèk, J., Stare, B.G., Gregor, U., 2014. Isolation of non-pathogenic *Agrobacterium* spp. biovar 1 from agricultural soils in Slovenia. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 130–139.
- Lang, J., Faure, D., 2014a. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00014>
- Lang, J., Faure, D., 2014b. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00014>
- Lang, J., Planamente, S., Mondy, S., Dessaux, Y., Moréra, S., Faure, D., 2013. Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumour: Co-transfer of Ti and At plasmids in *A. tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 90, 1178–1189. <https://doi.org/10.1111/mmi.12423>
- Lang, J., Vigouroux, A., Planamente, S., El Sahili, A., Blin, P., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Moréra, S., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004444>
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Gueguen, L., Daubin, V., Muller, D., Nesme, X., 2011. Genomic Species Are Ecological Species as Revealed by Comparative Genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.* 3, 762–781. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr070>

- Lassalle, F., Planel, R., Penel, S., Chapulliot, D., Barbe, V., Dubost, A., Calteau, A., Vallenet, D., Mornico, D., Bigot, T., Guéguen, L., Vial, L., Muller, D., Daubin, V., Nesme, X., 2017. Ancestral Genome Estimation Reveals the History of Ecological Diversification in *Agrobacterium*. *Genome Biol. Evol.* 9, 3413–3431. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx255>
- Lassalle, F., Planel, R., Penel, S., Chapulliot, D., Barbe, V., Dubost, A., Calteau, A., Vallenet, D., Mornico, D., Gueguen, L., others, 2015. Ancestral genome reconstruction reveals the history of ecological diversification in *Agrobacterium*. *bioRxiv* 034843.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lehoczky, J., 1971. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis* 10, 215–221.
- Lehoczky, J., 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection. *Res. Inst. Vitic. Enol.* 239–246.
- Lei, S.P., Lin H.C., Wang S.S., Higaki P., Wilcox G., 1992. Characterization of the *Erwinia carotovora* pch gene and its product polygalacturonase. *Gene* 117, 119–124.
- Lépine, F., Déziel, E., 2011. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Detection and Quantification of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones and 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines, in: Rumbaugh, K.P. (Ed.), *Quorum sensing*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 61–69.
- Lewenza, S., Visser, M.B., Sokol, P.A., 2002. Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 48, 707–716. <https://doi.org/10.1139/w02-068>
- Li, J.-Y., Wang, J.-H., Wang, H.-M., 2009. Mode of Action of the Antibacterial Compound Ar26 Produced by *Agrobacterium vitis* Strain E26 with Activity against *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis*. *J. Phytopathol.* 157, 159–165. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01470.x>
- Li, P.-L., Farrand, S.K., 2000. The Replicator of the Nopaline-Type Ti Plasmid pTiC58 Is a Member of the repABC Family and Is Influenced by the TraR-Dependent Quorum-Sensing Regulatory System. *J. Bacteriol., Journal of bacteriology*.
- Li, S.-Z., Xu, R., Ahmar, M., Goux-Henry, C., Queneau, Y., Soulère, L., 2018. Influence of the d / l configuration of *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) and analogues on their Lux-R dependent quorum sensing activity. *Bioorganic Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.005>
- Li, Y., Gronquist, M.R., Hao, G., Holden, M.R., Eberhard, A., Scott, R.A., Savka, M.A., Szegedi, E., Sule, S., Burr, T.J., 2005a. Chromosome and plasmid-encoded *N*-acyl homoserine lactones produced by *Agrobacterium vitis* wildtype and mutants that differ in their interactions with grape and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.04.002>
- Li, Y., Gronquist, M.R., Hao, G., Holden, M.R., Eberhard, A., Scott, R.A., Savka, M.A., Szegedi, E., Sule, S., Burr, T.J., 2005b. Chromosome and plasmid-encoded *N*-acyl homoserine lactones produced by *Agrobacterium vitis* wildtype and mutants that differ in their interactions with grape and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.04.002>
- Liang, Z., Tzfira, T., 2013. In vivo formation of double-stranded T-DNA molecules by T-strand priming. *Nat. Commun.* 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3253>
- Lim, S.H., Kim, J.G., Kang, H.W., 2009. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiol. Res.* 164, 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.02.006>
- Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A.L., Mattmann, M.E., Christensen, Q.H., Kessler, A., Hennecke, H., Blackwell, H.E., Greenberg, E.P., Harwood, C.S., 2011. Isovaleryl-homoserine lactone, an

- unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 16765–16770.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1114125108>
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dyé, F., Williams, P., Downie, J.A., 2000. The regulatory locus cinRI in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol. Microbiol. 37, 81–97.
