



HAL
open science

Structures et spécificités de protéines périplasmiques de liaison (PBP) des mannityl-opines et des sucres de la famille du raffinose (RFO) chez *Agrobacterium tumefaciens*

Armelle Vigouroux

► To cite this version:

Armelle Vigouroux. Structures et spécificités de protéines périplasmiques de liaison (PBP) des mannityl-opines et des sucres de la famille du raffinose (RFO) chez *Agrobacterium tumefaciens*. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS541 . tel-03168367

HAL Id: tel-03168367

<https://theses.hal.science/tel-03168367>

Submitted on 13 Mar 2021

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.

Structures et spécificités de protéines périplasmiques de liaison (PBP) des sucres de la famille du raffinose (RFO) et des mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Biochimie et Biologie Structurale

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 13/12/19, par

Armelle Vigouroux

Composition du Jury :

Herman Van Tilbeurgh Professeur, Université Paris-Saclay, I2BC	Président
Valérie Biou Chargée de recherche, CNRS, IBPC	Rapporteuse
Isabelle Broutin Directrice de recherche, CNRS, CiTCoM	Rapporteuse
Marie-Anne Barny Directrice de recherche, CNRS, IEES	Examinatrice
Solange Moréra Directrice de recherche, CNRS, I2BC	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury de thèse Valérie Biou, Isabelle Broutin, Marie-Anne Barny et Herman Van Tilbeurgh d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Un grand merci à toi Solange pour la confiance et l'autonomie que tu m'accordes pour mener les projets. Ton soutien et tes encouragements m'ont permis d'évoluer et de m'épanouir dans ma carrière. C'est un véritable plaisir de travailler avec toi.

Merci à Yves Dessaux pour tes précieux conseils sur *Agrobacterium* et les opines ; Céline Lavire, Ludovic Vial, Thibault Meyer et Jeanne Doré pour cette belle collaboration entre le monde de la microbiologie et celui de la biologie structurale ; Magali Aumont-Nicaise pour ton expertise en microcalorimétrie mais aussi pour ta bonne humeur et toutes nos discussions à refaire le monde lorsque je t'apporte les échantillons ; Pierre Legrand pour tous tes conseils.

Je te remercie Stéphane pour ton aide sur la plateforme de cristallisation et ta gentillesse.

Merci à Léa, Marine et Margot, mes stagiaires qui m'ont aidée à la paillasse et m'ont appris à développer mes qualités pédagogiques.

Enfin, je remercie tous ceux qui font du labo un cadre de travail agréable.

Table des matières

Avant-propos	9
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	11
1. Le genre <i>Agrobacterium</i>	11
1.1. Les données taxonomiques	11
1.2. Le génome d' <i>A. tumefaciens</i> C58	12
1.3. Les génomes d' <i>A. tumefaciens</i> B6 et R10	14
1.4. Le <i>Quorum-sensing</i>	15
2. <i>A. tumefaciens</i> : pathogène de plante	16
2.1. La galle du collet	16
2.2. Le cycle infectieux d' <i>A. tumefaciens</i>	17
2.2.1. Le transfert de l'ADN-T	19
2.2.2. L'importation du complexe T dans le noyau	20
2.2.3. L'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal	20
2.2.4. L'expression des gènes portés par l'ADN-T	22
2.3. Les opines	22
2.3.1. L'origine des opines chez <i>A. tumefaciens</i>	22
2.3.2. Le concept d'opine	23
2.3.3. La classification des plasmides Ti	23
2.3.4. La classification des opines utilisées par le genre <i>Agrobacterium</i>	25
2.3.3.1. La famille de l'octopine	27
2.3.3.2. La famille de la nopaline.....	27
2.3.3.3. La famille de la chrysopine	27
2.3.3.4. La famille des mannityl-opines.....	28
2.3.5. Le métabolisme des mannityl-opines.....	29
3. <i>A. tumefaciens</i> : vie dans la rhizosphère	33
3.1. La rhizosphère	33
3.1.1. Définition et nature de la rhizosphère	33
3.1.2. La colonisation de la rhizosphère : « Priority Effect »	36
3.1.3. La colonisation de la rhizosphère : le cas d' <i>Agrobacterium</i>	37
3.2. Les RFO (Raffinose Family Oligosaccharides)	38
3.2.1. Les RFO et leur précurseur	38
3.2.2. La biosynthèse et le catabolisme des RFO.....	39

3.2.3.	Le rôle des RFO	41
4.	Les protéines périplasmiques de liaison : rôle dans la perception de signaux moléculaires	42
4.1.	Les transporteurs ABC	42
4.1.1.	Les généralités	42
4.1.2.	Les domaines transmembranaires (TMD)	43
4.1.3.	Les domaines de fixation des nucléotides (NBD)	44
4.2.	Les protéines périplasmiques de liaison (PBP)	44
4.2.1.	Les structures.....	44
4.2.2.	La classification	45
4.2.3.	La liaison avec le ligand	47
4.3.	Les interactions PBP/transporteurs ABC : initiation du mécanisme de translocation	48
	Objectifs.....	50
	Chapitre 2 : Caractérisation structurale des PBP impliquées dans la perception des mannityl-opines chez <i>A. tumefaciens</i> B6.....	52
1.	Le contexte scientifique.....	52
2.	La présentation des travaux	53
	Article 1: Structural basis for two efficient modes of agropinic acid opine import into the bacterial pathogen <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
	Article 2: Import pathways of the four mannityl-opines into the bacterial pathogen <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : structural, affinity and in vivo approaches.	70
	Chapitre 3 : Identification et caractérisation structurale de la PBP MelB impliquée dans la perception des RFO et du galactinol chez <i>A. fabrum</i> C58	85
1.	Le contexte scientifique.....	85
2.	La présentation des travaux	85
	Article 3: The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen <i>Agrobacterium fabrum</i>	87
	Chapitre 4 : Discussions et perspectives.....	105
1.	La perception des mannityl-opines	105
1.1.	Le transport de l'agropine et de l'acide agropinique	105
1.2.	Le transport de l'acide mannopinique	106
1.3.	Le double système d'import : avantage écologique dans les tumeurs	107
1.4.	La régulation des mannityl-opines	108
2.	La perception des RFO.....	109
2.1.	La sélectivité de la PBP MelB pour les RFO	110
2.2.	Atu4640 et Atu4665 : rôle et spécificité des deux α -galactosidases.....	110

2.3. Régulation de l'expression de l'opéron <i>meI</i> : Atu4659 et influence des HCA sur le transport et la dégradation des RFO	111
Références bibliographiques	114

Liste des abréviations

ABC: ATP Binding Cassette

ADN-T: ADN transféré

DFG : désoxyfructosyl-glutamine

DFGA : désoxyfructosyl-glutamate

HMW : High Molecular Weight

LMW : Low Molecular Weight

NBD : Nucleotide Binding Domain

PBP : Periplasmic Binding Protein - Protéine périplasmique de liaison

PDB : Protein Data Bank

QS : *Quorum sensing*

RFO : Raffinose Family Oligosaccharides

ROS : Reactive Oxygen Species

SAD : Single-wavelength Anomalous Diffraction

SST4 : Système de transport de type 4

TMD : Transmembrane Domain

pAt : plamide *Agrobacterium tumefaciens*

pTi : plasmid Tumor inducing

Avant-propos

Le genre *Agrobacterium* est un complexe de bactéries vivant dans le sol et dans la rhizosphère de nombreuses plantes avec lesquelles il établit des interactions variées. Les agrobactéries ont développé plusieurs traits de caractère qui leur permettent d'exploiter les ressources du sol et de la rhizosphère, et de survivre à la compétition avec les autres microorganismes. Lorsqu'*Agrobacterium* est pathogène, elle possède un plasmide Ti (Tumor inducing) et est responsable de la maladie de la galle du collet, maladie qui affecte un large spectre de plantes d'intérêt agronomique et qui est caractérisée par la formation de tumeurs. La bactérie pathogène transfère et intègre une partie de son plasmide de virulence pTi dans le génome de la plante, afin de détourner les voies métaboliques de l'hôte à son avantage. Ce détournement aboutit à la formation d'une tumeur de plante qui sert de niche pour le pathogène et dans laquelle sont produites des molécules particulières, appelées opines, qui servent de nutriments spécifiques pour la bactérie. Il existe plus d'une vingtaine d'opines différentes, produites par la plante transformée puis transportées et catabolisées par la bactérie en fonction du type de pTi qu'elle possède. Pour importer les opines et les nombreuses molécules de plantes comme nutriments, les agrobactéries utilisent des protéines périplasmiques de liaison (Periplasmic Binding Protein ou PBP) associées à des transporteurs ABC membranaires.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension de la perception et du transport de deux types de molécules : les sucres de plantes de la famille du raffinose (RFO) chez la souche C58 et les mannityl-opines chez les souches B6/R10. L'objectif est de caractériser au niveau atomique et d'étudier par des mesures d'affinité la spécificité des systèmes de transport permettant à *Agrobacterium* d'acquérir un avantage sélectif lors de la colonisation de la rhizosphère grâce aux RFO et de la tumeur grâce aux mannityl-opines. L'étude porte sur la partie périplasmique de chaque transporteur, à savoir les PBP.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente le genre *Agrobacterium*, traite de la bactérie dans le cadre de la maladie de la galle du collet et dans la rhizosphère. Il détaille le mode d'infection de la bactérie chez la plante et aborde les molécules particulières que sont les opines, leur diversité, leur métabolisme, leur régulation et leur rôle. Cette introduction présente en détail le métabolisme des mannityl-opines et des RFO. Enfin, est développé l'état des connaissances structurales des complexes protéiques impliqués dans la perception et le transport de molécules chez les bactéries à coloration Gram négative.

Les chapitres 2 et 3 décrivent les résultats obtenus respectivement dans l'étude structurale des PBP impliquées dans le transport des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* B6/R10 et l'étude sur l'identification et la caractérisation d'une PBP MeIB responsable de la perception des RFO et du galactinol chez *A. fabrum* C58. Ces deux chapitres sont présentés sous forme d'articles publiés. Dans le dernier chapitre, les résultats obtenus sont discutés et mis en perspective.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Le genre *Agrobacterium*

Les bactéries du genre *Agrobacterium* (Conn 1942) sont des alpha-protéobactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Certaines bactéries de la famille *Rhizobiaceae* comme les *Rhizobium* sont capables d'induire la formation de nodosités sur les plantes légumineuses, permettant la fixation de l'azote atmosphérique chez ces plantes. Les souches du genre *Agrobacterium* sont naturellement présentes dans les sols et sont plus particulièrement retrouvées dans les sols rhizosphériques (sol parcouru par des racines de plantes). Ces bactéries vivent en mode saprophytes, grâce à la décomposition de la matière organique. Certaines espèces d'*Agrobacterium* sont des phytopathogènes de la plante, lorsqu'elles possèdent des éléments génétiques déterminant la virulence.

Les *Agrobacterium* sont des bacilles de coloration Gram négative d'une taille de l'ordre du micromètre (Figure 1). Elles sont pour la plupart des aérobies strictes et sont mobiles grâce à des flagelles. Leur température optimale de croissance est située entre 24 et 28°C.

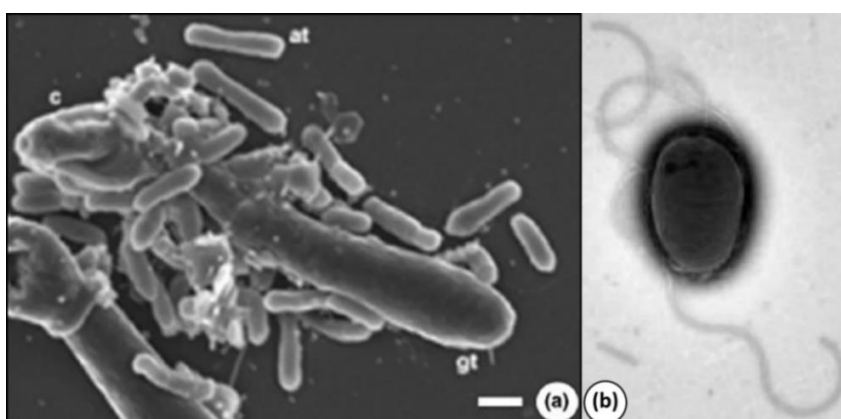


Figure 1 : *Agrobacterium tumefaciens*

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

1.1. Les données taxonomiques

Une première classification du genre *Agrobacterium* a été réalisée en fonction de la pathogénicité des bactéries et des symptômes causés chez les plantes. Six espèces ont été définies : *A. tumefaciens* (Smith and Townsend 1907), responsable de la galle du collet ; *A. rhizogenes* (Riker et al. 1930), renommée *Rhizobium rhizogenes*, responsable du chevelu racinaire (prolifération incontrôlée des racines) ; *A. vitis* (Ophel and Kerr 1990), agent causal de la galle de la vigne ; *A. rubi* (Hildebrand 1940), à l'origine de tumeurs sur des tiges de plantes du

genre *Rubus* ; *A. larrymorrei* (Bouzar and Jones 2001), induisant des tumeurs chez le figuier; et la dernière *A. radiobacter* (Beijerinck and Delden 1902), une souche non pathogène.

Une deuxième classification a été effectuée en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques, les séparant en trois groupes taxonomiques (biovars) (Kesters and de Ley 1984). Le biovar 1 regroupe les souches d'*A. tumefaciens* (Figure 2), le biovar 2 les souches de *R. rhizogenes* et le biovar 3 les souches d'*A. vitis*.

Plus récemment, avec des approches de taxonomie basées sur des expériences d'hybridation ADN-ADN et sur l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de gènes amplifiés (amplification du gène ubiquitaire *recA* par exemple), le genre *Agrobacterium* a été redistribué en dix espèces génomiques distinctes (G1 à G9 et G13) (Popoff et al. 1984; Mougel et al. 2002; Costechareyre et al. 2010). Les souches qui ont été mes modèles d'étude appartiennent au biovar 1 mais sont dans des groupes génomiques différents. *A. tumefaciens* C58, renommée *A. fabrum* (Lassalle et al. 2011), appartient au groupe G8 tandis que les souches *A. tumefaciens* B6 et *A. tumefaciens* R10 appartiennent au groupe G4.

1.2. Le génome d'*A. tumefaciens* C58

La souche d'*A. fabrum* C58 a été complètement séquencée en 2001 (Wood et al. 2001; Goodner et al. 2001). Elle possède quatre réplicons : un chromosome circulaire (CcC58, 2,84 Mb, 2865 gènes), un chromosome linéaire (LcC58, 2,07 Mb, 1924 gènes), un plasmide At (« *Agrobacterium tumefaciens* », pAtC58, 543 kb, 617 gènes) et un plasmide Ti (« Tumor-inducing », pTiC58, 214 kb, 233 gènes) (Figure 3).

Le chromosome circulaire a été décrit comme portant la plupart des gènes impliqués dans les processus biologiques essentiels à la survie de la bactérie (synthèse d'acides nucléiques, traduction, métabolisme des acides aminés,...). Il a une origine de réplication semblable à celle des chromosomes bactériens alors que le chromosome linéaire a une origine de réplication semblable à celle présente sur les plasmides.

Le plasmide At (pAt) ne possède aucun gène indispensable à la survie de la bactérie. Il code pour de nombreux systèmes de transport et il est proposé comme facilitant l'assimilation de molécules nutritives lorsque la bactérie est dans le sol (Platt et al. 2014). Le pAt contient également tous les éléments nécessaires à sa propre conjugaison (Chen et al. 2002). De plus, même s'il n'est pas nécessaire au caractère pathogène de la bactérie, ce plasmide jouerait un rôle dans l'attachement de la bactérie aux cellules végétales, ainsi que sur la taille des tumeurs produites. Cependant, les mécanismes de ces effets n'ont pas été caractérisés (Platt et al. 2014; Morton et al. 2013; Nair, Liu, and Binns 2003; Matthysse, Jaeckel, and Jeter 2008). Ce plasmide est retrouvé dans la majorité des souches *A. tumefaciens* isolées qu'elles soient virulentes ou non (Lassalle et al. 2011).

La présence du plasmide Ti (pTi) dit de virulence, n'est pas essentiel à la vie de la bactérie. En revanche, il est responsable de son caractère pathogène car il porte le fragment d'ADN, appelé ADN-T (ADN transféré), qui est transféré dans la cellule végétale lors de l'infection (Chilton et al. 1977) et les gènes de virulence *vir* codant pour les protéines de virulence Vir impliquées dans le transfert et l'intégration de l'ADN-T dans la cellule hôte. De plus, le pTi porte les opérons nécessaires pour l'acquisition et le métabolisme des éléments nutritifs spécifiques produits par les cellules végétales dans la tumeur, appelés opines. Enfin, ce plasmide possède les systèmes nécessaires à la communication bactérienne médiée par les signaux du *quorum sensing*, ainsi que les éléments nécessaires à sa propre conjugaison.

1.3. Le génomes d'*A. tumefaciens* B6 et R10

Le génome d'*A. tumefaciens* B6 a été séquencé en 2014 et est composé de quatre réplicons comparables à ceux d'*A. fabrum* C58 : un chromosome circulaire de 2,9 Mb (2966 gènes) ; un chromosome linéaire de 2,1 Mb (1960 gènes) ; un pAt de 665 kb (783 gènes) et un pTi de 194 kb (192 gènes). Les plasmides At et Ti de B6 sont différents de ceux de C58. Plusieurs gènes présents sur l'un sont absents sur l'autre (et *vice versa*) et certains opérons sont organisés de manière différente. Le pTiB6 a deux fragments d'ADN-T au lieu d'un, appelés ADN-T_L pour « left » et ADN-T_R pour « right ».

La souche d'*A. tumefaciens* B6 étant difficile à cultiver *in vitro*, j'ai utilisé pour les expériences de croissance la souche *A. tumefaciens* R10, qui au niveau de son pTi est identique à celui de B6 rendant la souche R10 une « *A. tumefaciens* B6-like ».