- Liu, Y., Chatterjee, A., Chatterjee, A.K., 1994. Nucleotide sequence and expression of a novel pectate lyase gene (pel-3) and a closely linked endopolygalacturonase gene (peh-1) of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2545–2552.
- Lodwig E., Poole P., 2003. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. Crit. Rev. Plant Sci., Critical Reviews in Plant Sciences Critical Reviews in Plant Sciences.
- López-Guerrero, M.G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J.L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M.A., Ramírez, M.A., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2012. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. Plasmid 68, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.07.002>
- Lowe, N., Gan, H.M., Chakravartty, V., Scott, R., Szegedi, E., Burr, T.J., Savka, M.A., 2009. Quorum-sensing signal production by *Agrobacterium vitis* strains and their tumor-inducing and tartrate-catabolic plasmids. FEMS Microbiol. Lett. 296, 102–109.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01627.x>
- Malik, A.K., Fekete, A., Gebefuegi, I., Rothballer, M., Schmitt-Kopplin, P., 2009. Single drop microextraction of homoserine lactones based quorum sensing signal molecules, and the separation of their enantiomers using gas chromatography mass spectrometry in the presence of biological matrices. Microchim. Acta 166, 101–107.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-009-0183-x>
- Malott, R.J., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Sokol, P.A., 2005. Characterization of the cciIR Quorum-Sensing System in *Burkholderia cenocepacia*. Infect. Immun. 73, 4982–4992.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4982-4992.2005>
- Marines, F., White, D.W., 1993. Nopaline causes a conformational change in the NopR regulatory protein-nopR promoter complex of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiT37. Mol. Gen. Genet. MGG 241, 65–72.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A., 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 489–503.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>
- Martínez, E., Palacios, R., Sanchez, F., 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. J. Bacteriol. 169, 2828–2834.
- Matthysse, A.G., 2014. Attachment of *Agrobacterium* to plant surfaces. Front. Plant Sci. 5.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00252>
- McAnulla, C., Edwards, A., Sanchez-Contreras, M., Sawers, R.G., Downie, J.A., 2007. Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Microbiology 153, 2074–2082.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007153-0>
- McGuire, R.G., Rodriguez-Palenzuela, P., Collmer, A., Burr, T.J., 1991. Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. Appl. Environ. Microbiol. 57, 660–664.
- McKenney, D., Brown, K.E., Allison, D.G., 1995. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. J. Bacteriol. 177, 6989–6992.
- Mhedbi-Hajri, N., Yahiaoui, N., Mondy, S., Hue, N., Pélissier, F., Faure, D., Dessaux, Y., 2016. Transcriptome analysis revealed that a quorum sensing system regulates the transfer of the

- pAt megaplasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. BMC Genomics 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3007-5>
- Michels, H.T., 2006. Anti-microbial characteristics of copper. ASTM Stand. News.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., Long, S.R., 2004. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 4701–4705.
- Momol, E.A., Burr, T.J., Reid, C.L., Momol, M.T., Hseu, S.H., Otten, L., 1998. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5-end of the 23S rRNA gene and Random Amplified Polymorphic DNA. J. Appl. Microbiol.