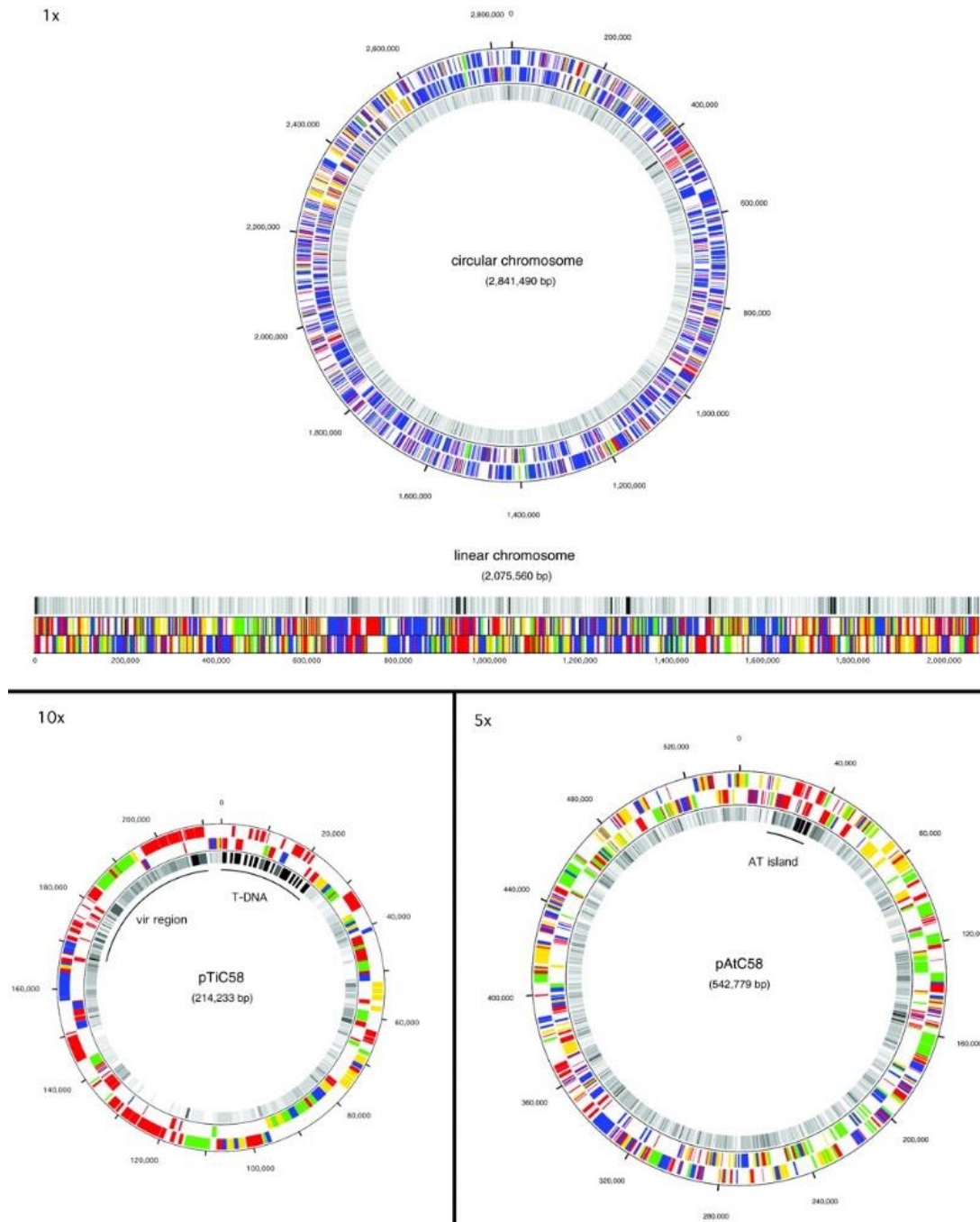


Figure 3 : Structure du génome *A. fabrum* C58

Représentation des quatre réplicons d'*A. tumefaciens* C58 : chromosome circulaire (2865 gènes sur 2,8 Mb), chromosome linéaire (1924 gènes sur 2 Mb), plasmide At (617 gènes sur 543 kb) et plasmide Ti (233 gènes sur 214 kb). Les plasmides ATC58 et TiC58 sont représentés à une échelle X5 et X10 respectivement (Wood et al. 2001).

1.4. Le Quorum-sensing

Le *quorum sensing* (QS) est un système de communication intercellulaire qui permet aux bactéries d'une même population de synchroniser l'expression de certains gènes en fonction de

leur densité cellulaire (Fuqua, Winans, and Greenberg 1994). Ce mode de communication permet d'adopter un comportement coordonné parfois essentiel à leur survie, leur adaptation à certaines conditions environnementales et/ou leur virulence (Waters and Bassler 2005).

Le mécanisme du QS repose sur la synthèse, la diffusion et la perception de molécules chimiques appelées auto-inducteurs. Lorsque la densité de population est faible, ces molécules ne sont pas produites en quantité suffisante dans le milieu pour être perceptible par les membres de la population bactérienne. En revanche, lorsque la densité de la population augmente, la concentration de l'auto-inducteur augmente et devient alors suffisante pour dépasser un seuil critique de détection *via* une liaison à des facteurs de transcription protéiques spécifiques (Fuqua, Winans, and Greenberg 1994; Neilson and Hastings 1979).

2. *A. tumefaciens* : pathogène de plante

2.1. La galle du collet

La galle du collet est une maladie répandue dans le monde entier et causée par une bactérie *A. tumefaciens* (Smith and Townsend 1907). Elle touche une large gamme de plantes, environ 640 espèces réparties dans 93 familles (De Cleene and De Ley 1976), et, affecte le développement et la productivité des plantes.



Figure 4 : Exemples de tumeurs provoquées par *A. tumefaciens*

(gauche) Tumeur (taille 1 cm de diamètre) induite par *A. tumefaciens* au niveau de l'apex d'un plant de tabac cultivée *in vivo* (Haudecoeur et al. 2009); (milieu) Tumeur d'une plante touchée par la galle du collet (Photo extraite de <http://arabidopsis.info/students/agrobacterium/>); (droite) Tumeur de grande taille sur un frêne (Photo extraite de <http://www.genomenewsnetwork.org/>)

Les symptômes se manifestent par l'apparition d'excroissances végétales au niveau du collet (zone de transition entre le système racinaire et la tige) (Figure 4) ou à la base des racines. Une blessure sert de point d'entrée pour *A. tumefaciens* et c'est à partir de ce point que la tumeur se développe. La taille et la couleur des tumeurs varient en fonction de l'espèce infectée, de la partie de la plante infectée et au cours du temps. En vieillissant, les tumeurs grossissent et prennent une teinte brun-noirâtre, elles durcissent et se craquellent pouvant être la cible de micro-organismes pathogènes ou opportunistes tels que *Phytophthora*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*..., qui

participent au dépérissement de la plante infectée. Des tumeurs secondaires peuvent aussi se développer en différents points du système racinaire perturbant la circulation de la sève.

2.2. Le cycle infectieux d'*A. tumefaciens*

Le mécanisme infectieux des souches d'*A. tumefaciens* pathogènes, c'est-à-dire possédant le plasmide Ti, met en jeu un processus de transgénèse et induit l'apparition d'une tumeur chez la plante (Chilton *et al.* 1977). Ce transfert naturel d'information génétique est également à l'origine de la formation du chevelu racinaire et de la tumeur de la galle du collet de la vigne qui sont induits par *R. rhizogenes* et *A. vitis*. A ce jour, ce sont les seuls exemples de transferts horizontaux entre bactéries et eucaryotes.

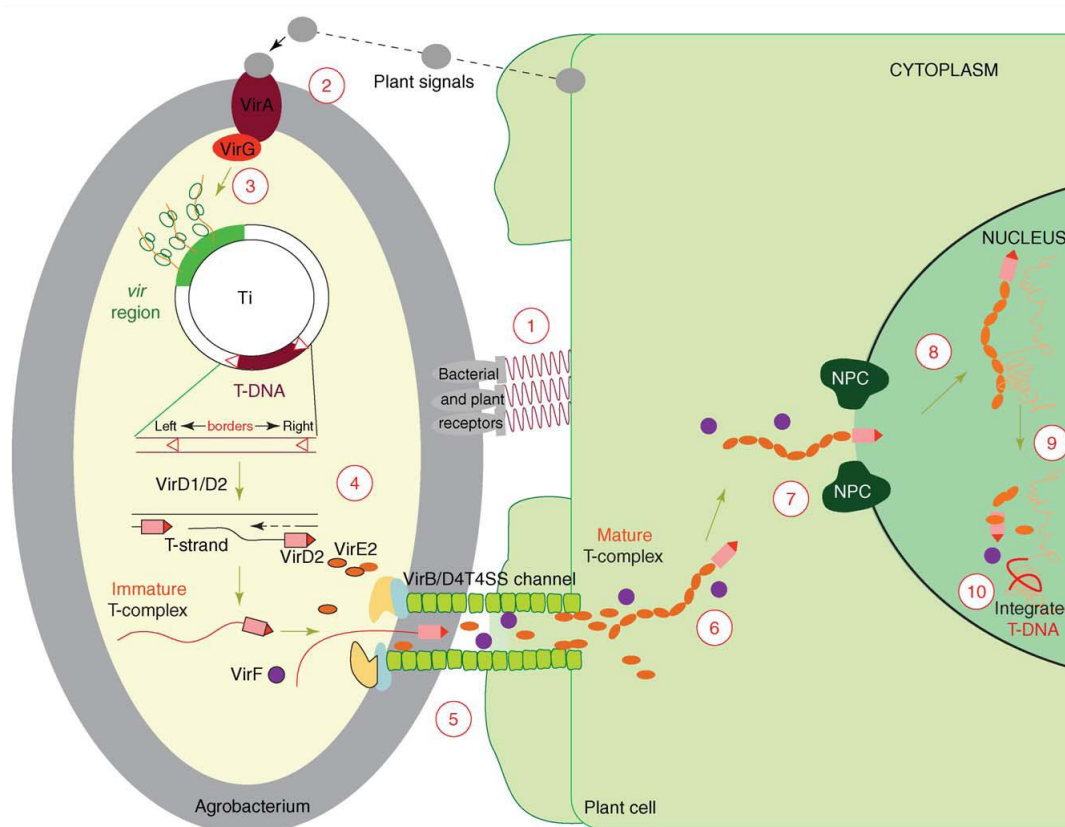


Figure 5: Représentation schématique du cycle infectieux d'*A. tumefaciens*

(1) Attachement de la bactérie à la surface de la cellule végétale, (2) Activation des gènes *vir* par des signaux de plante, (3) Excision de l'ADN-T, (4) Formation du complexe VirD2/ADN-T, (5) Transfert du complexe VirD2/ADN-T dans la cellule hôte au travers du transporteur T, (6) Transport du complexe T jusqu'au noyau de la cellule végétale, (7) Prise en charge du complexe T par des dynéines, (8) Intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale, (9). (Tzfira and Citovsky 2006)

Chez *A. tumefaciens*, le mécanisme de transgénése fait intervenir deux groupes de gènes localisés à des endroits différents et régulés de façon distincte. Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* se décompose en trois étapes : 1- la reconnaissance et l'attachement de la bactérie à l'hôte, 2- le transfert et l'intégration de l'ADN-T du plasmide de virulence dans le génome de la plante, 3- l'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur chez la plante et la production de nutriments spécifiques dans la plante pour les bactéries vivant dans les tumeurs. Les tumeurs produites servent de niche écologique pour les agrobactéries (Figure 5).

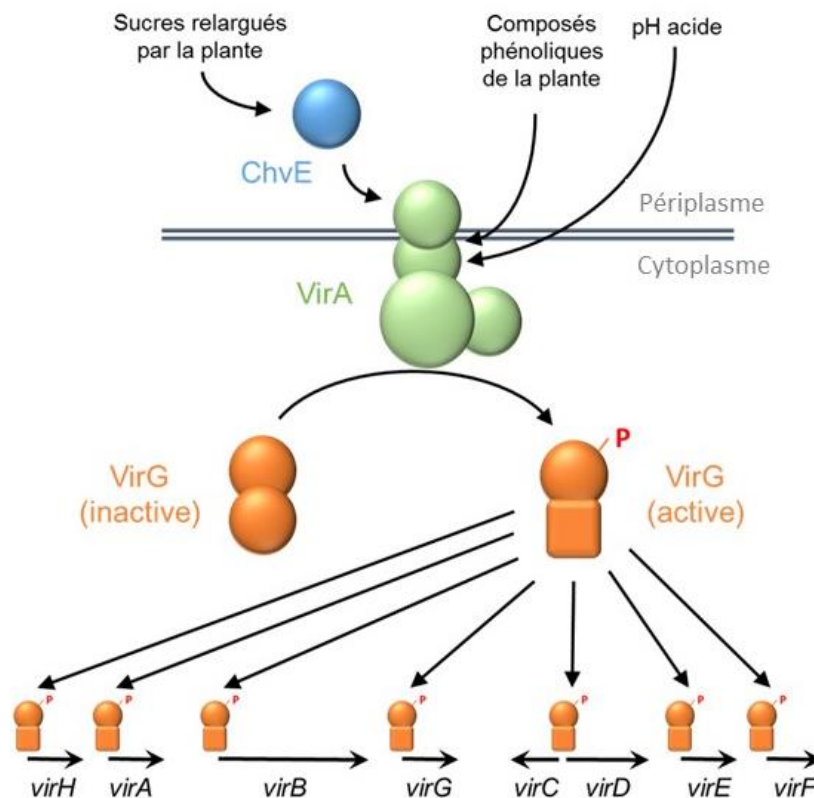


Figure 6 : La régulation des gènes de virulence par le système VirA/VirG et ChvE

VirA est une histidine kinase transmembranaire qui détecte les composés phénoliques, les sucres et l'acidité produits par la plante. *ChvE* est une protéine périplasmique fixant des sucres qui établit un contact avec la partie périplasmique de *VirA*, ce qui accroît son activité. *VirA* phosphoryle le régulateur *VirG*, qui active alors la transcription des gènes *vir* (Brencic and Winans 2005).

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgénése. Il fait intervenir trois acteurs moléculaires : la PBP (Periplasmic Binding Protein ou protéine périplasmique de liaison) *ChvE* et le système régulateur à deux composants *VirA/VirG* (Stachel and Zambryski 1986) (Figure 5, étape 2 et Figure 6). Ces protéines répondent à des signaux végétaux : des composés phénoliques dérivés du syringol (Stachel and Zambryski 1986),

certain monosaccharides (*Ankenbauer and Nester 1990*) et le pH acide (entre 5 et 5,5) (*Charles and Nester 1993*). L'acidité dans le milieu est détectée par le système ChvG-ChvI qui initie la transcription du régulateur VirG. ChvE fixe des sucres sécrétés par la plante et interagit avec VirA (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie) (*Shimoda et al. 1993*). L'interaction ChvE/VirA augmente la sensibilité de VirA pour les composés phénoliques et pour les bas pH. VirA est activée et s'autophosphoryle lors de son interaction avec les composés phénoliques (*Lee et al. 1995*). Puis, VirA phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique VirG qui se fixe sur les régions promotrices des gènes *vir* et active leur transcription (*Brencic and Winans 2005*). Cette étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert de l'ADN-T.

2.2.1. Le transfert de l'ADN-T

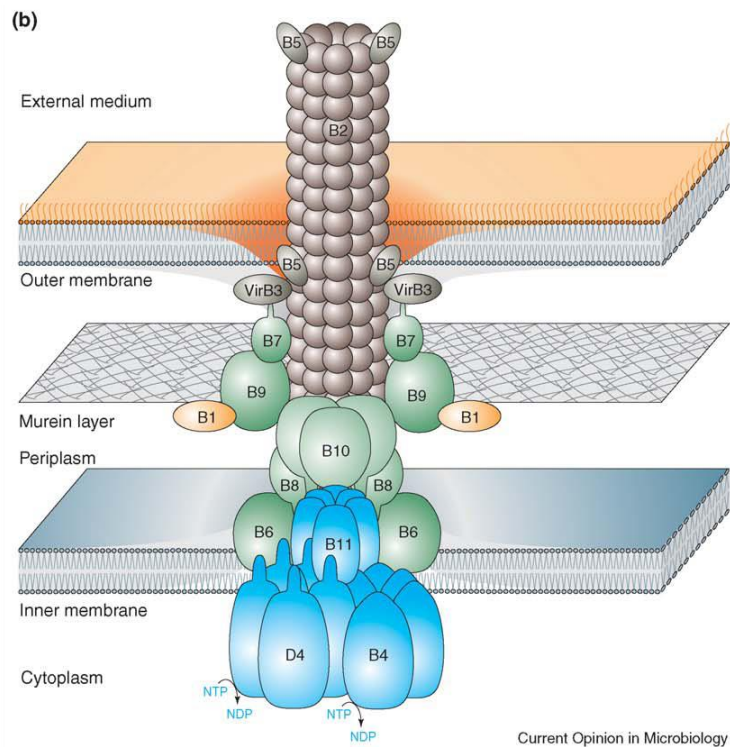


Figure 7 : Représentation du système de transport de l'ADN-T

Modèle présentant l'organisation du système de sécrétion de type IV (SST4) impliqué dans le transfert de l'ADN-T du cytoplasme de la bactérie dans la cellule-hôte (*Backert and Meyer 2006*).

L'expression des gènes *vir* conduit à l'excision de l'ADN-T (Figure 5, étape 3). Pour cela, les protéines VirD1 (hélicase) et VirD2 (endonucléase) agissent spécifiquement pour couper un fragment du pTi (*Filichkin and Gelvin 1993*). Grâce à son activité hélicase, la protéine VirD1 sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine VirD2 quant à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. Après excision,

VirD2 reste fixé covalamment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T (*Gelvin 2003*) (Figure 5, étape 4). Le complexe VirD2/ADN-T, appelé brin-T, se sépare du reste du plasmide, et s'oriente de manière à être transféré dans la cellule hôte pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

Le brin-T ainsi que quatre protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférés dans la cellule végétale par un système de sécrétion de type IV (SST4) qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte (*Vergunst et al. 2005; Christie and Cascales 2005*) (Figure 5, étape 5). Le SST4 est composé d'un assemblage de 12 protéines : 11 protéines VirB et la protéine VirD4 (Figure 7). La protéine VirB1 hydrolyse localement le peptidoglycane de la membrane bactérienne, puis les autres protéines s'assemblent autour de VirD4 pour former le transporteur T. Le complexe multiprotéique formé est composé en trois sous-groupes. Le pilus T composé principalement de VirB2 et des ATPases VirB4, VirB11 et VirD4 fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage du transporteur T et au transfert du brin T. Les protéines VirB6 à VirB10 constituent le canal de translocation traversant les membranes bactériennes. Enfin, les protéines VirB2, VirB5 et VirB7 sont impliquées dans le contact bactérie/ cellule végétale (*Backert and Meyer 2006*).

A son entrée dans la cellule végétale, le brin-T est recouvert de protéines VirE2 afin de le protéger des nucléases végétales (*Gelvin 1998*) et de lui conférer la structure nécessaire pour son transport jusqu'au noyau de la cellule hôte (Figure 5, étape 6). On le nomme complexe-T. Pour le moment, aucune donnée expérimentale permet de déterminer précisément où se forme le complexe-T.

2.2.2. L'importation du complexe T dans le noyau

Dans le cytoplasme de la cellule végétale, l'adressage du complexe-T vers le noyau fait intervenir des protéines cargos de l'hôte, telles que la dynéine (*Salman et al. 2005*) (Figure 5, étape 7). Pour faciliter l'entrée du complexe-T dans le noyau, des protéines de la famille des importines α et des cyclophilines se fixent sur les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) présentes sur VirD2 et VirE2 (*Howard et al. 1992; Ballas and Citovsky 1997*). En réponse au stress induit par l'entrée des protéines dans la cellule végétale, la protéine effectrice de plante VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1) est activée et interagit avec VirE2 (*Djamei et al. 2007*). VIP1 est ensuite recrutée dans le noyau où elle y transporte le complexe VirE2/ADN-T.

2.2.3. L'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante se fait de façon aléatoire, avec une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine (*Brunaud et al. 2002; Li et al. 2006; Szabados et al. 2002*). Actuellement, deux modèles sont proposés (*Tzfira et*

al. 2004) (Figure 5, étape 8). Le premier modèle repose sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin et les régions du génome de la plante où il y aurait une « micro-homologie ». La présence de VirD2 sur la partie 5' du brin T permettrait la coupure de l'ADN végétal et ainsi l'intégration du brin d'ADN-T. Au moment de l'intégration du brin d'ADN-T, VirD2 et VirE2 sont décrochés permettant ainsi la synthèse du brin complémentaire de l'ADN-T et l'incorporation d'une copie double brin dans le génome de la plante (Tinland and Hohn 1995). Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologe (NHEJ : non homologous end-joining) suite à des cassures de l'ADN végétal (Chilton and Que 2003). Ceci suppose que le brin d'ADN-T est répliqué pour former un double brin T qui s'intègre au niveau d'une cassure dans le génome de la cellule végétale.

Avant ou pendant l'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal, celui-ci libère les protéines VirD2 et VirE2 ainsi que les effecteurs de plante, qui sont éliminés par la voie de dégradation protéasomale (Schrammeijer et al. 2001) (Figure 8).

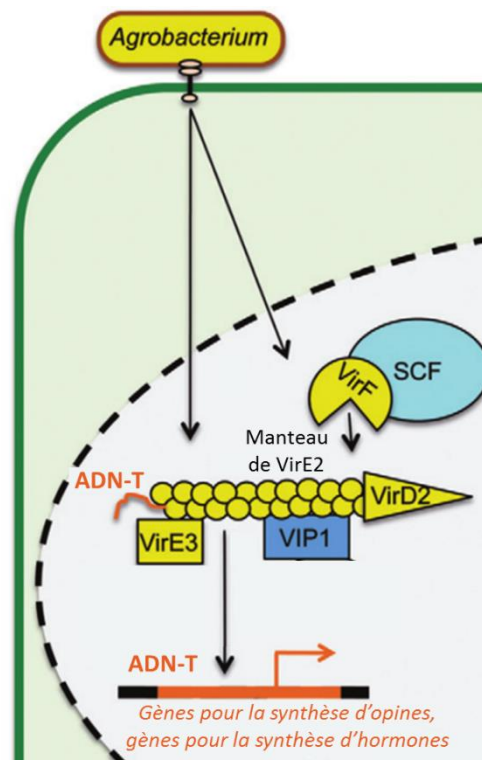


Figure 8 : Mécanisme d'intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale et les protéines impliquées dans ce processus

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

2.2.4. L'expression des gènes portés par l'ADN-T

Une fois intégrés dans le génome de la plante hôte, les gènes portés par l'ADN-T sont transcrits et traduits grâce à la machinerie cellulaire de la plante. Certains gènes codés par l'ADN-T permettent la synthèse dans la plante d'hormones végétales. Parmi eux, *iaaM*, *iaaH* et *ipt* participent à la synthèse des hormones végétales de la famille des auxines et des cytokinines, connues pour réguler la prolifération, l'élongation et la différenciation des cellules végétales (Zambryski, Tempe, and Schell 1989; Veselov et al. 2003). L'expression de ces oncogènes de l'ADN-T aboutit à une accumulation des phytohormones, provoquant une dérégulation hormonale qui induit la prolifération anarchique des cellules et la formation d'une tumeur (Veselov et al., 2003). Les autres gènes situés sur l'ADN-T codent pour des protéines qui permettent la synthèse de composés carbonés particuliers, appelés opines, qui seront décrites dans le paragraphe suivant.

2.3. Les opines

L'expression des gènes portés par le fragment ADN-T bactérien permet la synthèse d'opines dans la tumeur de plante. Ces molécules sont des nutriments spécifiques d'*A. tumefaciens* et certaines ont en plus un rôle de molécules signal importantes pour le transfert du pouvoir de virulence (Dessaux, Petit, and Farrand 1998).

2.3.1. L'origine des opines chez *A. tumefaciens*

La première opine, l'octopine, fut découverte en 1927, dans du tissu musculaire de poulpe (*Octopus octopodia*) (Morizawa 1927). Par la suite, d'autres molécules du même type furent découvertes dans les galles de plantes et en 1977, le nom « opine » (du grec opos : « jus de plante ») leur fut attribué. Les opines sont des composés de faible poids moléculaire, trouvées principalement dans les tumeurs des plantes atteintes de la galle du collet, ou dans les hyperplasies des plantes atteintes du chevelu racinaire. On en trouve également dans certaines plantes qui semblent avoir intégrées de manière définitive un ADN-T dans leur génome, comme certaines espèces de tabac (Chen et al. 2014), et certains champignons (Fushiya, Matsuda, and Yamada 1996). Les opines sont aussi présentes dans les tissus de bon nombre d'invertébrés marins, où elles sont produites en condition d'anoxie ou d'hypoxie à partir du pyruvate, comme moyen alternatif à la production de lactate (Harcet, Perina, and Plese 2013). Il existe aussi une opine chez les eucaryotes supérieurs, la saccharopine, qui est un intermédiaire important dans la voie de dégradation de la lysine (Arruda et al. 2000). Une cinquantaine de molécules correspondant à des opines ont été identifiées et classées par famille.

2.3.2. Le concept d'opine

La production d'opines est associée à l'apparition de tumeurs. La tumeur est vue comme une niche à opines qui confère un avantage sélectif aux bactéries possédant le pTi pour se multiplier, répliquer le plasmide et le disséminer. La formation et le fonctionnement de cette niche sont appelés concept d'opine. Ce concept est appuyé par la présence sur le pTi d'opérons de dégradation spécifiques de chaque opine dont la bactérie induit la synthèse dans la tumeur (Dessaux, Petit, and Farrand 1998). La présence sur les plasmides Ti de gènes impliqués à la fois dans la synthèse et la dégradation des opines, apparait comme une véritable marque de fabrique de l'interaction entre *A. tumefaciens* et son hôte. Il a été proposé que cette présence d'opines dans la tumeur et la capacité de la bactérie à les dégrader confèrent un avantage sélectif aux populations d'*A. tumefaciens* colonisant les tumeurs et potentiellement en compétition avec d'autres bactéries. Plusieurs expériences, utilisant parfois des plantes génétiquement modifiées pour produire des opines et des souches bactériennes capables ou incapables d'assimiler les opines, ont permis d'avancer sur le concept d'opine en montrant que la croissance des souches utilisant des opines était favorisée au contact des plantes transgéniques (Savka and Farrand 1997; Dessaux, Petit, and Farrand 1998). La validité de ce concept d'opine a été également démontré in planta (Lang et al. 2014). Dans le concept d'opine, l'acquisition des opines est primordiale pour le maintien et la propagation d'un type de plasmide Ti.

2.3.3. La classification des plasmides Ti

Les pTi les mieux caractérisés portent les mêmes groupes d'opérons : une origine de réplication ORI, les gènes de virulence vir, l'ADN-T contenant les gènes permettant la synthèse d'hormones de croissance végétales ainsi que des opines, des opérons permettant le transfert conjugatif, et enfin les gènes d'import et de catabolisme des opines synthétisées par les cellules de plante transformées. Cependant, les pTi diffèrent d'une souche à une autre, notamment au niveau de leurs gènes de métabolisme des opines. Leur structure globale est une structure mosaïque qui alterne des régions conservées (les gènes vir ou les gènes tra) et des régions variables (opérons du métabolisme des opines) (Figure 9). Cette complexité rend la classification des différents pTi difficile.

Chez *A. tumefaciens* plus d'une vingtaine d'opines ont été répertoriées (Dessaux, Petit, and Farrand 1998) et chaque pTi permet la synthèse et le catabolisme de quelques opines. Pour l'instant, les pTi ont été classés en fonction de la principale opine produite dans les tumeurs (Petit, David, and Dahl 1983). Ainsi chez la souche C58, le plasmide de type nopaline porte les gènes de synthèse de la nopaline sur son fragment d'ADN-T et ceux du catabolisme de la nopaline sur sa partie non transférée. Ce pTi possède aussi les gènes de synthèse et de catabolisme des agrocinopines A et B. Chez la souche *A. tumefaciens* B6, le pTi de type octopine possède les gènes

de synthèse et de dégradation de l'octopine et des quatre mannityl-opines. Le tableau 1 montre les différents types de pTi répertoriés et les opines dont ils possèdent les gènes de métabolisme.

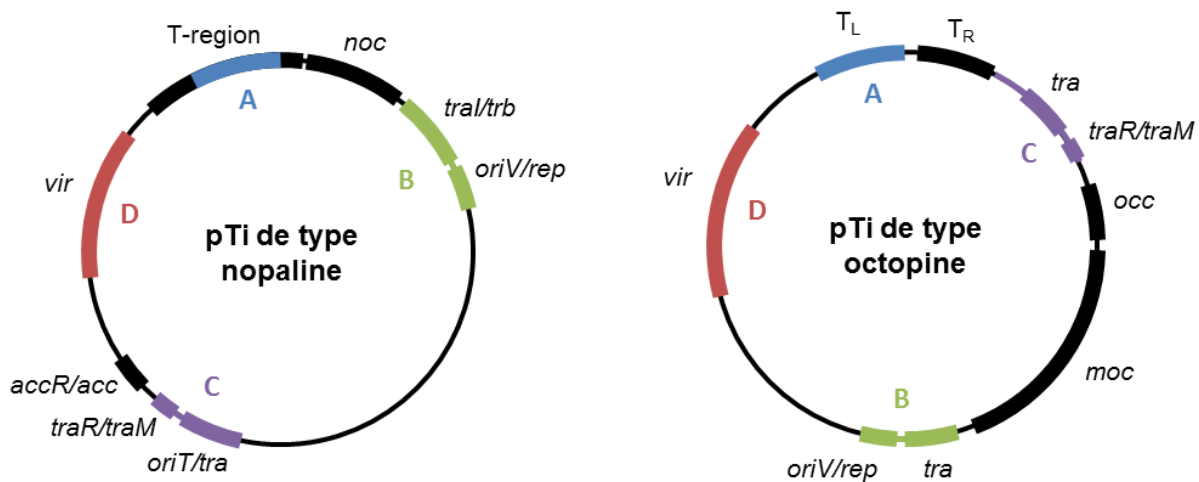


Figure 9 : Organisation fonctionnelle des plasmides Ti de type octopine et de type nopaline

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

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

Tableau 1 : Classification des plasmides Ti basée sur une opine.

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

Type de plasmide	Plasmides	Opines synthétisées
Agropine	pTiBo542	mannityl-opines, agrocinoïnes C+D, leucinoïne, leucinoïne-lactame
Chrysoïne	pTiChry5 pTiAnt4	chrysoïne, DFG, DFGA, désoxyfructosyl-oxoproline chrysoïne, DFG, DFGA, désoxyfructosyl-oxoproline, succinamoïne, leucinoïne
Cucumopine	pTiAB3 pTiAg57 pTiK305 pTiK308 pTiTm4	cucumopine, cucumopine-lactame, octopine cucumopine, cucumopine-lactame, octopine cucumopine, cucumopine-lactame, octopine cucumopine, cucumopine-lactame, octopine cucumopine, cucumopine-lactame, octopine
Lippia	pTi AB2/73	agrocinoïnes C+D*
Nopaloïne	pTiC58 pTiK27 pTiT37 pTiIBV7	nopaloïne, acide nopalinique, agrocinoïnes A+B nopaloïne, acide nopalinique, agrocinoïnes A+B nopaloïne, acide nopalinique, agrocinoïnes A+B nopaloïne
Octopine	pTi15955 pTiA6 pTiA6NC pTiB6 pTiR10	mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine mannityl-opines, octopine, acide octopinique, lysopine, histopine
Succinamoïne	pTiAT181 pTiEU6 pTiT10/73	succinamoïne, succinamoïne-lactame, nopaloïne* succinamoïne, succinamoïne-lactame, nopaloïne* succinamoïne, succinamoïne-lactame, nopaloïne*

2.3.4. La classification des opines utilisées par le genre *Agrobacterium*

Les opines sont classées en deux grands groupes selon leur composition chimique (Figure 10). Le premier groupe, le plus fourni, est composé de dérivés d'amines secondaires issues de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un céto-acide. Il comporte des opines comme l'octopine, la nopaloïne, l'agropine et leurs dérivés. Le second groupe contient les agrocinoïnes qui sont des phosphodiesteres de sucres. Toutes les *Agrobacterium* ne catabolisent pas les mêmes opines. En effet, chaque opine est spécifique et utilisable seulement par la souche portant les gènes de synthèse correspondants sur le plasmide Ti (Montoya et al. 1977; Dessaux, Guyon, and Petit 1988). Dans la suite de ce chapitre, je ne présenterai que les principales familles d'opines composées d'acides aminées.

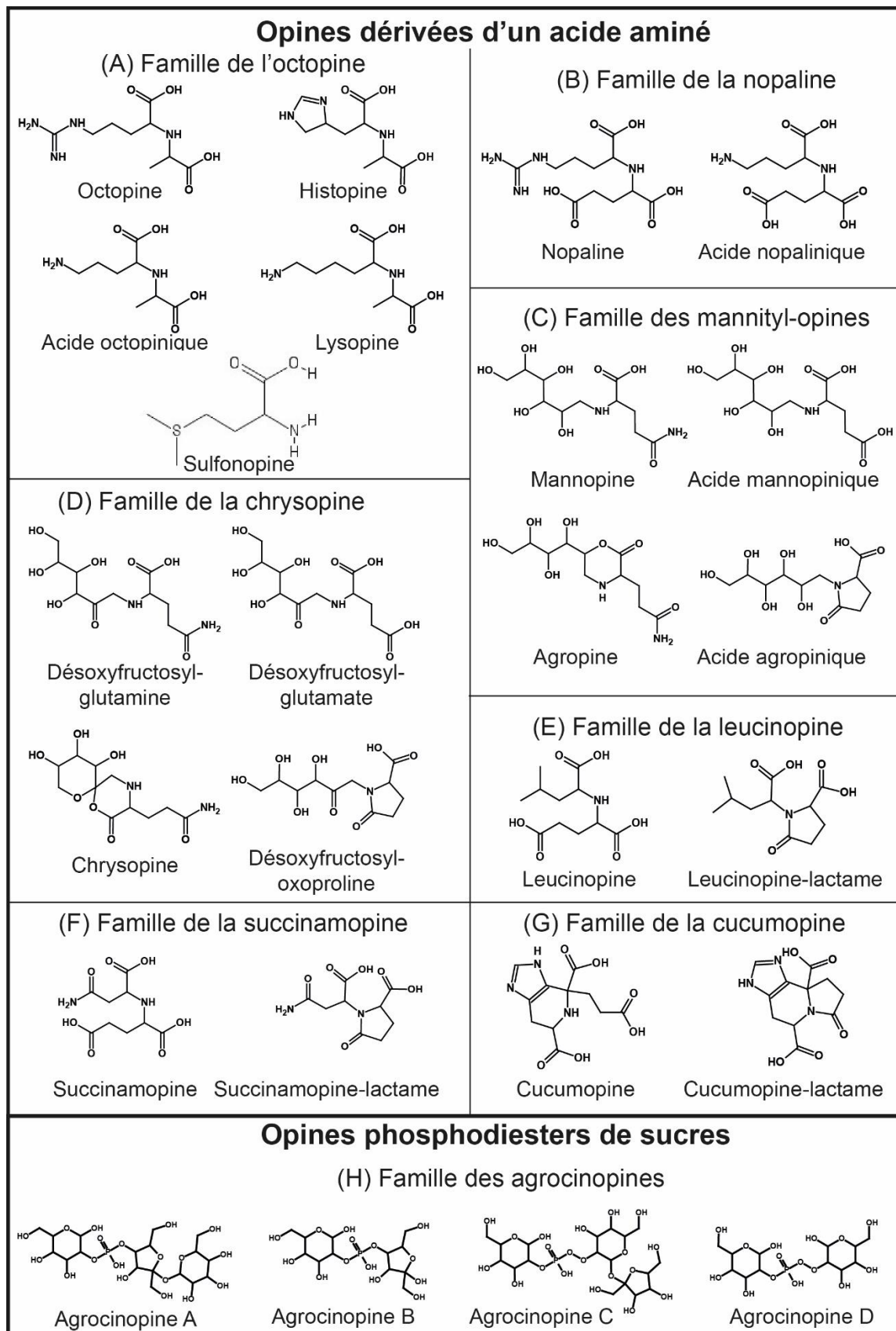


Figure 10 : Structure chimique des opines induites par le genre *Agrobacterium*

2.3.3.1. La famille de l'octopine

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

D'autres opines dérivées de l'octopine, trouvées dans les galles induites par les agrobactéries possédant un pTi de type octopine, font partie de cette famille. Ces opines sont la lysopine, l'acide octopinique et l'histopine (*Biemann et al. 1960; Ménagé and Morel 1965; Kemp 1977*). Elles sont issues de la condensation de pyruvate et, respectivement, de lysine, d'ornithine et d'histidine, catalysée par la même enzyme (*Hack and Kemp 1977*). Une dernière opine contenant une molécule de soufre la sulfomopine appartient à cette famille et a été découverte dans une seule souche d'*Agrobacterium* de type octopine (*Flores-Mireles, Eberhard, and Winans 2012*).

2.3.3.2. La famille de la nopaline

La nopaline a été découverte dans des extraits de galles (*Goldman, Thomas, and Morel 1969*). A ce jour, cette opine n'est retrouvée que dans les tumeurs végétales induites par les souches d'*A. tumefaciens* possédant un pTi de type nopaline. Elle est issue de la condensation enzymatique d'une arginine avec un α -cétoglutarate. Elle est instable dans les tumeurs et peut prendre une forme lactamisée (c'est-à-dire une forme cyclisée par une liaison amine intramoléculaire), nommée pyronopaline (*Hall, Schrimsher, and Taylor 1983*). La dernière opine de cette famille est l'acide nopalinique (ou ornaline), issue de la condensation d'une ornithine et d'un α -cétoglutarate.

2.3.3.3. La famille de la chrysopine

Cette famille est constituée de quatre membres : la désoxy-fructosyl-glutamine (DFG) ou santhopine, le désoxy-fructosyl-glutamate (DFGA), la chrysopine et la désoxy-fructosyl-oxoproline (DFOP), produites par les plantes infectées par les souches possédant les plasmides pTiChry5 ou pTiAnt4 (*Chilton, Stomp, and Beringue 1995*).