- Moor, L., Warren G., Strobel G., 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid 2, 617–626.
- Moore, L.W., Chilton, W.S., Canfield, M.L., 1997. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. Appl. Environ. Microbiol. 63, 201–207.
- Mootz, H.D., Marahiel, M.A., 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. J. Bacteriol. 179, 6843–6850.
- Morton, E.R., Merritt, P.M., Bever, J.D., Fuqua, C., 2013. Large Deletions in the pAtC58 Megaplasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Can Confer Reduced Carriage Cost and Increased Expression of Virulence Genes. Genome Biol. Evol. 5, 1353–1364. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt095>
- Mougel, C., Cournoyer, B., Nesme, X., 2001. Novel Tellurite-Amended Media and Specific Chromosomal and Ti Plasmid Probes for Direct Analysis of Soil Populations of *Agrobacterium* Biovars 1 and 2. Appl. Environ. Microbiol. 67, 65–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.65-74.2001>
- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., Lindström, K., 2014. Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 37, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., Lindström, K., 2015. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. Syst. Appl. Microbiol. 38, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>
- Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K.-D., Solioz, M., 2001. Interaction of the CopZ Copper Chaperone with the CopA Copper ATPase of *Enterococcus hirae* Assessed by Surface Plasmon Resonance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 172–177. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5757>
- Nair, G.R., 2003. Reexamining the Role of the Accessory Plasmid pAtC58 in the Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* Strain C58. PLANT Physiol. 133, 989–999. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030262>
- Nawapan, S., Charoenlap, N., Charoenwuttitani, A., Saenkham, P., Mongkolsuk, S., Vattanaviboon, P., 2009. Functional and Expression Analyses of the cop Operon, Required for Copper Resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 191, 5159–5168. <https://doi.org/10.1128/JB.00384-09>
- Nuenen, M., Ruffray, P., Otten, L., 1993. Rapid divergence of *Agrobacterium vitis* octopine-cucumopine Ti plasmids from a recent common ancestor. Mol. Gen. Genet. MGG 240, 49–57.
- Oger, P., Farrand, S.K., 2002. Two Opines Control Conjugal Transfer of an *Agrobacterium* Plasmid by Regulating Expression of Separate Copies of the Quorum-Sensing Activator Gene traR. J. Bacteriol. 184, 1121–1131. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1121-1131.2002>
- Ophel, K., Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 40, 236–241.

- Orel, D.C., Reid, C.L., Fuchs, M., Burr, T.J., 2017a. Identifying Environmental Sources of *Agrobacterium vitis* in Vineyards and Wild Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 68, 213–217. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16085>
- Orel, D.C., Reid, C.L., Fuchs, M., Burr, T.J., 2017b. Identifying Environmental Sources of *Agrobacterium vitis* in Vineyards and Wild Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* *ajev.2016.16085*. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16085>
- Oresnik, I.J., Liu, S.-L., Yost, C.K., Hynes, M.F., 2000. Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* 182, 3582–3586.
- Oresnik, I.J., Pacarynuk, L.A., O'Brien, S.A.P., Yost, C.K., Hynes, M.F., 1998. Plasmid-Encoded Catabolic Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii: Evidence for a Plant-Inducible Rhamnose Locus Involved in Competition for Nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interactions*4.
- Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L.E., Rogel, M.A., González, V., Peralta, H., Mora, J., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>
- Osorno, O., Castellanos, L., Ramos, F.A., Arévalo-Ferro, C., 2012. Gas chromatography as a tool in quorum sensing studies, in: *Gas Chromatography-Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. InTech.
- Otten, Crouzet, Salomone, J.-Y., De Ruffray, Szegedi, E., 1995. *Agrobacterium vitis* strain AB3 harbors two independent tartrate utilization systems, one of which is encoded by the Ti plasmid. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 8, 138–146.