Chez les agrobactéries, la DFG est issue de la condensation de fructose et de glutamine par une conjugase, et sert d'intermédiaire pour la formation de la mannopine et de l'agropine. C'est également un composé d'Amadori, c'est-à-dire un produit naturel issu d'un réarrangement spontané d'une base de Schiff, provenant d'une des premières étapes de la réaction de Maillard, réaction impliquée dans le brunissement des composés organiques. Les autres opines de la

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

2.3.3.4. La famille des mannityl-opines

La famille des mannityl-opines est composée de quatre membres : l'agropine, l'acide agropinique, la mannopine et l'acide mannopinique. L'agropine a été la première découverte dans des extraits de tumeurs des souches A6, B6 et A66 en 1978 (Firman and Fenwick 1978), suivi de l'acide agropinique, isolé des mêmes extraits en 1980 (Coxon, Davies, and Fenwick 1980). La découverte de la mannopine et de l'acide mannopinique date de 1982 (Tate, Ellis, and Kerr 1982), isolés à partir de tumeurs induites par la souche A281, possédant un pTi542 de type agropine. Les mannityl-opines ont été trouvées jusqu'à présent uniquement dans les excroissances de plante induites par le genre *Agrobacterium*. Leurs gènes de synthèse, de transport et de dégradation sont présents sur les pTi de type octopine et ceux de type agropine.

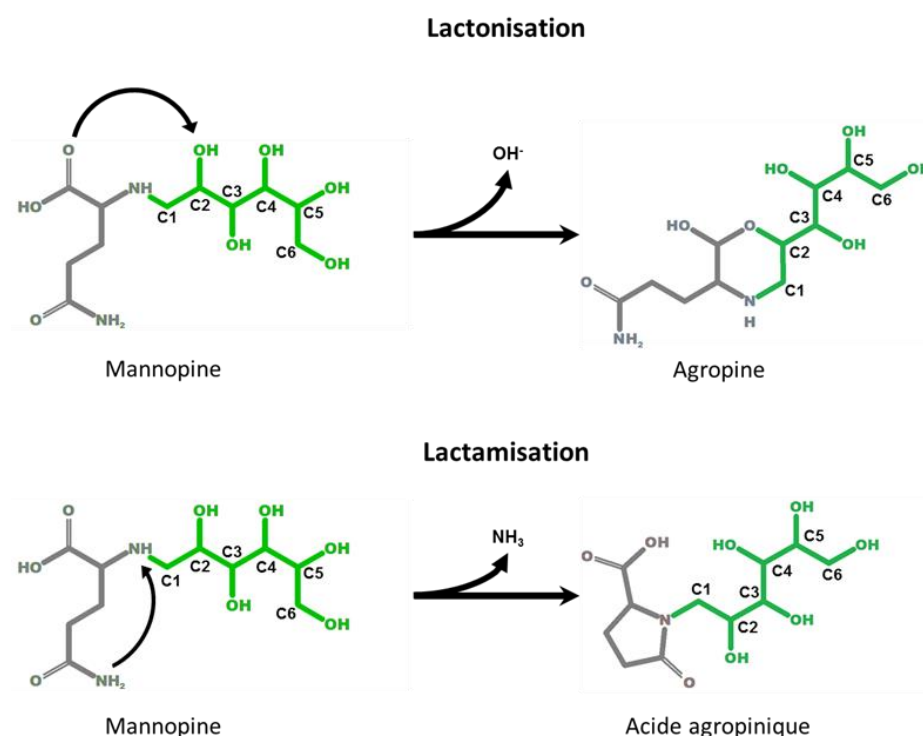


Figure 11 : Réactions simplifiées de lactonisation (haut) et de lactamisation (bas) de la mannopine

Les parties grises correspondent à l'acide aminé et les parties vertes à la partie sucre de l'opine.

La mannopine, qui est la 1-déoxymannosyl-glutamine, n'est pas issue d'une condensation entre un mannose et une glutamine et ne résulte pas d'une synthèse directe en une seule étape. Curieusement, elle est formée à partir d'un précurseur qui est aussi une opine,

la DFG (désoxyfructosyl-glutamine ou santhopine), qui fait partie de la famille de la chrysopine, détaillée plus bas. Il en est de même pour l'acide mannopinique (un acide 1-désoxymannosyl-glutamique) dont le précurseur est le désoxyfructosyl-glutamate (DFGA). L'agropine est une forme lactonisée de la mannopine (c'est-à-dire une forme cyclisée par estérification intramoléculaire, entre le carboxylate et l'hydroxyle du C2 de la partie sucre de la mannopine), tandis que l'acide agropinique est une forme lactamisée de la mannopine, l'acide mannopinique et l'agropine (Figure 11).

2.3.5. Le métabolisme des mannityl-opines

Les mannityl-opines sont les seules opines dont la synthèse n'est pas réalisée en une seule étape de condensation. A l'inverse des autres opines dont une famille entière peut être reconnue par un même transporteur, chaque mannityl-opine serait associée avec un système de transport dédié.

La synthèse de la mannopine fait intervenir les enzymes Mas2, qui conjugue fructose et glutamine pour former de la DFG, puis Mas1 qui réduit la DFG en mannopine. La synthèse de l'acide mannopinique se fait vraisemblablement de la même manière, sauf que Mas2 utilise le glutamate au lieu de la glutamine, pour former du DFGA. L'agropine semble formée après action de la cyclase Ags (agropine synthase), parfois annotée Mas0, par lactonisation de la mannopine, bien que l'activité de cette enzyme n'ait encore jamais été vérifiée. Ces trois enzymes sont codées par les gènes du même nom, situés sur la partie transférée des pTi de type octopine et agropine (Figure 12).

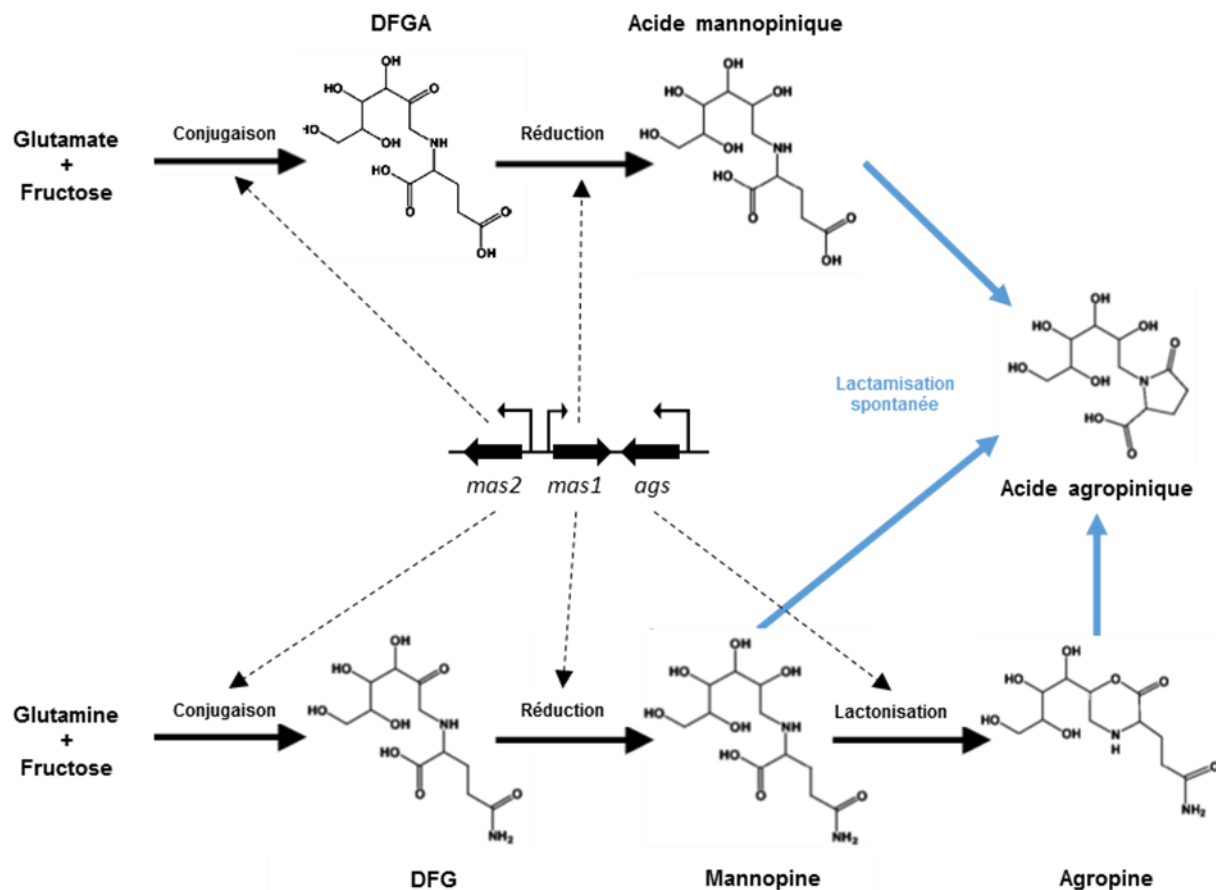


Figure 12 : Synthèse des mannityl-opines dans la cellule végétale transformée

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

Une fois synthétisées, les opines entrent dans le périplasma *via* des porines non spécifiques. Des études génétiques réalisées dans la région permettant le catabolisme des mannityl-opines ont mis en évidence deux voies cataboliques : l'une permettant le transport et la dégradation non spécifiques de la mannopine, de l'acide mannopinique et de l'agropine, l'autre impliquant un transport et une dégradation spécifiques de l'acide mannopinique et de l'acide agropinique (Dessaux, Tempe, and Farrand 1987; Dessaux et al. 1988; Hong et al. 1993) (Figures 13 et 14).

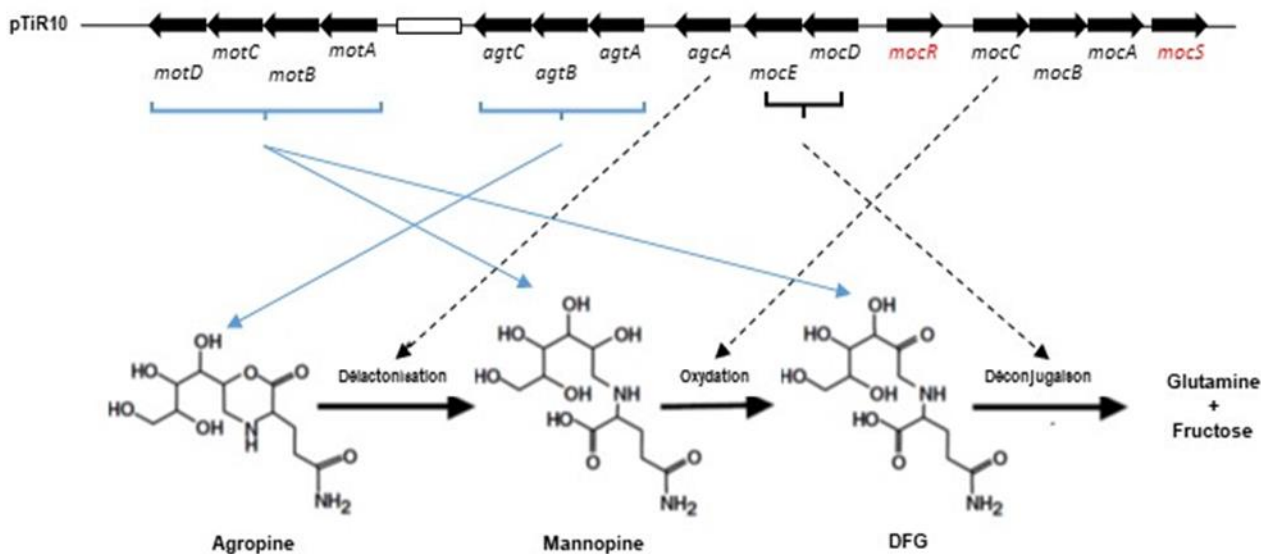


Figure 13 : Opérons responsables du transport et du catabolisme de la mannopine, de l'agropine et de la désoxyfructosyl-glutamine (DFG) sur le pTi R10

Les transporteurs sont symbolisés par des flèches bleues et les enzymes par des flèches pointillées noires. Chez R10, les protéines AgtABC importent l'agropine dans le cytoplasme de la bactérie. Les protéines MotABCD importent la mannopine et le DFG. AgcA délactonise l'agropine en mannopine. MocC catalyse l'oxydation de la mannopine en DFG. MocD et MocE déconjuguent la désoxyfructosyl-glutamine en glutamine et fructose. MocR et MocS, en rouge, sont les régulateurs transcriptionnels de certains de ces opérons. Adapté de Baek et al., 2005.

La voie catabolique proposée non spécifique fait intervenir la région *moc* du pTi, composée des opérons *mot*, *moc* et *agt*, et des gènes *agcA*, *mocR* et *mocS* (aussi annoté *mocR'*) (Figure 13). La protéine périplasmique de liaison (PBP) MotA fixe la mannopine et le DFG (Marty et al. 2016) et fixerait l'acide mannopinique dans le périplasm et apporterait chaque ligand au transporteur ATP-Binding Cassette (ABC) MotBCD associé à MotA pour l'importer dans le cytoplasme. De même, la PBP AgtB interagirait avec l'agropine pour l'amener au transporteur ABC AgtAC associé. Une fois dans le cytoplasme de la bactérie, la mannopine cyclase AgcA hydrolyserait l'agropine en mannopine, qui serait ensuite oxydée par MocC en DFG. De manière surprenante, MocC ne transformerait pas l'acide mannopinique en DFGA (Kim, Chilton, and Farrand 1996). Enfin, MocD et MocE catalyseraient la déconjugaison de la DFG (et peut-être de la DFGA) en fructose et glutamine (ou fructose et glutamate). Les gènes *mocA* et *mocB*, situés en aval de *mocC*, codent respectivement des enzymes homologues à une 6-phosphoglucose deshydrogénase et une 6-phosphogluconate déshydratase (Kim and Farrand 1996). MocR réprimerait la transcription de *mocC* et *mocDE*, répression levée en présence d'agropine (Jung, Baek, and Lee 1999). MocS semble aussi réprimer la transcription de ces gènes, mais de manière beaucoup moins efficace que MocR. Ceci est peut-être dû à une régulation très fine de ces opérons pour éviter une dépense énergétique trop grande en cas d'absence, ou de faibles

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

La voie catabolique proposée spécifique fait intervenir la région *aga/moa* du pTi, composée des opérons *moaBCDA*, *agaDBCA*, *agaEFG* et du gène *moaR* (Figure 14). Selon les analyses génomiques et fonctionnelles de Lyi et collaborateurs (Lyi, Jafri, and Winans 1999), la PBP AgaA fixe l'acide agropinique dans le périplasme de la bactérie pour l'apporter au transporteur AgaBCD afin d'importer l'opine dans le cytoplasme. La PBP MoaA fixe l'acide mannopinique pour l'apporter au complexe MoaBCD afin de permettre sa translocation à travers la membrane plasmique. AgaG et AgaF catalyseraient ensuite la dé lactamisation de l'acide agropinique en acide mannopinique, qui serait lui-même directement déconjugué en mannose et glutamate par AgaE. MoaR est le répresseur transcriptionnel des trois opérons codant pour ces protéines. Sa répression serait levée par l'acide mannopinique et l'acide agropinique.

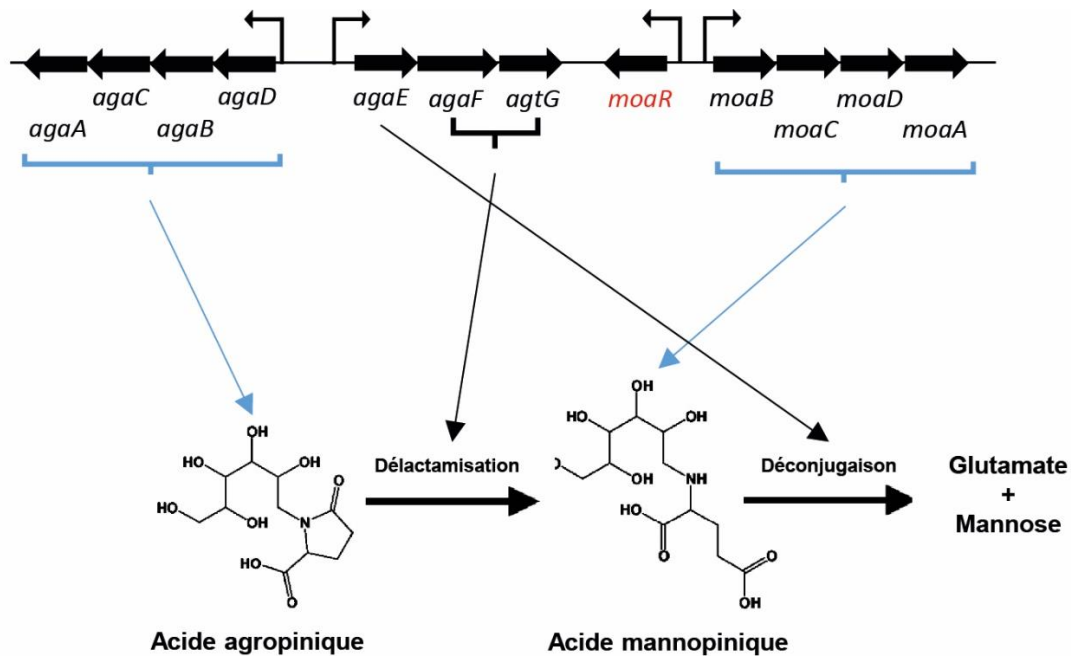


Figure 14 : Opérons responsables du transport et du catabolisme de l'acide mannopinique et de l'acide agropinique

L'ensemble des protéines AgaDBCA transporte l'acide agropinique du périplasme dans le cytoplasme. Les protéines MoaBCDA importent l'acide mannopinique. AgaF et AgaG dé lactament l'acide agropinique en acide mannopinique. AgaE dé conjugue l'acide mannopinique en glutamate et mannose. MoaR, en rouge, est le régulateur transcriptionnel de ces opérons.

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

protéines de l'autre voie de catabolisme, tout comme les enzymes de dégradation avec les enzymes de la voie de synthèse.

3. *A. tumefaciens* : vie dans la rhizosphère

3.1. La rhizosphère

3.1.1. Définition et nature de la rhizosphère

La rhizosphère est le compartiment du sol correspondant aux racines et aux quelques millimètres entourant les racines des plantes où a lieu un ensemble de processus écologiques et biologiques mettant en jeu les racines, la structure du sol et les conditions environnementales. Le terme rhizosphère fut employé la première fois en 1904, pour qualifier la zone autour des racines des légumineuses où il y avait une forte densité et de nombreuses activités de microorganismes. Ces dernières sont influencées par les composés libérés par la plante (*Hiltner. 1904*).

La plante au niveau des racines libère de 15 à 40% de carbone issu de la photosynthèse (*Hütsch, Augustin, and Merbach 2002*). Ces éléments carbonés sont regroupés sous le terme de rhizodépôts. Ils sont composés des exsudats racinaires, de sécrétions de mucilage et de cellules sénescents (*Lynch and Whipps 1990; Nguyen 2003*) (Figure 15). Cette ressource trophique favorise la diversité et l'activité des microorganismes pouvant la dégrader (*Hinsinger et al. 2009*). Ceci permet à la rhizosphère d'être l'habitat microbien le plus actif du sol, avec pour un gramme de sol, entre 10^{10} et 10^{11} bactéries (*Horner-Devine et al. 2003*) regroupées entre 6000 à 50 000 espèces (*Curtis, Sloan, and Scannell 2002*). En plus de l'effet trophique, les rhizodépôts permettent une dynamique d'échange entre les plantes elles-mêmes et les plantes avec les microorganismes que l'on nomme « effet rhizosphère » (*van der Heijden, Bardgett, and van Straalen 2008; Hartmann et al. 2008; Bais et al. 2006*). Dans cette communication chimique, les exsudats racinaires jouent un rôle important (*Bais et al. 2004; Neal et al. 2012; van Dam and Bouwmeester 2016*). En effet, ils peuvent contenir des molécules signal reconnues par les bactéries. Les plus étudiés sont les flavonoïdes provoquant la nodulation des légumineuses par les *Rhizobiaceae*. Certains composés peuvent être impliqués dans la régulation de la communauté microbienne du sol, soit pour la colonisation de la rhizosphère *via* leur activité chimio attractant (*Zhang et al. 2014*), soit pour la régulation de la population bactérienne *via* des actions d'inhibition ou d'activation du *quorum sensing* (*Hentzer and Givskov 2003; Elasri et al. 2001*) ou encore des activités antimicrobiennes (*Baetz and Martinoia 2014; Lanoue et al. 2010*).

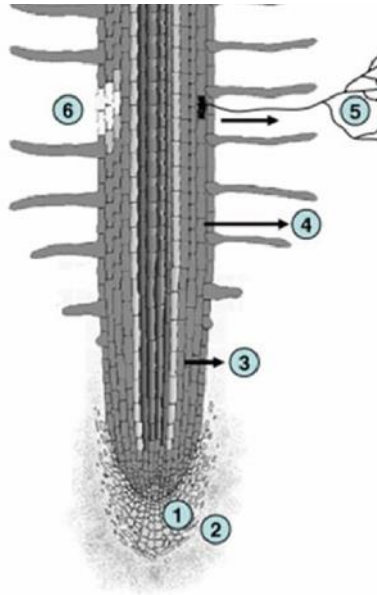


Figure 15 : Principales zones de rhizodépôts

Schéma d'une racine présentant les principales zones de rhizodépôts. (1) Perte de cellules due à la desquamation, (2) Perte de mucilage insoluble, (3) Sécrétion d'exsudats racinaires solubles, (4) Libération de carbone organique, (5) Carbone provenant de symbiotes, (6) Cellules mortes ou lysées provenant de l'épiderme racinaire ou des cellules corticales.

Les rhizodépôts sont classés en deux catégories : faible poids moléculaires (LMW) et haut poids moléculaires (HMW) (Tableau 2). Les composés LMW sont variés (acides aminés, acides organiques, sucres, composés phénoliques et autres métabolites secondaires) et facilement assimilables par les microorganismes. Au contraire, les composés HMW sont difficilement assimilables comme le mucilage (polysaccharides, cellulose) et les protéines. Ils composent la majorité des exsudats libérés en termes de quantité mais ils sont beaucoup moins diversifiés que les LMW.

Il existe deux mécanismes de transports, soit passif soit actif, pour exporter les rhizodépôts (*Baetz and Martinoia 2014*) (Figure 16). Trois processus peuvent être impliqués dans le transport passif : la diffusion à travers la membrane cellulaire pour le relargage des LMW, l'utilisation de canaux ioniques pour les carbohydrates et certains carboxylates et l'utilisation de vésicules pour les HMW (*Bradi and Vivanco 2009*). Le transport actif est médié par deux familles de transporteurs membranaires : les ABC transporteurs (ATP Binding Cassette) et les MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion).

Tableau 2 : Composés sécrétés par les rhizodépôts*(Vives-Peris et al. 2019)*

Catégorie	Noms
Acides aminés	α -Alanine, β -alanine, γ -aminobutyrique, α -aminoadipique, arginine, asparagine, acide aspartique, citrulline, cystathionine, cystéine, cystine, deoxymugineic, 3-épihydroxymuginéique, glutamine, acide glutamique, glycine, histidine, homosérine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, acide muginéique, ornithine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine
Sucres	Arabinose, fructose, galactose, glucose, maltose, mannose, mucilages de différentes compositions, oligosaccharides, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, xylose, désoxyribose
Acides organiques	Acide acétique, ac. aconitique, ac. ascorbique, ac. aldonique, ac. benzoïque, ac. butyrique, ac. caféique, ac. citrique, ac. p-coumarique, ac. érythronique, ac. ferulique, ac. formique, ac. fumarique, ac. glutarique, ac. glycolique, ac. lactique, ac. glyoxilique, ac. malique, ac. malonique, ac. oxalacétique, ac. oxalique, ac. p-hydroxybenzoïque, ac. piscidique, ac. propionique, ac. pyruvique, ac. succinique, ac. syringique, ac. tartarique, ac. tétronique, ac. valerique, ac. vanillique
Acides gras	Acide Linoléique, ac. linoléique, ac. oléique, ac. palmitique, ac. stéarique
Stérols	Campesterol, cholesterol, sitosterol, stigmasterol
Facteurs de croissance et vitamines	p-Amino acide benzoïque, biotine, choline, inositol, N-méthyl acide nicotinique, niacine, pathothénique, pantothénate, pyridoxine riboflavine, strigolactones, thiamine
Enzymes	Amylase, invertase, peroxydase, phénolase, acide/alkaline phosphatase, polygalacturonase, protéase
Flavonoïdes	Chalcone, coumarine, flavones, flavonols, flavanones, flavonones, isoflavones
Nucléotides/purines	Adénine, guanine, uridine/cytidine
Autres	Tous les polypeptides induits, alcools, alkyl sulphides, auxines, camaléxine, dihydroquinone, éthanol, glucosides, glucosinolates, glycinebétaine, acide hydrocyanique, ions inorganiques, molécules gazeuses ions (ex CO ₂ , H ₂ , H ⁺ , OH ⁻ , HCO ₃), isothiocyanates, composés non identifiés ninhydrine positifs, protéines solubles non identifiées, agents réducteurs, scopoletine, sorgoleone, strigolactones

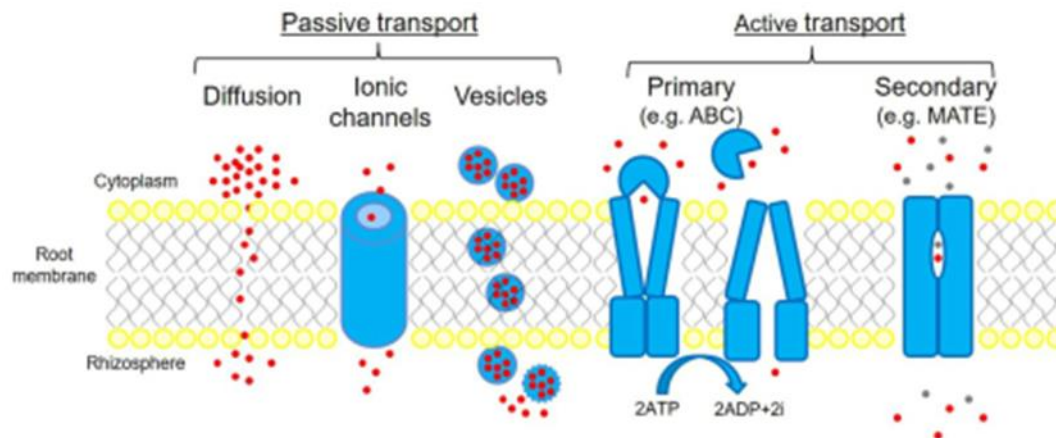


Figure 16 : Les différents mécanismes de transport des exsudats racinaires

Les cercles rouges représentent les composés libérés dans la rhizosphère (Vives-Peris et al. 2019).

3.1.2. La colonisation de la rhizosphère : « Priority Effect »

La colonisation de la rhizosphère est un défi pour les microorganismes. En effet, plusieurs études ont montré que l'ordre et le moment d'arrivée des espèces influencent la structure de la communauté écologique de la rhizosphère par une régulation de l'accès aux ressources par les primo-arrivants (Chase 2003). Ce phénomène où la capacité d'un microorganisme à s'établir en premier dans une niche telle que la rhizosphère lui donne un avantage sélectif par rapport aux autres espèces arrivées plus tardivement est appelé « priority effect » (Drake 1991; Fukami et al. 2005).

Le « priority effect » peut être classé en deux catégories : la préemption de niche et la modification de niche (Fukami 2015). Dans la préemption de niche, les souches impliquées ont des besoins nutritifs du même ordre. Les premières espèces arrivées réduisent localement les ressources disponibles pour affaiblir la croissance et la reproduction des souches arrivées tardivement. Ainsi quelles que soit les souches qui arrivent en premier, la structure écologique de la niche est préservée (Fukami et al. 2005). La modification de niche se produit lorsque des espèces ont peu ou pas les mêmes besoins nutritifs. Les primo-arrivants modifient l'écosystème changeant localement la structure écologique de la niche (Dickie et al. 2012). Enfin, pour que le « priority effect » ait lieu et soit durable dans le temps, il faut que les souches arrivées en premier interagissent ensemble pour avoir des effets sur la dynamique locale et que ces souches se multiplient assez rapidement pour avoir le temps de préempter ou de modifier sensiblement les niches avant l'arrivée de nouvelles espèces.

La colonisation de la rhizosphère peut commencer dès la germination des graines, où de nombreux composés sont expulsés de la plante comme des quantités importantes de sucres de la famille des RFO (oligosaccharides de la famille du raffinose).

3.1.3. La colonisation de la rhizosphère : le cas d'*Agrobacterium*

Les agrobactéries vivent dans la rhizosphère et peuvent survivre dans le sol lorsqu'elles sont en compétition avec d'autres microorganismes pendant plusieurs mois voire plusieurs années (Krimi et al. 2002; Iacobellis and Devay 1986). Suivant le type de rhizosphère, la quantité d'agrobactéries varie entre 10^3 et 10^7 CFU/g avec des fluctuations saisonnières dues aux quantités de nutriments libérés (Krimi et al. 2002; Bouzar et al. 1995). Les souches d'agrobactéries possédant le pTi ont un avantage supplémentaire, par rapport aux souches non pathogènes, de pouvoir créer une niche écologique plus spécifique et moins compétitive.

Les déterminants impliqués dans l'adaptation d'*Agrobacterium* à la rhizosphère sont méconnus contrairement à des souches comme *Pseudomonas* qui ont été largement étudiées. Cependant, certaines propriétés et données génétiques des agrobactéries donnent quelques pistes pour expliquer comment *Agrobacterium* colonise efficacement la rhizosphère. En effet les agrobactéries ont développé des capacités métaboliques importantes (Dessaux and Faure 2018). Elles peuvent utiliser et dégrader une gamme large de sucres, de polyols et de dérivés de sucres provenant des exsudats racinaires (Marasco, Lago, and De Felice 1995; Ampomah et al. 2013; Wichelecki et al. 2015). Avec leurs activités d'uréases et de transaminases, elles peuvent aussi utiliser des composés azotés relargués dans le sol comme source d'azote (Riley and Weaver 1977). Elles sont aussi armées face à la compétition microbienne et aux moyens de défense mis en place par la plante. Vis-à-vis des compétiteurs microbiens, *Agrobacterium* possède trois types de sidérophores qui lui permettent de récupérer efficacement le fer même dans des sols pauvres en fer (Ong, Peterson, and Neilands 1979; Penyalver et al. 2001; Rondon, Ballering, and Thomas 2004). Certaines agrobactéries possèdent aussi un système de sécrétion de type VI (SST6) qui sécrète des effecteurs avec des activités de type DNAses ou amidases du peptidoglycane, dirigés contre les cellules végétales ou les microorganismes environnants (Ryu 2015). Par exemple, *A. fabrum* utilise l'activité DNase de l'effecteur Tde comme antimicrobien lors de la colonisation de la rhizosphère (Ma et al. 2014). *Agrobacterium* peut résister (à certaines doses) à de nombreux antibiotiques comme le chloramphénicol, la pénicilline, la streptomycine, ... (Tennigkeit and Matzura 1991), et aussi à des composés antimicrobiens sécrétés par la plante, tels que des composés phénoliques (Bhattacharya, Sood, and Citovsky 2010; Caretto et al. 2015). Ainsi plusieurs études ont montré que les souches d'*Agrobacterium* non pathogènes peuvent dégrader divers composés phénoliques (Baude et al. 2016; Brencic, Eberhard, and Winans 2004) et que les souches pathogènes possèdent une résistance supplémentaire aux composés phénoliques grâce à deux protéines VirH1 et VirH2 qui ont la capacité de dégrader plus de quinze composés phénoliques différents (Brencic, Eberhard, and Winans 2004; Kanemoto et al. 1989). Enfin, certains composés phénoliques provenant des exsudats racinaires sont chimio-attractants pour *Agrobacterium* (Hawes and Pueppke 1987; Hawes and Smith 1989; Shaw 1991) leur permettant

de se déplacer grâce à leurs flagelles vers la plante en suivant le gradient de concentration, pour coloniser la zone.

3.2. Les RFO (Raffinose Family Oligosaccharides)

Les oligosaccharides contenant du D-galactose sont omniprésents chez la plante et dans les exsudats racinaires. Les plus répandus sont les RFO qui sont présents dans les graines de plantes et qui représentent en moyenne 2 à 10% de la masse sèche des graines (*Horbowicz and Obendorf 1994*). Ces sucres s'accumulent pendant le développement des graines puis diminuent lors de la germination.

3.2.1. Les RFO et leur précurseur

Les RFO sont des molécules solubles constituées par un sucrose additionné d'une ou plusieurs extensions α -(1-6) galactosyl (Figure 17).

Le premier membre de cette famille, le raffinose [O- α -D-galactopyranosyl- (1- 6) - α -D-glucopyranosyl- (1-2) - β -D-fructofuranoside] est le plus petit des RFO (trisaccharide). C'est aussi le principal RFO présent dans les semences de monocotylédones (plante à fleur dont la graine à un seul cotylédon), tandis que ses homologues supérieurs, le stachyose (tétrasaccharide) et le verbascose (pentasaccharide) s'accumulent principalement dans les graines de dicotylédones (plante dont la graine possède deux cotylédons). Enfin, des RFO pouvant aller jusqu'à quinze sous-unités ont été trouvés après traitement par le froid chez *Ajuga reptans* L (*Bachmann, Matile, and Keller 1994*).

Le galactinol [O- α -D-galactopyranosyl-(1-1)-L-*myo*-inositol] est le précurseur de synthèse des RFO (Figure 17). Il appartient à la famille des galactosyl cylitols. Sa synthèse provient de la catalyse d'un UDP-D-galactose avec un *myo*-inositol par l'enzyme galactinol synthase (Gols, EC 2.4.1.123).

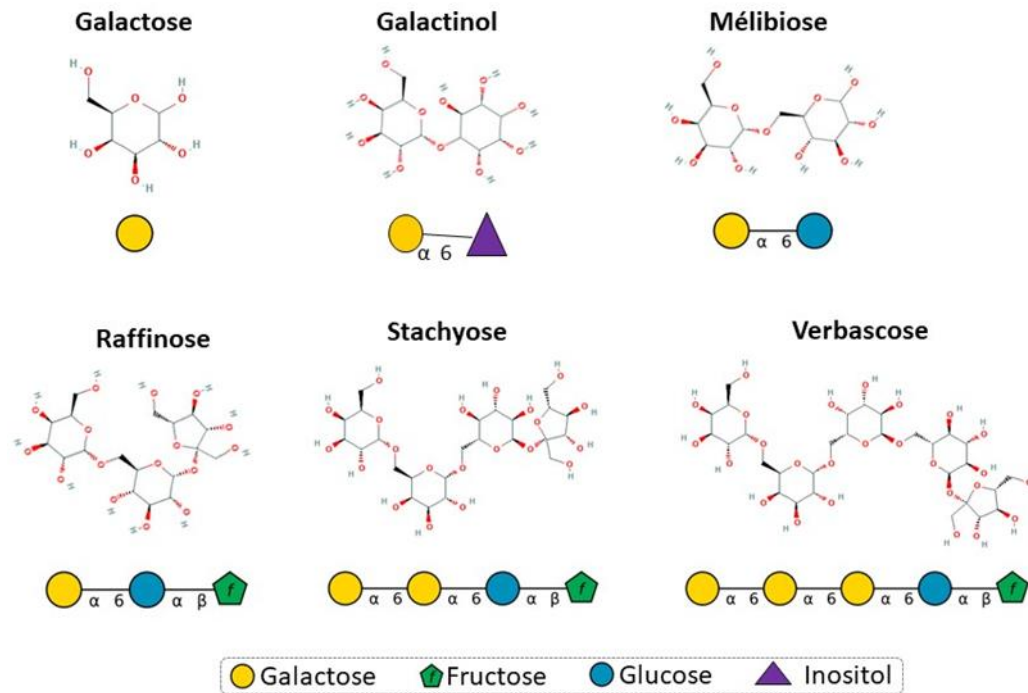


Figure 17 : Structures chimiques des RFO, du galactinol et du mélibiose

3.2.2. La biosynthèse et le catabolisme des RFO

Dans de nombreuses plantes, les RFO sont synthétisés et accumulés en réponse à un stress abiotique (températures extrêmes, dessiccation) (Nishizawa, Yabuta, and Shigeoka 2008). Leur synthèse consiste au transfert d'un galactosyl, d'un donneur à un accepteur. Deux types de donneurs peuvent entrer en jeu : le galactinol et les RFO (sucrose, raffinose, stachyose, verbascose) (Figure 18).