- Otten, L., De Ruffray, P., 1994. *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plasmid pTiAB4 relationship to other Ti plasmids and T-DNA structure. *Mol Gen Genet* 255, 493–505.
- Otten, L., Gérard J.-C., De Ruffray P., 1993. The Ti plasmid from the wide host range *Agrobacterium vitis* strain Tm4 map and homology with other Ti plasmids. *Plasmid* 29, 154–159.
- Otten, L., Szegedi, E., 1985. Crown galls induced by octopine-degrading biotype 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* contain a new form of lysopine dehydrogenase. *Plant Sci.* 40, 81–85.
- Padavannil, A., Jobichen, C., Qinghua, Y., Seetharaman, J., Velazquez-Campoy, A., Yang, L., Pan, S.Q., Sivaraman, J., 2014. Dimerization of VirD2 Binding Protein Is Essential for *Agrobacterium* Induced Tumor Formation in Plants. *PLoS Pathog.* 10, e1003948. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003948>
- Palacio-Bielsa, A., González-Abolafio, R., Álvarez, B., Lastra, B., Cambra, M.A., Salcedo, C.I., López, M.M., Penyalver, R., 2009. Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumours. *Plant Pathol.* 58, 584–593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01984.x>
- Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G., 1973. Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (EF Smith & Townsend) Conn. *J. Appl. Microbiol.* 36, 233–240.
- Panday, D., Schumann, P., Das, S.K., 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2632–2639. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028407-0>
- Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Pardo, M.A., Lagunez, J., Miranda, J., Martinez, E., 1994. Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. *Mol. Microbiol.* 11, 315–321.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Greenberg, E.P., 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4360–4365.



- Paulus, F., Otten, L., 1993. Functional and mutated agrocinopine synthase genes on octopine T-DNAs. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 6, 393–402.
- Paulus, F., Ride, M., Otten, L., 1989. Distribution of two *Agrobacterium tumefaciens* insertion elements in natural isolates: evidence for stable association between Ti plasmids and their bacterial hosts. *Mol. Gen. Genet.* MGG 219, 145–152.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P., 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1490–1494.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., Iglewski, B.H., 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179, 5756–5767.
- Perez-Mendoza, D., Sepulveda, E., Pando, V., Munoz, S., Nogales, J., Olivares, J., Soto, M.J., Herrera-Cervera, J.A., Romero, D., Brom, S., Sanjuan, J., 2005. Identification of the rctA Gene, Which Is Required for Repression of Conjugal Transfer of Rhizobial Symbiotic Megaplasmids. *J. Bacteriol.* 187, 7341–7350. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7341-7350.2005>
- Pesenti-Barili, B., Ferdani, E., Mosti, M., Degli-Innocenti, F., 1991. Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on Various Carriers for Crown Gall Control. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2047–2051.
- Peters, N.K., Frost J.W., Long S.R., 1986. A Plant Flavone, Luteolin, Induces Expression of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Science* 233, 977–980.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., Tempé, J., 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* MGG 190, 204–214.
- Petit, A., Tempé, J., Kerr, A., Holsters, M., Van Montagu, M., Schell, J., 1978. Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* 271.
- Pietschke, C., Treitz, C., Forêt, S., Schultze, A., Künzel, S., Tholey, A., Bosch, T.C.G., Fraune, S., 2017. Host modification of a bacterial quorum-sensing signal induces a phenotypic switch in bacterial symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201706879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706879114>
- Piper, K.R., Beck von Bodman, S., Hwang, I., Farrand, S.K., 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 32, 1077–1089.
- Piper, K.R., Bodman S. B. V., Farrand S. K., 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Lett. Nat.* 362, 448–450.
- Pitzschke, A., Hirt, H., 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J.* 29, 1021–1032.
- Ponsonnet, C., Nesme, X., 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 1616, 300–309.
- Popoff, Y., Kersters, K., Kiredjan, M., Miras, I., Coynault, C., 1984. Position taxonomique de souches de *Agrobacterium* d'origine hospitalière. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 135, 427–442.
- Prell, J., Poole, P., 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.005>
- Puig, S., Thiele, D.J., Rees, E.M., 2002. The ABCDs of Periplasmic Copper Trafficking. *Structure.*
- Quandt, J., Hynes, M.F., 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., others, 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592.

- Ramírez-Bahena, M.H., Vial, L., Lassalle, F., Diel, B., Chapulliot, D., Daubin, V., Nesme, X., Muller, D., 2014. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium*/Rhizobium supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Mol. Phylogenet. Evol.* 73, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.005>
- Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Jambari, N., Ortori, C.A., Heeb, S., Williams, P., Barrett, D.A., Lamont, I.L., Ronson, C.W., 2009. A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol.* 73, 1141–1155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06843.x>
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 2002. ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol. Microbiol.* 43, 981–991.
- Rensing, C., Grass, G., 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 197–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00049-4)
- Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y., Gardan, L., 2000. Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar 1, 2, and 3 strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1818–1825.
- Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewski-Dyé, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P., Downie, J.A., 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J. Bacteriol.* 181, 3816–3823.
- Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T.J., Collmer, A., 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.* 173, 6547–6552.
- Romero D., Brom S., 2004. The Symbiotic Plasmids of the *Rhizobiaceae*. *Plasmid Biol.*
- Rondon, M.R., 2004. Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiology* 150, 3857–3866. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27319-0>
- Roper, M.C., Greve, L.C., Warren, J.G., Labavitch, J.M., Kirkpatrick, B.C., 2007. Xylella fastidiosa requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 411–419.
- Roy, M.A., Sasser, M., 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology*.
- Saint, C.P., Wexler, M., Murphy, P.J., Tempe, J., Tate, M.E., 1993. Characterization of genes for synthesis and catabolism of a new rhizopine induced in nodules by *Rhizobium meliloti* Rm220-3: extension of the rhizopine concept. *J. Bacteriol.* 175, 5205–5215.
- Salomone, J.-Y., Szegedi, E., Cobanov, P., Otten, L., 1998a. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 836–838.
- Salomone, J.-Y., Szegedi, E., Cobanov, P., Otten, L., 1998b. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 836–838.
- Sanchez-Contreras, M., Bauer, W.D., Gao, M., Robinson, J.B., Allan Downie, J., 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1149–1163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2041>
- Savka, M.A., Le, P.T., Burr, T.J., 2011. LasR Receptor for Detection of Long-Chain Quorum-Sensing Signals: Identification of N-Acyl-homoserine Lactones Encoded by the avsl Locus of *Agrobacterium vitis*. *Curr. Microbiol.* 62, 101–110. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9679-1>
- Sawada, H., Ieki, H., Matsuda, I., 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 828–831.

- Sawada, H., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S., IEKI, H., 1992. Differentiation of *Agrobacterium* taxa based on partial sequences of 16S rRNA. *Jpn. J. Phytopathol.* 58, 761–765.
- Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G., Peres, C.M., Schmidt, S., Juhaszova, K., Sufrin, J.R., Harwood, C.S., 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454, 595–599. <https://doi.org/10.1038/nature07088>
- Schrammeijer, B., Hemelaar, J., Hooykaas, P.J.J., 1998. The presence and characterization of a virF gene on *Agrobacterium vitis* Ti plasmids. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 429–433.
- Schroth, M.N., Weinhold, A.R., McCain, A.H., C., H.D., 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia*.
- Schulz, T.F., Lorenz D., Eichhorn K. W., Otten L., 1993. Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains. *Vitis* 32, 179–182.
- Shams, M., Lavire, C., Muller, D., Vial, L., Campillo, T., Nesme, X., 2012. Rapid and efficient methods to isolate, type strains and determine species of *Agrobacterium* spp. in pure culture and complex environments, Intech. ed, Intech. INTECH Open Access Publisher.