La première étape de la voie des RFO est la synthèse du raffinose, catalysée par la raffinose synthase (RafS, EC 2.4.1.82) qui transfère le galactosyl du galactinol au sucrose (Lehle and Tanner 1973). Le raffinose est ensuite utilisé, pour la synthèse du stachyose par la stachyose synthase (StaS, EC 2.4.1.67) (Tanner and Kandler 1968), comme accepteur du galactosyl provenant du galactinol. Pour la synthèse du stachyose, les galactosyl cyclitols (galactosyl ononitol et galactopinitol A) peuvent être utilisés comme donneurs de galactosyl à la place du galactinol (Richter et al. 2000). Les réactions catalysées par RafS et StaS dans le cytosol de la cellule végétale sont réversibles (Lehle and Tanner 1973; Peterbauer and Richter 1998). Ensuite la synthèse du verbascose et des RFO de plus haut poids moléculaire sont synthétisés par l'enzyme galactan galactosyltransférase (GGT) au niveau des vacuoles (Bachmann, Matile, and Keller 1994). La GGT catalyse le transfert d'un galactosyl d'un RFO pour former un RFO avec une chaîne plus longue.

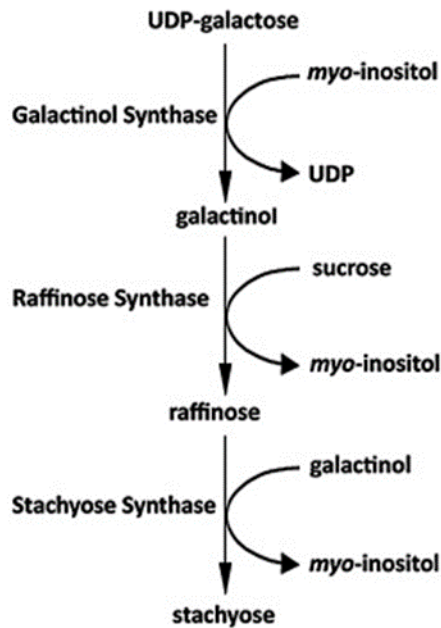


Figure 18 : Schématisation de la voie de biosynthèse du galactinol et des RFO

(Jing et al. 2018)

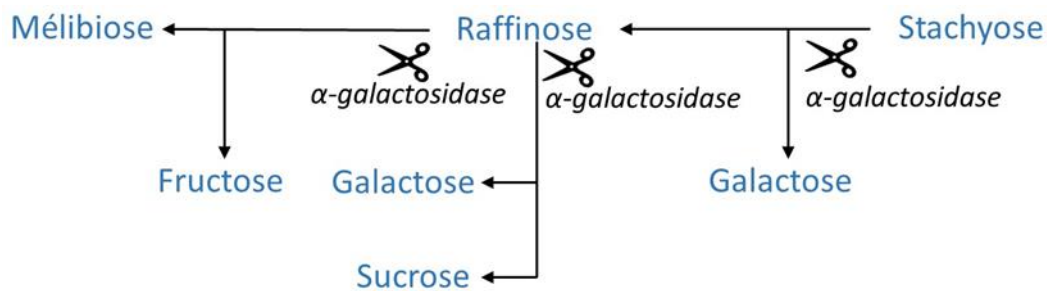


Figure 19 : Schématisation de la dégradation des RFO

Le clivage des RFO représenté par des ciseaux est réalisé par des α -galactosidases. La dégradation du raffinose par ces enzymes peut conduire à la formation du mélibiose et du fructose ou du galactose et du sucrose (Meyer et al. 2018).

Le catabolisme des RFO n'est pas aussi bien décrit que leur synthèse. Dans les graines de plantes, de nombreuses α -galactosidases (EC 3.2.1.22) ont été isolées (Dey 1985; Keller and Pharr 1996). Ces α -galactosidases hydrolysent séquentiellement les RFO en enlevant le galactose terminal des RFO (Zhou et al. 2012) (Figure 19). Le sucrose semblerait être digéré en fructose et glucose par une invertase ou en fructose et UDP-glucose par une Suc synthase (EC 2.4.1.13). L'élimination du fructose du raffinose par une β -fructosidase produit le mélibiose (Figure 17). Certaines protéines impliquées dans l'imbibition des graines sont des homologues des α -galactosidases et des invertases et sembleraient être aussi impliquées dans la dégradation des RFO (Van den Ende 2013).

La régulation de l'accumulation des RFO dans les graines n'est pas encore clairement établie. Il semblerait qu'il s'agisse d'une régulation avec plusieurs paramètres où l'enzyme GolS soit l'élément clé (*dos Santos et al. 2011*). En effet, son activité est corrélée avec la quantité totale de RFO dans les plantes et les graines. Dans ce système, l'enzyme RfaS semblerait avoir un rôle dans le contrôle de l'accumulation car son activité est inhibée par la présence de raffinose (*Peterbauer et al. 2001*). Enfin, la relation entre la voie des RFO et les mécanismes impliquant les *myo*-inositol semblerait pouvoir affecter l'accumulation des RFO puisqu'une diminution du *myo*-inositol (substrat du galactinol) provoque la diminution du taux de galactinol et de raffinose dans les graines de tomates (*Keller et al. 1998*).

3.2.3. Le rôle des RFO

Dans la plante, les RFO participent à plusieurs fonctions cellulaires (*Sengupta et al. 2015; Van den Ende 2013*). Leur rôle le plus décrit est celui de réserve de carbohydrates pour les cellules de plantes (*Keller and Pharr 1996; Kandler and Hopf 1984*) car ces derniers sont une source de carbone facilement clivable et assimilable.

Les RFO et le galactinol sont aussi impliqués dans la protection des membranes lors de stress abiotiques et dans la résistance aux espèces réactives à l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) (*Jing et al. 2018; Sengupta et al. 2015*). Lors de stress abiotiques liés à la baisse des températures ou à la dessiccation, la quantité de RFO dans les plantes augmente et permet aux plantes de résister. Ainsi, lors de la congélation ou de la déshydratation cellulaire, les RFO contribueraient à la stabilisation membranaire en s'insérant dans les mono et les bicouches lipidiques. Dans des processus de protection des membranes contre les ROS, le raffinose et le galactinol ont des propriétés anti-oxydantes car ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles OH, qui sont les ROS les plus réactives (*Nishizawa, Yabuta, and Shigeoka 2008; Stoyanova et al. 2011*).

Au niveau de l'interaction plante/microorganisme, le galactinol et/ou les RFO sont décrits comme étant des molécules signal produites en réponse à un stress biotique (*Kim et al. 2008; Cho et al. 2010*). Par exemple, la colonisation de la rhizosphère par certaines souches comme *Pseudomonas chorographis* 06 provoque l'expression de la galactinol synthase dans les cellules de plante et l'augmentation de la concentration endogène du galactinol confère une résistance systémique induite des plantes à certains pathogènes.

Pendant la germination des graines, les RFO sont relâchés dans la rhizosphère (*Sengupta et al. 2015; Andersen et al. 2005; Nelson 2004*). Cette libération de sucres influence la dynamique de la rhizosphère permettant aux micro-organismes pouvant les dégrader de proliférer et de coloniser la zone. Cette caractéristique à utiliser les RFO comme ressource trophique a été observée chez *Ensifer meliloti* (*Gage and Long 1998; Bringham, Cardon, and Gage 2001*). A.

fabrum C58 possède un opéron nommé *mel* (Figure 20) qui présente plus de 70 % d'identité de séquence avec l'opéron *agp* responsable du catabolisme des RFO chez *E. meliloti*. Cet opéron *mel* contient le gène *atu4661* qui code pour une PBP nommée MelB, les gènes *atu4660* et *atu4665* correspondant à des α -galactosidases et les gènes *atu4662* à *atu4664* au transporteur ABC. Le chapitre 3 de ce manuscrit portera sur la caractérisation de la PBP MelB et l'étude du rôle de cette protéine dans les phases précoces de colonisation de la rhizosphère par *A. fabrum* C58.

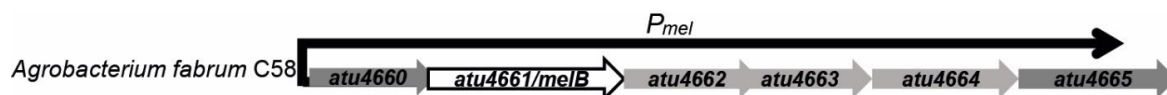


Figure 20 : Opéron *mel*

Le promoteur P_{mel} indique le sens de transcription des gènes. Les gènes *atu4660* et *4665* sont annotés comme étant deux α -galactosidases, *atu4661* est la PBP MelB et les gènes *atu4662* à *atu4664* sont les gènes du transporteur ABC. Extrait de Meyer et al 2018

4. Les protéines périplasmiques de liaison : rôle dans la perception de signaux moléculaires

Chez les bactéries, le transport de signaux moléculaires environnementaux est une étape clé dans de nombreux processus biologiques tels que la nutrition, la communication intercellulaire, la virulence... Ce mécanisme fait intervenir des complexes protéiques transmembranaires de différents types. Les plus représentatifs sont les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette), mais il existe aussi des transporteurs de type TRAP (Tripartite ATP-independent Periplasmic) ou TTT (Tripartite Tricarboxylate Transporter). Chez les bactéries à coloration Gram négative, ces transporteurs sont associés à des protéines périplasmiques de liaison, appelées PBP (Periplasmic Binding Protein), qui assurent la spécificité et le transport unidirectionnel des molécules vers le cytoplasme.

4.1. Les transporteurs ABC

4.1.1. Les généralités

Les transporteurs ABC constituent une vaste famille de protéines ubiquitaires chez les organismes vivants. Chez l'homme, 48 gènes codent pour ces transporteurs (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001). Chez *A. fabrum* C58 et *A. tumefaciens* B6, 15 % de leur génome codent pour des transporteurs dont 60% sont des transporteurs ABC (Wood et al. 2001).

Ces protéines utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour la translocation de substances au travers des membranes biologiques contre leur gradient de concentration. Les éléments transportés, nommés solutés ou ligands (Holland and Blight 1999) sont de nature

diverse. Ils peuvent être aussi bien des substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions, ...) que des substances toxiques (métaux lourds, drogues, ...).

Les transporteurs ABC ont une organisation structurale commune constituée de quatre domaines : deux domaines transmembranaires hydrophobes (TMD, Trans Membrane Domain) et deux domaines cytoplasmiques de liaison des nucléotides (NBD, Nucleotide Binding Domain) qui assurent l'activité ATPasique (Figure 21). Chez les procaryotes, ces quatre domaines sont souvent les produits de gènes individuels et vont donc s'assembler au niveau de la membrane (*Linton and Higgins 1998*). Chez les eucaryotes, les domaines peuvent être exprimés et fusionnés au sein d'une seule protéine.

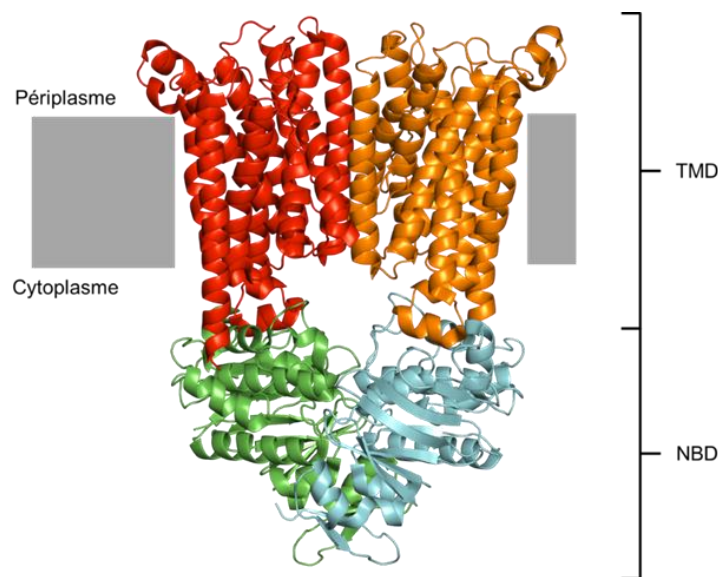


Figure 21 : Structure cristalline de BtuCD obtenue à une résolution de 2,79 Å (PDB : 4R9U), le transporteur ABC de la vitamine B12 chez *E. coli*.

Les TMD (BtuC) sont composés de 10 hélices transmembranaires et les NBD (BtuD), qui se trouvent dans le cytoplasme, sont formés d'hélices α et de feuillets β .

4.1.2. Les domaines transmembranaires (TMD)

La conservation des séquences des TMD est très faible à cause de la diversité des solutés pouvant être transportés. Les TMD se dimérisent pour former le pore de translocation du soluté au travers de la membrane plasmique. Typiquement, chaque TMD est composé de quatre à dix α -hélices transmembranaires. Ces hélices sont reliées entre elles par des boucles extra- et intra-cytoplasmique (*Quentin, Fichant, and Denizot 1999*). Au niveau de ces hélices, les TMD possèdent des résidus qui sont impliqués dans la fixation du soluté et sur une des boucles, le motif conservé EAA ou L-loop serait impliqué dans le changement conformationnel lors du mécanisme de translocation (*Mourez, Hofnung, and Dassa 1997*).

4.1.3. Les domaines de fixation des nucléotides (NBD)

Les domaines NBD sont les domaines moteurs des transporteurs ABC. Ils sont conservés et présentent un repliement composé d'un sous domaine α/β (deux feuillets β et six hélices α) et d'un sous domaine α , reliés par deux boucles flexibles dont l'une contient le motif « Q-loop » impliqué dans la transmission des changements de conformation des domaines TMD et NBD. Les NBD sont caractérisés par des séquences consensus comme la signature ABC qui permet de les identifier mais aussi par les motifs Walker A (« P-loop ») impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, et le motif Walker B contenant le site de fixation du Mg^{2+} utilisé lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Enfin les NBD interagissent avec le motif conservé EAA des boucles intracellulaires des TMD (Davidson et al. 2008).

4.2. Les protéines périplasmiques de liaison (PBP)

Les PBP forment une grande famille de protéines allant de 25 à 70 kDa. Elles servent de récepteurs pour divers solutés solubles : oligosaccharides, acides aminés, peptides, ions, complexes ferreux organiques, ... (Tam and Saier 1993). Elles sont impliquées dans le processus de reconnaissance et de capture de ces composés et peuvent interagir avec les domaines transmembranaires des transporteurs ABC. Chez les bactéries à coloration Gram négative, les PBP diffusent librement dans le périplasme, alors qu'elles sont ancrées à la membrane par une queue hydrophobe chez les bactéries à coloration Gram positive et les archées (Sutcliffe and Russell 1995).

4.2.1. Les structures

La première structure cristalline de PBP a été résolue dans les années 1970. Il s'agit de la protéine ABP (L-arabinose-Binding Protein) d'*E. coli*, impliquée dans le transport du L-arabinose (Quioco et al. 1974). Depuis, de nombreuses données structurales relatives à ces protéines ont été obtenues et déposées dans la PDB (Protein Data Bank). L'analyse de ces structures montre que les PBP conservent une architecture commune, malgré leur faible homologie de séquence et une affinité pour des solutés de nature différente. Ces protéines sont monomériques et constituées de deux domaines globulaires (ou lobes) reliés par une région charnière. L'espace entre les deux lobes contient le site de fixation au ligand. Chaque lobe est constitué d'un feuillet β central entouré par un nombre variable d'hélices α (Quioco and Ledvina 1996). Ces domaines peuvent se mouvoir autour de la région charnière, ce qui confère une certaine flexibilité à la protéine qui peut alors adopter une conformation « ouverte » ou « fermée », avec un degré d'ouverture variable (de Boer et al. 2019). Bien que la structure tertiaire soit globalement conservée, il subsiste des différences de taille et de réarrangement des structures secondaires au niveau des deux lobes.

4.2.2. La classification

Plusieurs classifications de PBP existent suivant leurs structures tridimensionnelles ou leurs ligands. La première classification des PBP a été réalisée par Tam et Saier en 1993. Dans le cadre de leurs travaux, ils ont classé la majorité des PBP en 8 sous-groupes en fonction des solutés fixés (*Tam and Saier 1993*).

La deuxième classification se fonde sur le principe que toutes les PBP ont un ancêtre commun. Elle est basée sur la relation phylogénétique et la comparaison des arrangements topologiques des domaines globulaires. De cette façon, Fukami-Kobayashi a proposé deux classes différentes qui diffèrent par le nombre et l'ordre des feuilletts β central des lobes et par le nombre de segments reliant les deux lobes (classes I : trois courts segments, classe II : deux segments) (*Fukami-Kobayashi, Tateno, and Nishikawa 1999*). Puis Karpowich a ajouté une troisième classe regroupant les PBP dont la région charnière est constituée d'une seule hélice α (*Karpowich et al. 2003*).

Enfin depuis 2010, grâce à la multiplication des données structurales déposées dans la PDB, Berntsson a défini une nouvelle classification basée sur un alignement de structures tridimensionnelles et non plus à partir d'un alignement de séquences peptidiques (*Berntsson et al. 2010*). Elle est composée des six groupes structuraux notés de A à F. Cette nouvelle classification montre que la différence majeure entre les PBP de différents groupes se trouve au niveau de la région charnière (Figure 22). Les PBP de la classe A possèdent une charnière formée d'une hélice α . De nombreuses PBP de cette classe fixent des métaux ou des sidérophores comme la protéine FpvC de *Pseudomonas aeruginosa* qui fixe du fer (PDB : 6R5S) (*Vigouroux et al. 2019*). Pour la classe B, les deux domaines sont reliés par trois segments courts sans structure particulière, ce qui confère une plus grande flexibilité, et les extrémités N et C terminales ne sont par conséquent pas dans le même domaine. Une telle architecture est observée pour Atu2422 d'*A. fabrum* C58 (PDB : 3IP9) (*Planamente et al. 2010*). La classe C, regroupe les PBP les plus grandes (50 à 70 kDa). Telle que décrite dans cette classification, elle est formée de deux domaines de tailles différentes reliés par un troisième domaine charnière. Depuis quelques années, l'augmentation des structures de PBP de la classe C dans la PDB, a permis de mettre à jour la définition structurale de cette classe qui serait plutôt formée de deux domaines, un petit et un grand domaine, reliés entre eux par une région charnière assez courte de six à huit résidus (*El Sahili et al. 2015; Fukamizo, Kitaoku, and Suginta 2019*). Cette classe contient de nombreuses protéines liant les peptides, telle que AccA d'*A. fabrum* C58 (PDB : 3ZE8) (*El Sahili et al. 2015*). Des alignements de séquences suggèrent que les PBP MoaA, fixant l'acide mannopinique, AgaA, fixant l'acide agropinique, et MelB fixant les RFO, appartiennent à ce groupe. Le groupe D se caractérise par des domaines de tailles équivalentes reliés par une région charnière de deux brins de quatre à cinq résidus, comme c'est le cas pour la protéine Atu4243 d'*A. fabrum* C58 (PDB :

4EUO) (Planamente et al. 2012) qui est impliqué dans le transport du GABA (acide γ -aminobutyrique). La séquence d'AgtB, fixant l'agropine, est proche de celles des protéines de cette classe. Les PBP du groupe E sont caractérisées par la présence d'une hélice α et d'un brin β connectant les deux lobes. Ce groupe est en général associé à des transporteurs de type TRAP, comme la protéine SiaP de *Haemophilus influenzae* (PDB : 2CEY) (Muller et al. 2006). Le groupe F contient les PBP avec une région charnière constituée de deux segments de huit à dix résidus, architecture observée pour la protéine SocA d'*A. fabrum* C58 (PDB : 6HQH) (Marty et al. 2016). Récemment, une septième classe, la classe G a été ajoutée (Scheepers, Lycklama, and Poolman 2016). Pour le moment, les membres de ce groupe sont peu nombreux et comportent par exemple la protéine fixant l'alginate chez *Shingomonas* (PDB : 1Y3N) (Momma et al. 2005). Ce sont des protéines d'environ 60 kDa qui structurellement ressemblent aux protéines de la classe C avec deux domaines de tailles différentes (un petit et un grand domaine) mais contrairement à la classe C, leur région charnière est composée de trois brins. Cette classification structurale des PBP montre que les protéines conservant une forte similarité structurale ne se lient pas forcément à des ligands de même nature et ne présentent pas toujours de fortes similarités de séquences.