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X., Lavire, C., 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.002>
- Simon et al, 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *E coli SM10. Nat. Biotechnol.*
- Slater, F.R., Bailey, M.J., Tett, A.J., Turner, S.L., 2008. Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities: Fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00505.x>
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K.L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H., Wood, D.W., 2009. Genome Sequences of Three *Agrobacterium* Biovars Help Elucidate the Evolution of Multichromosome Genomes in Bacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2501–2511. <https://doi.org/10.1128/JB.01779-08>
- Soliz, M., Stoyanov, J.V., 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 183–195. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00053-6)
- Spiers, A.G., 1979. Isolation and characterisation of *Agrobacterium* species. *N. Z. J. Agric. Res.* 22, 631–639. <https://doi.org/10.1080/00288233.1979.10417834>
- Stacy, D.M., Welsh, M.A., Rather, P.N., Blackwell, H.E., 2012. Attenuation of Quorum sensing in the Pathogen *Acinetobacter baumannii* Using Non-native N -Acyl Homoserine Lactones. *ACS Chem. Biol.* 7, 1719–1728. <https://doi.org/10.1021/cb300351x>
- Staphorst, J.L., van Zyl, F.G., Strijdom, B.W., Groenewold, Z.E., 1985. Agrocin-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Curr. Microbiol.* 12, 45–52.
- Stevens, A.M., Greenberg, E.P., 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Essential Elements for Activation of the Luminescence Genes. *J. Bacteriol.* 179, 557–562.
- Stoyanov, J.V., Hobman J.L., NL Brown, 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol. Microbiol.* 39, 502±511.
- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., Yuan, Z.-C., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>
- Süle, S., 1978. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *J. Appl. Microbiol.* 44, 207–213.

- Süle, S., Burr, T.J., 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars. *Plant Pathol.* 47, 84–88.
- Süle, S., Cursino, L., Zheng, D., Hoch, H.C., Burr, T.J., 2009a. Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 596–601. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02716.x>
- Süle, S., Cursino, L., Zheng, D., Hoch, H.C., Burr, T.J., 2009b. Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 596–601. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02716.x>
- Süle, S., Cursino, L., Zheng, D., Hoch, H.C., Burr, T.J., 2009c. Surface motility and associated surfactant production in *Agrobacterium vitis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 596–601. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02716.x>
- Süle, S., J. Mozsar, T. J. Burr, 1994. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grape- vine rootstocks. *Resistance* 84, 607–611.
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H., 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J. Gen. Plant Pathol.* 70, 342–347. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0133-8>
- Szegedi, E., 2003a. Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. *VITIS* 42, 39–42.
- Szegedi, E., 2003b. Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. *VITIS-GEILWEILERHOF-42*, 39–42.
- Szegedi, E., Bottka, S., 2002. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *VITIS-J. Grapevine Res.* 41, 37.
- Szegedi, E., Bottka, S., Mikulás, J., Otten, L., Sule, S., 2005. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis* 44, 49–54.
- Szegedi, E., Czako M., Otten L., 1996. Further evidence that the vitopine-type pTi's of *Agrobacterium vitis* Represent a novel group of Ti plasmids. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 9, 139–143.
- Szegedi, E., Czako, M., Otten, L., Koncz, C.S., 1988a. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*
- Szegedi, E., Czakó, M., Otten, L., Koncz, C.S., 1988b. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 237–247.
- Szegedi, E., Kozma, P., 1984. Studies on inheritance of resistance to crown gall disease of grapevine. *Vitis* 23, 121–126.
- Szegedi, E., Otten, L., 1997. Incompatibility Properties of Tartrate Utilization Plasmids Derived from *Agrobacterium vitis* Strains. *Plasmid* 39, 35–40.
- Szegedi, Otten, Czako, 1992. Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 5, 435–438.
- Tambalo, D.D., Yost, C.K., Hynes, M.F., 2010. Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: *Rhizobium leguminosarum* swarming. *FEMS Microbiol. Lett.* 307, 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01982.x>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor, R.K., Manoil, C., Mekalanos, J.J., 1989. Broad-host-range vectors for delivery of TnphoA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 171, 1870–1878.
- Teixeira, E.C., Franco de Oliveira, J.C., Marques Novo, M.T., Bertolini, M.C., 2008. The copper resistance operon copAB from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri: gene inactivation

- results in copper sensitivity. *Microbiology* 154, 402–412.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/013821-0>
- Teng, J.L.L., Yeung, M.L., Chan, E., Jia, L., Lin, C.H., Huang, Y., Tse, H., Wong, S.S.Y., Sham, P.C., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., 2017. PacBio But Not Illumina Technology Can Achieve Fast, Accurate and Complete Closure of the High GC, Complex Burkholderia pseudomallei Two-Chromosome Genome. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01448>
- Testard-Vaillant, P., 2005. UN NECTAR DE 7500 ANS D'ÂGE. J. CNRS.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., 2004. Le génome des alpha-protéobactéries : complexité, réduction, diversité et fluidité. *Can. J. Microbiol.* 50, 383–396.  
<https://doi.org/10.1139/w04-033>
- Thiel, V., Kunze, B., Verma, P., Wagner-Döbler, I., Schulz, S., 2009. New Structural Variants of Homoserine Lactones in Bacteria. *ChemBioChem* 10, 1861–1868.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.200900126>
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1980. Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19, 729–739.
- Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 1996. An essential role for actA in acid tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Microbiology* 142, 601–610.
- Tolba, I.H., Zaki, M.F., 2011. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Ann. Agric. Sci.* 56, 113–119.  
<https://doi.org/10.1016/j.aosas.2011.06.001>
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V., Brom, S., 2003. Conjugative Transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, Which Is Required for Mobilization of the Symbiotic Plasmid, Is Regulated by Quorum sensing. *J. Bacteriol.* 185, 1681–1692.  
<https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1681-1692.2003>
- Turk, S.C., Nester, E.W., Hooykaas, P.J., 1993. The virA promoter is a host-range determinant in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 7, 719–724.
- Van Labereke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J., 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169–170.
- Verma, D.P.S., Long, S., 1983. The molecular biology of *Rhizobium* legume symbiosis. *Int. Rev. Cytol., International Review of Cytology International Review of Cytology.*
- Veselov, D., Langhans, M., Hartung, W., Aloni, R., Feussner, I., Götz, C., Veselova, S., Schlomski, S., Dickler, C., Bächmann, K., others, 2003. Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta* 216, 512–522.
- Vial, L., Cuny, C., Gluchoff-Fiasson, K., Comte, G., Oger, P.M., Faure, D., Dessaux, Y., Bally, R., Wisniewski-Dyé, F., 2006. N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule: AHL-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 155–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00153.x>
- Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M.J., Lopez, M.M., 1992. Biological Control of *Agrobacterium tumefaciens*, Colonization, and pAgK84 Transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra- Mutant Strain K1026. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 309–331.
- Wagner-Döbler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., Ebner, S., Hennig, A., Pukall, R., Schulz, S., 2005. Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6, 2195–2206. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500189>
- Waite, H., Morton, L., 2007. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 5–17.

- Wang, C., Yan, C., Fuqua, C., Zhang, L.-H., 2014. Identification and Characterization of a Second Quorum-Sensing System in *Agrobacterium tumefaciens* A6. *J. Bacteriol.* 196, 1403–1411. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-13>
- Wang, E.T., Van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X.H., Dorado, O., Chen, W.X., Martínez-Romero, E., 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 687–699.
- Wang, H.M., Wang, H.X., Ng, T.B., Li, J.Y., 2003. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens*. *Plant Pathol.* 52, 134–139.