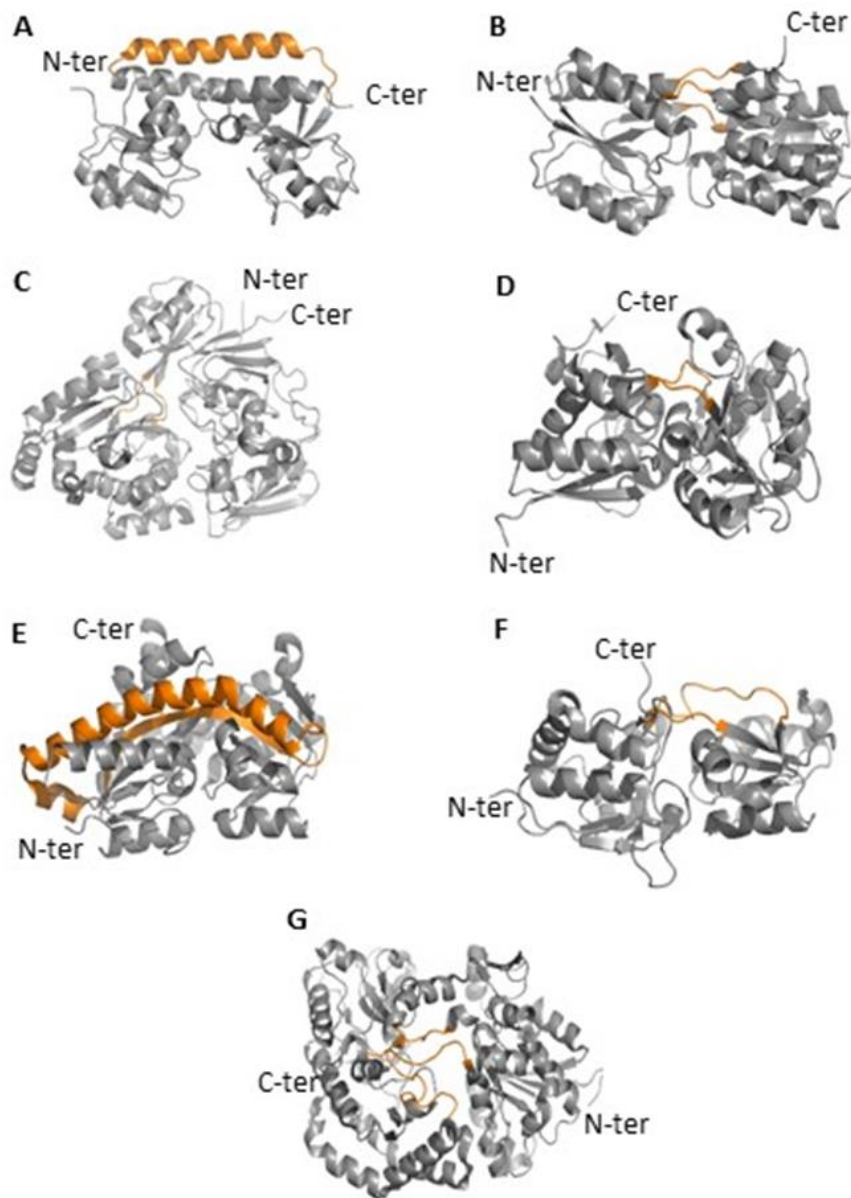


Figure 22 : Classification des PBP selon Bertsson et al., 2010 et les mises à jour proposées par Scheepers et al., 2016 et Fukamiso et al., 2019

Les régions charnières définissant les 7 classes structurales sont colorées en orange et les différents lobes sont en gris. Cette classification est basée sur la superposition de structures issues de la PDB de protéines de divers organismes et fixant des ligands de nature différente. Les protéines des clusters A à G représentées ci-dessus sont BtuF (PDB : 1N2Z), RBP (PDB : 1DRJ), AccA (PDB : 3ZE8), ModA (PDB : 2ONR), UehA (PDB : 3FXB), HisJ (PDB : 1HSL), PBP de *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* (PDB : 3OMB). Adapté de Bertsson et al., 2010.

4.2.3. La liaison avec le ligand

Les structures de PBP disponibles dans la PDB montrent que dans la majorité des cas, en absence de ligand, les PBP se trouvent sous forme ouverte permettant ainsi la reconnaissance et la fixation du ligand au niveau du sillon via des interactions avec les résidus de la poche à

l'interface des deux lobes (Bermejo et al. 2010). La fixation spécifique du ligand induit un mouvement de charnière qui rapproche les deux domaines globulaires se refermant sur le ligand (Figure 23). Cette conformation est nommée forme fermée. Ce mécanisme d'ouverture et fermeture en présence d'une molécule est appelé « Venus Flytrap » (Felder et al. 1999) chez les PBP et fait référence aux Dionées (plantes carnivores attrape-mouche) décrites par Carl von Linné en 1770. Selon l'état de liaison, les PBP peuvent adopter des conformations intermédiaires (Newcomer, Lewis, and Quijcho 1981), comme des protéines ligandées ouvertes ou des PBP apo sous forme fermées.

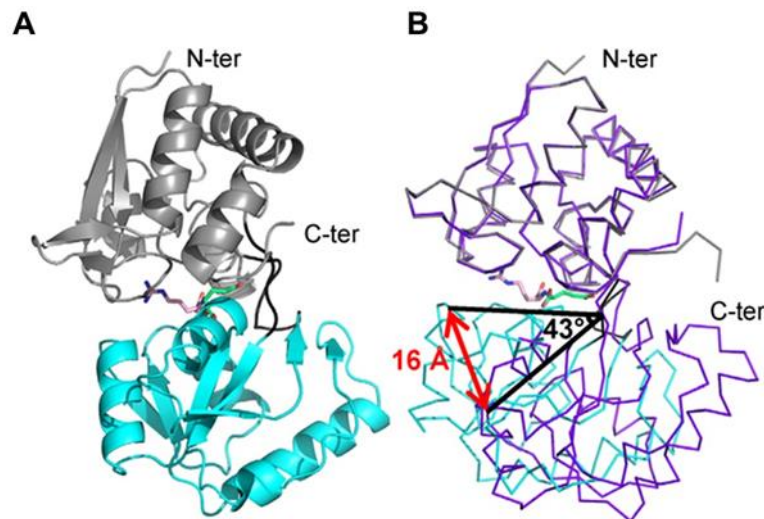


Figure 23 : Représentation de la PBP NocT en complexe avec la nopaline et comparaison avec la forme non ligandée

(A) Représentation de la PBP NocT en complexe avec la nopaline (forme fermée) (PDB : 4POX) en deux lobes représentés en cyan et gris avec la région charnière en noire et la nopaline en rose et vert. (B) Comparaison de la structure de NocT complexée à la nopaline (forme fermée) en cyan et gris avec NocT apo (forme ouverte) (PDB : 4POZ) en violet. (Lang et al. 2014)

4.3. Les interactions PBP/transporteurs ABC : initiation du mécanisme de translocation

L'interaction entre les PBP et les transporteurs ABC est une étape clé dans le mécanisme de transport des ligands. Les structures cristallines de complexes PBP-transporteurs ABC entiers, comme celle du complexe MalE-MalFGK2 chez *E.coli* (Shilton 2008), ont permis de proposer un mécanisme de transport. L'interaction entre la PBP sous sa forme fermée (ligandée), induit un changement de conformation des TMD permettant l'ouverture du pore de translocation vers le périplasme et en parallèle le rapprochement des NBD. De façon concomitante, la PBP s'ouvre pour libérer le soluté dans le pore de translocation. A ce stade, la PBP forme un complexe stable avec le transporteur ABC (Oldham, Davidson, and Chen 2008). Ensuite, les NBD hydrolysent l'ATP, ce qui conduit à un nouveau changement conformationnel des TMD, induisant l'ouverture du pore vers le cytoplasme et la libération du soluté dans le cytoplasme. A la fin de l'hydrolyse de

l'ATP, il y a relargage de l'ADP formé, qui permet la restauration de la conformation du transporteur dans sa forme initiale afin de recommencer un nouveau cycle (Figure 24).

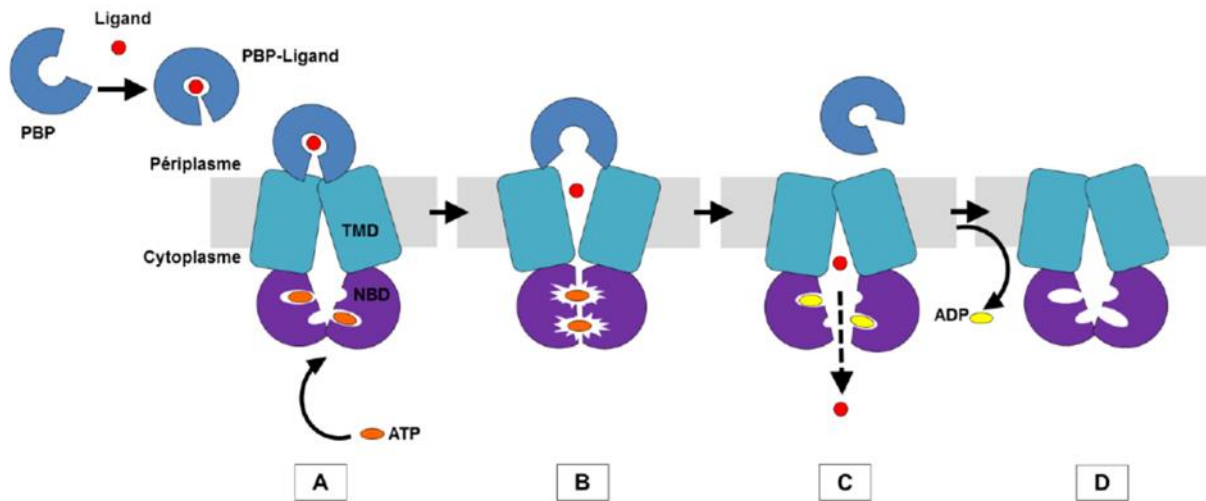


Figure 24 : Mécanisme de transport assuré par le système PBP-transporteur ABC

(A) Le pore de translocation du transporteur ABC est fermé vers le périplasma et ouvert vers le cytoplasme. Après la capture du ligand dans le périplasma, la PBP interagit avec les domaines TMD tandis que les domaines NBD capturent des molécules d'ATP dans le cytoplasme. (B) L'interaction PBP/TMD induit un changement conformationnel de ces domaines. En parallèle, la PBP s'ouvre et libère le ligand dans le pore de translocation ouvert vers le périplasma. Les changements conformationnels des TMD permettent aux NBD de se rapprocher l'un de l'autre pour hydrolyser l'ATP. (C) Après hydrolyse de l'ATP, le pore de translocation s'ouvre de nouveau vers le cytoplasme pour y libérer le ligand. Les domaines NBD s'éloignent l'un de l'autre. (D) Les molécules d'ADP sont libérées dans le cytoplasme et le transporteur retourne à son état initial

Objectifs

La croissance et la survie d'*A. tumefaciens* en tant que saprophyte dans la rhizosphère mais également en tant que pathogène dans la tumeur, dépend de sa capacité à transporter les nutriments disponibles dans son environnement. Les sucres (mono- et oligosaccharides) et les opines représentent une source de carbone importante pour la bactérie. Le transport de ces molécules chez *A. tumefaciens* se fait par le biais d'un transporteur ABC et d'une protéine périplasmique de liaison (PBP).

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser moléculairement les PBP associées à la perception et à l'import de nutriments spécifiques, les mannityl-opines, et non spécifiques, les RFO, chez *A. tumefaciens* B6/R10 et C58 respectivement.

Les résultats de mes travaux expérimentaux, présentés dans les deux chapitres suivants, sont le fruit d'une approche multi-disciplinaire en biologie structurale, biophysique, biochimie et microbiologie en collaboration avec Yves Dessaux (équipe Interactions plantes-bactéries, I2BC, Gif-sur-Yvette) pour la partie mannityl-opines et l'équipe de Céline Lavire et Xavier Nesme (équipe Diversité et adaptation des bactéries phytopathogènes, Ecologie Microbienne, Lyon) pour l'ensemble du travail.

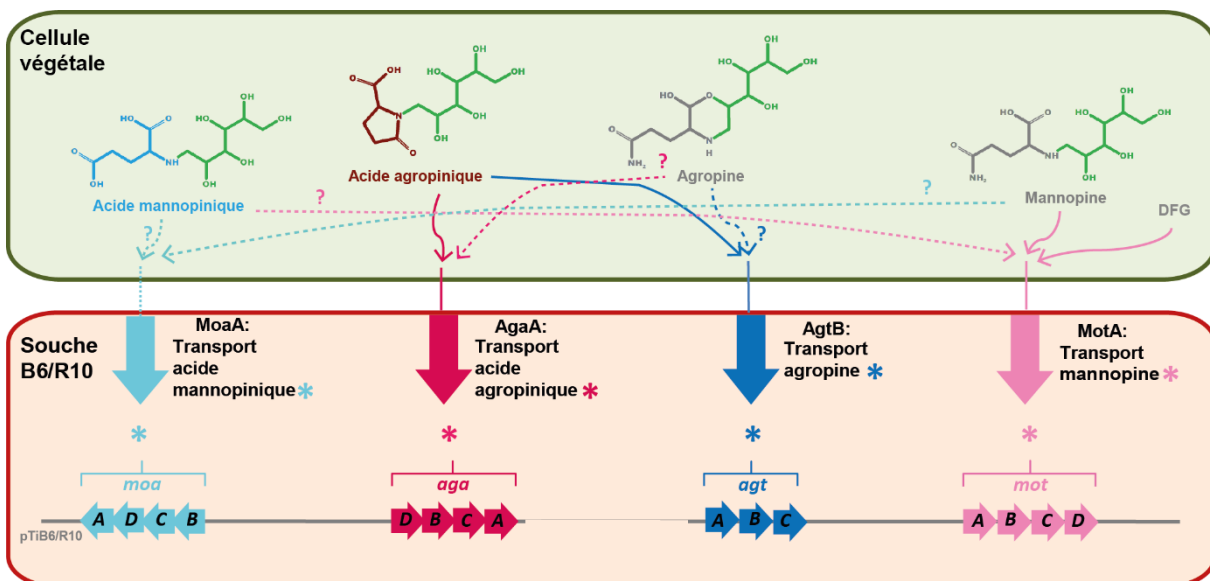


Figure 25 : Schéma récapitulatif des connaissances sur le transport des mannityl-opines

Dans un premier temps (Chapitre 2), j'ai finalisé l'étude structurale et fonctionnelle sur le transport des mannityl-opines par les PBP AgtB, AgaA, MoaA et MotA chez *A. tumefaciens* B6/R10, entrepris par Loïc Marty pendant sa thèse. Le premier objectif a été de valider par des mesures d'interaction et par une caractérisation fonctionnelle la gamme d'opine ou de dérivé d'opine pouvant être fixé par chaque PBP (Figure 25). Le deuxième objectif a été la

caractérisation structurale de la PBP MoaA afin d'identifier les résidus clés impliqués dans la fixation des mannityl opines.

Ce travail a permis de montrer qu'*A. tumefaciens* B6 a développé deux types d'import aux mannityl-opines dont les gènes sont situés sur deux régions différentes du pTi : un transport spécifique qui peut fixer qu'un type de mannityl-opine et un import non-spécifique qui peut transporter plusieurs mannityl-opines. Ainsi, cette étude apporte une meilleure compréhension sur le catabolisme des mannityl-opines qui contribuent au fitness des *A. tumefaciens* B6 pathogènes dans la plante.

Mon deuxième objectif (Chapitre 3) a été de caractériser au niveau biophysique et moléculaire la PBP MelB d'*A. fabrum* C58 prédite impliquée dans la perception et l'import des RFO. Ce travail a permis de valider que MelB et son transporteur sont responsables du transport des RFO chez *A. fabrum* C58. L'originalité des résultats de cette étude est la première description du transport et de l'utilisation du galactinol par une bactérie avec une préférence pour ce ligand. Il a permis aussi de montrer que MelB confère à la bactérie un avantage compétitif dans les stades précoces de colonisation de la rhizosphère.

Chapitre 2 : Caractérisation structurale des PBP impliquées dans la perception des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* B6

1. Le contexte scientifique

La bactérie pathogène *A. tumefaciens* est capable de détourner la machinerie de la plante pour produire des composés nutritifs spécifiques des souches virulentes. Ces composés de faible poids moléculaires sont appelés opines. Chez *A. tumefaciens* B6, le pTi porte les gènes du métabolisme des mannityl-opines qui sont importées dans le cytoplasme d'*Agrobacterium* via quatre transporteurs différents. Les PBP qui sélectionnent les ligands sont MotA, capable de reconnaître la mannopine et une autre opine le DFG (Marty et al. 2016); MoaA, décrite comme fixant spécifiquement l'acide mannopinique ; AgtB, décrite comme liant l'agropine; et AgtA, capable de fixer l'acide agropinique.

Ces PBP appartiennent à deux voies de transport et de catabolisme (Figure 26). MotA et AgtB font partie de la voie de transport *moc* dont le mode de régulation n'est pas encore identifié mais pourrait être régulé par MocR et MocS, eux-mêmes contrôlés par l'agropine et la mannopine (Jung, Baek, and Lee 1999). AgaA et MoaA font partie de la voie de transport *aga/moa*. La transcription des protéines de cette voie est réprimée par le facteur transcriptionnel MoaR qui est inhibée par l'acide agropinique et l'acide mannopinique comme montré par des études génétiques (Lyi, Jafri, and Winans 1999). Même si quelques études génétiques sur le catabolisme des mannityl-opines existaient, les données structurales sur le transport de ces opines étaient absentes jusqu'à peu. Ainsi, depuis quelques années, l'équipe contribue à la caractérisation structurale et biochimique des PBP fixant les mannityl-opines chez *A. tumefaciens* R10 et B6 et a déjà caractérisé MotA (Marty et al. 2016).