- Wei, Q., Li, J.-Y., Wang, J.-H., Wang, H.-M., 2009. Strain E26 of *Agrobacterium vitis*, a Biological Control Agent of Grapevine Crown Gall, Does Not Contain *virA* and *virG* Pathogenic Determinants: Biological Control of *Agrobacterium vitis*. *J. Phytopathol.* 157, 657–665. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01544.x>
- Weibgen, U., Russa, R., Yokota, A., Mayer, H., 1993. Taxonomic significance of the lipopolysaccharide composition of the three biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16, 177–182.
- Werner, T., Schmölling, T., 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>
- West, A.H., Stock, A.M., 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 369–376.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365–404.
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dyé, F., Lithgow, J.K., Downie, J.A., 2002. N-Acyl-Homoserine Lactone Inhibition of Rhizobial Growth Is Mediated by Two Quorum-Sensing Genes That Regulate Plasmid Transfer. *J. Bacteriol.* 184, 4510–4519. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4510-4519.2002>
- Willems, A., Collins, M.D., 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 43, 305–313.
- Wisniewski-Dyé, F., Downie, J.A., 2002. Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 397–407.
- Wisniewski-Dyé, F., Jones, J., Chhabra, S.R., Downie, J.A., 2002. *raiR* Genes Are Part of a Quorum-Sensing Network Controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 184, 1597–1606. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1597-1606.2002>
- Witzany, G. (Ed.), 2011. *Biocommunication in Soil Microorganisms, Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14512-4>
- Wood, D.W., 2001. The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317–2323. <https://doi.org/10.1126/science.1066804>
- Yanagi, M., Yamasato, K., 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 115–120.
- Yang, Y.L., Li, J.Y., Wang, J.H., Wang, H.M., 2009. Mutations affecting chemotaxis of *Agrobacterium vitis* strain E26 also alter attachment to grapevine roots and biocontrol of crown gall disease. *Plant Pathol.* 58, 594–605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02020.x>
- Yanofsky, M., Lowe, B., Montoya, A., Rubin, R., Krul, W., Gordon, M., Nester, E., 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 201, 237–246.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all

- species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 89–103.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J., 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86, 1091N19117–116127.
- Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A., Tate, M.E., 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Lett. Nat.* 362, 446–448.
- Zhao, Y., 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- Zheng, D., Burr, T.J., 2016. Inhibition of Grape Crown Gall by *Agrobacterium vitis* F2/5 Requires Two Nonribosomal Peptide Synthetases and One Polyketide Synthase. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 29, 109–118. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-15-0153-R>
- Zheng, D., Burr, T.J., 2013a. An Sfp-Type PPTase and Associated Polyketide and Nonribosomal Peptide Synthases in *Agrobacterium vitis* Are Essential for Induction of Tobacco Hypersensitive Response and Grape Necrosis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 812–822. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0295-R>
- Zheng, D., Burr, T.J., 2013b. An Sfp-Type PPTase and Associated Polyketide and Nonribosomal Peptide Synthases in *Agrobacterium vitis* Are Essential for Induction of Tobacco Hypersensitive Response and Grape Necrosis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 812–822. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0295-R>
- Zheng, D., Hao, G., Cursino, L., Zhang, H., Burr, T.J., 2012. LhnR and upstream operon LhnABC in *Agrobacterium vitis* regulate the induction of tobacco hypersensitive responses, grape necrosis and swarming motility: Characterization of LhnR in *Agrobacterium vitis*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 641–652. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00774.x>
- Zheng, D., Zhang, H., Carle, S., Hao, G., Holden, M.R., Burr, T.J., 2003. A luxR homolog, aviR, in *Agrobacterium vitis* is associated with induction of necrosis on grape and a hypersensitive response on tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 16, 650–658.
- Zhu, J., Beaver, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., Winans, S.C., 1998. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180, 5398–5405.