Les travaux présentés dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration avec Yves Dessaux (I2BC, Gif-sur-Yvette) pour la partie opines, et, Ludovic Vial et Céline Lavire (Ecologie Microbienne, Lyon) pour les constructions des mutants défectifs.

Ces travaux ont trois objectifs :

- (1) Caractériser structurellement et vérifier la spécificité des deux PBP AgtB et AgaA pour l'agropine et l'acide agropinique, et comparer leurs modes de fixation aux opines ;
- (2) Caractériser structurellement MoaA et définir la spécificité de la PBP aux mannityl-opines ;
- (3) Caractériser l'affinité de MotA pour l'acide mannopinique afin de compléter les résultats obtenus par L. Marty.

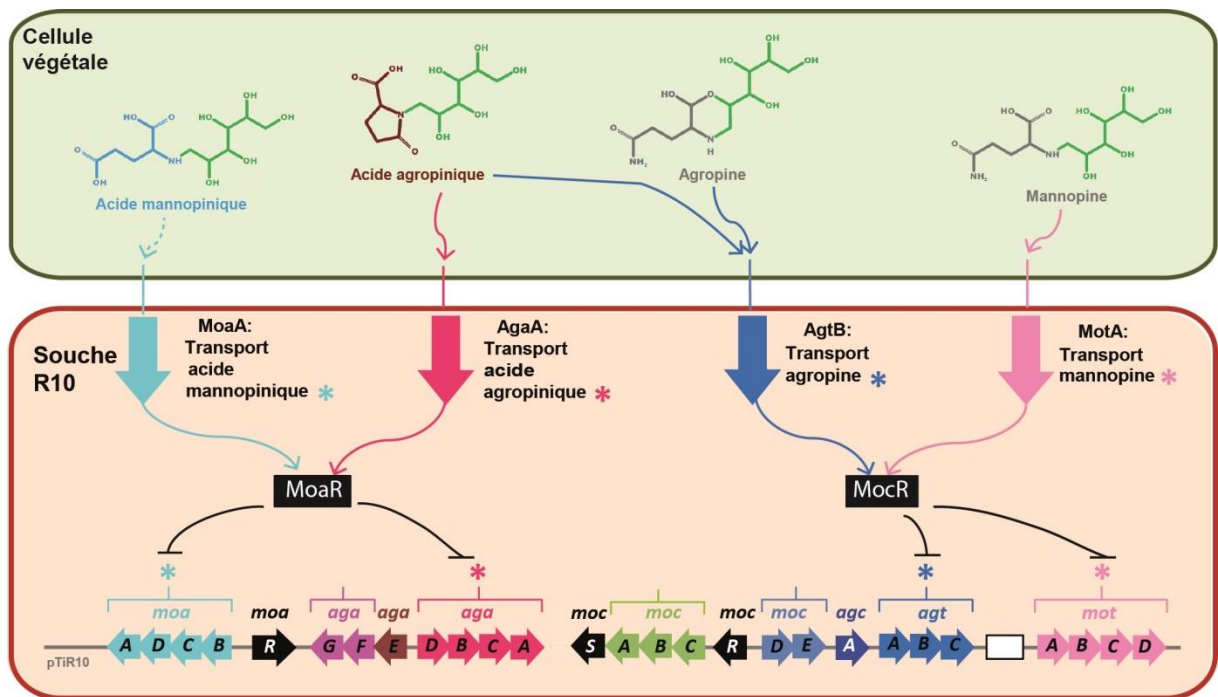


Figure 26 : Schéma représentant le métabolisme hypothétique des mannityl-opines

Chez *A. tumefaciens* B6, les gènes (*moaABCD*) codant pour le transport de l'acide mannopinique en bleu clair et les gènes (*agaABCD*) codant pour le transport de l'acide agropinique en magenta sont régulés par MoaR avec comme effecteurs l'acide mannopinique et l'acide agropinique. Les gènes (*motABCD*) codant pour le transport de la mannopine en rose et les gènes (*agtABC*) codant pour le transport de l'agropine en bleu sembleraient être régulés par MocR avec comme effecteurs l'agropine et la mannopine.

2. La présentation des travaux

L'approche intégrative des données de biologie structurale, de biophysique et de génétique apporte de nouveaux éléments sur le transport des mannityl-opines chez *Agrobacterium*.

Ces travaux valident que la PBP AgtB est responsable du transport de l'agropine. Ils ont permis de montrer que chez *A. tumefaciens* B6 et R10, deux PBP AgaA et AgtB sont responsables de l'import de l'acide agropinique, et deux PBP MoaA et MotA sont responsables du transport de l'acide mannopinique, avec pour chaque PBP des signatures de fixation différentes. Ils montrent que les PBP AgaA et MoaA sont respectivement spécifiques de l'acide agropinique et de l'acide mannopinique.

Ces études permettent de mettre en évidence que sur les pTi d'*A. tumefaciens* B6 et R10, les deux voies de catabolisme des mannityl-opines ont des spécificités aux opines différentes. La région *aga/moa* est spécifique, c'est-à-dire que les PBP exprimées (MoaA et AgaA) ne peuvent transporter qu'une opine par PBP ; et la région *moc* est non spécifique, c'est-à-dire que les PBP exprimées (MotA et AgtB) peuvent transporter plusieurs opines par PBP.

Les résultats phylogénétiques sur AgtB et AgaA montrent qu'AgtB est présent chez très peu d'*Agrobacterium* contrairement à AgaA qui est répandue chez les *Rhizobiaceae*.

Ma contribution à ces travaux a été de compléter les résultats obtenus par L. Marty pendant sa thèse. Pour cela, j'ai purifié l'ensemble des protéines.

Pour le premier objectif, j'ai défini les constantes d'affinités d'AgaA et AgtB par fluorescence intrinsèque des protéines pour les quatre mannityl-opines. Les résultats obtenus ont été confirmés par microcalorimétrie par Magali Aumont-Nicaise sur la plateforme PIM de l'12BC. Pour caractériser moléculairement l'interaction AgtB-agropine, j'ai réalisé des co-cristallisations AgtB-agropine qui du fait de l'instabilité de l'agropine, ne m'ont pas permis d'obtenir de structure du complexe AgtB-agropine mais deux structures d'AgtB-acide agropinique dans deux nouveaux groupes d'espace. Fonctionnellement, j'ai réalisé les expériences de croissance en milieu minimum avec ou sans opines sur les souches R10 et le mutant défectif *agtB*. J'ai participé à l'analyse structurale des deux PBP. Enfin, j'ai réalisé l'étude phylogénétique de ces deux PBP.

Sur le deuxième objectif, j'ai tout d'abord déterminé de nouvelles conditions de cristallisation de MoaA complexée à l'acide mannopinique. Puis, j'ai résolu la structure de MoaA par phasage sélénométhionine en présence de l'acide mannopinique, et par remplacement moléculaire j'ai obtenu la structure MoaA avec un analogue de l'acide mannopinique, l'acide glucopinique. J'ai analysé les structures et j'ai déterminé l'affinité de MoaA aux mannityl-opines et leurs analogues par suivi d'autofluorescence. Pour le troisième objectif, par fluorescence intrinsèque des protéines, j'ai mesuré l'affinité de MotA avec l'acide mannopinique et l'acide glucopinique. J'ai déterminé la structure de MotA-acide mannopinique par remplacement moléculaire à partir de la structure de MotA-mannopine (PDB : 5L9G), et j'ai effectué l'analyse structurale.

Les résultats obtenus sont présentés dans deux articles de *Biochemical Journal* : Marty *et al.*, 2019 (article 1) sur les PBP AgtB et AgaA et Vigouroux *et al.*, 2020 (article 2) sur la PBP MoaA.

Article 1: Structural basis for two efficient modes of agropinic acid opine import into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*

Research Article

Structural basis for two efficient modes of agropinic acid opine import into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*

Loïc Marty^{1,*}, Armelle Vigouroux^{1,*}, Magali Aumont-Nicaise¹, Franck Pelissier², Thibault Meyer³, Céline Lavire³, Yves Dessaux¹ and Solange Moréra¹

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS CEA Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ²Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ³UMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, F-69622 Villeurbanne, Lyon, France

Correspondence: Solange Moréra (solange.morera@i2bc.paris-saclay.fr)

Agrobacterium tumefaciens pathogens genetically modify their host plants to drive the synthesis of opines in plant tumors. The mannityl-opine family encompasses mannopine, mannopinic acid, agropine and agropinic acid. These opines serve as nutrients and are imported into bacteria via periplasmic-binding proteins (PBPs) in association with ABC transporters. Structural and affinity data on agropine and agropinic acid opines bound to PBPs are currently lacking. Here, we investigated the molecular basis of AgtB and AgaA, proposed as the specific PBP for agropine and agropinic acid import, respectively. Using genetic approaches and affinity measurements, we identified AgtB and its transporter as responsible for agropine uptake in agropine-assimilating agrobacteria. Nonetheless, we showed that AgtB binds agropinic acid with a higher affinity than agropine, and we structurally characterized the agropinic acid-binding mode through three crystal structures at 1.4, 1.74 and 1.9 Å resolution. In the crystallization time course, obtaining a crystal structure of AgtB with agropine was unsuccessful due to the spontaneous lactamization of agropine into agropinic acid. AgaA binds agropinic acid only with a similar affinity in nanomolar range as AgtB. The structure of AgaA bound to agropinic acid at 1.65 Å resolution defines a different agropinic acid-binding signature. Our work highlights the structural and functional characteristics of two efficient agropinic acid assimilation pathways, of which one is also involved in agropine assimilation.

Introduction

Agrobacteria are telluric and rhizosphere bacteria commonly isolated from roots of numerous plants as commensal bacteria. They can also be pathogenic when they harbor a tumor-inducing (Ti) plasmid [1,2]. Pathogenic agrobacteria create their own ecological niche (called tumor niche or opine niche) after plant cell transformation that leads to tumor formation in a wide range of plants [1]. Indeed, agrobacteria mediate the transfer of a portion of the pTi, namely the T-DNA, to the plant cell [3,4]. Once incorporated into the plant nuclear DNA, T-DNA gene expression drives the synthesis of (i) plant hormones leading to the tumor formation (crown-gall disease) and (ii) novel organic compounds called opines. Opines are either sugar phosphodiester or the products of condensed amino acids with ketoacids or sugars [2,5,6]. They are specifically utilized as growth substrates by the inciting agrobacteria and confer upon these pathogens an advantage when in competition with other members of the soil microflora for the colonization of opine-rich environments [7–12]. Some opines, designated conjugative opines, such as octopine or agropinopine (actually only the arabinose-2-phosphate moiety of the agropinopine is recognized) [13], stimulate the horizontal transfer (conjugative transfer) of the Ti plasmid from pathogenic *Agrobacterium* to nonpathogenic *Agrobacterium* [6].

*These authors contributed equally to this work.

Received: 6 November 2018
Revised: 7 December 2018
Accepted: 14 December 2018

Accepted Manuscript online:
14 December 2018
Version of Record published:
15 January 2019

In *Agrobacterium*-induced plant tumors, over 20 opines are known. They fall into distinct families according to their precursors, which are sugars, amino acids and ketoacids. They are not all present at the same time in a tumor and some opines are specific for a given Ti plasmid/bacteria strains. For example, *A. tumefaciens* strains B6 and R10 possess Ti plasmid genes that code for enzymes responsible for the synthesis of the mannityl-opines family composed of four compounds containing mannose conjugated with either glutamate or glutamine. Mannopine (1-deoxymannosyl-glutamine) and mannopinic acid are unmodified conjugates, while agropine (1-deoxy-mannitoyl-glutamine,1',2'-lactone) and agropinic acid are cyclized derivations of mannopine [14] (Figure 1). The *ags* gene product catalyzes the lactonization of mannopine to agropine [15,16] (Figure 1). Mannopine is formed from a precursor which is also an opine, but from the chrysopine family, named 1-deoxy-fructosyl-glutamine (DFG) [17]. Notably, mannopine, agropine and mannopinic acid can degrade into agropinic acid (mannityl-glutamic acid lactam) through a spontaneous lactamization [6,14].

Opine catabolic genes (import and degradation) are located in segments outside the T-DNA region on the pTi. They are generally clustered in operons and regulons, and their expression is inducible by the opine itself or a catabolized/degraded form of it [6,13,18–20]. Two sets of genes are present in the catabolic region. The first one encodes the transport system that often consists of an ATP-binding cassette (ABC) transporter and its cognate periplasmic-binding protein (PBP). The second one encodes the enzymes involved in the degradation of the opines to molecules that belong to central bacterial metabolism. To date, we have characterized several opine-binding PBPs such as NocT (nopaline opine family import), AccA (agrocinopine opine family import), MotA (mannopine opine import) and OccJ (octopine opine family import) [12,13,21,22]. However, structural data on agropine and agropinic acid–opine–PBP complexes are still lacking.

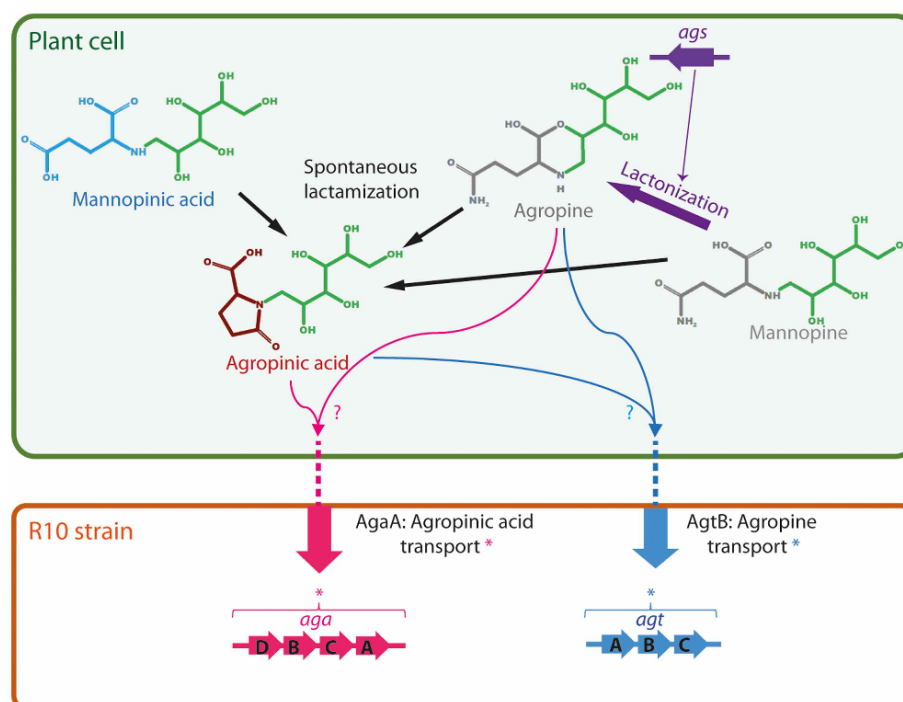


Figure 1. Transport of agropine (gray and green) and agropinic acid (dark orange and green) from transformed plant cells to *A. tumefaciens* octopine/mannityl-type R10 strain.

In plant tumor cells, the *ags* gene responsible for the biosynthesis of agropine from mannopine is located on the T-DNA transferred from the *A. tumefaciens* R10 Ti plasmid. All the genes allowing the synthesis of opines are located on the T-DNA incorporated into the plant genome. Agropinic acid results from the spontaneous lactamization of three mannityl opines: agropine, mannopine and mannopinic acid. In *A. tumefaciens* R10, the (*agtABC*) and (*agaA-D*) genes located on the Ti plasmid, proposed as coding for agropine and agropinic acid import, respectively, are shown in blue and magenta.

In the present study, we investigated the structural and biochemical properties of two PBPs: AgtB, which stands for Agropine transport (Agt) protein B, and AgaA, which stands for agropinic acid (Aga) protein A. AgtB and AgaA have been predicted as an agropine-binding protein and an agropinic acid-binding protein, respectively. This prediction results from genetic investigations (mapping of gene regions and defective mutants), opine uptake/transport experiments [23–27] and annotation of the agrobacterial genome (Figure 1). We first focused on the genetic and molecular role of the PBP AgtB through an integrative approach using a defective mutant *in cellulose*, crystallography and affinity measurements. We showed that AgtB was the PBP responsible for agropine import into *A. tumefaciens* R10. Nonetheless, AgtB can also bind agropinic acid with an affinity higher than that observed for agropine. We structurally characterized the binding mode of AgtB for agropinic acid in three different crystal forms at 1.4, 1.74 and 1.9 Å resolution. All attempts to obtain a structure of AgtB in complex with agropine failed mainly due to agropine instability. Nevertheless, a model of a bound agropine in AgtB was easily built based on the bound agropinic acid structure. In contrast, we demonstrated that the PBP AgaA is specific for agropinic acid and solved a liganded structure at 1.65 Å resolution. We identified two agropinic acid-binding signatures (a selective and a non-selective) allowing both PBPs to bind agropinic acid with a high affinity in the nanomolar range. This work provides new insights into the utilization of agropine and agropinic acid opines in host-interacting bacteria.

Experimental

Synthesis and purification of opines

Agropine and agropinic acid were synthesized from mannopine as previously described [14]. Because agropine can spontaneously lactamize into agropinic acid, we purified agropine stocks on a Waters 2695 Alliance HPLC System equipped with a Waters 2420 ELSD and a Waters 996 HPLC Photodiode Array Detector. Agropine was injected on a Waters Atlantis HILIC silica column washed with 95% of 10 mM ammonium formate, pH 3 (A) and 5% acetonitrile (B) during 5 min, and eluted by gradient until a ratio A : B of 75 : 25 at a 4 ml/min flow. Acetonitrile was then evaporated and residual agropine was frozen into liquid nitrogen. Solutions of agropine and agropinic acid were checked by mass spectrometry (Supplementary Figure S3). The used mannopine was the same as in Marty et al. [21], and mannopinic acid was a laboratory product also checked by mass spectrometry.

Construction of the non-polar AgtB-defective mutant in *A. tumefaciens* R10

The octopine–mannityl-type R10 Δ agtB-defective mutant was constructed according to a strategy recently described [28]. Briefly, approximately 1000 pb of the recombinant region, containing the upstream and downstream region flanking the *agtB* gene, was generated by PCR using primers listed in Supplementary Table S1. These fragments were designed to delete the coding sequence of *agtB* without affecting neighboring genes. The recombinant fragment was inserted into a *Sma*I digested suicide vector (pJQ200sk [29]) by infusion technology (Takara Clontech, Kyoto, Japan). The resulting pJQ200sk- Δ agtB plasmid was introduced into *A. tumefaciens* R10 by electroporation. Colonies with plasmid integration were selected on YPG medium plates supplemented with gentamicin (20 μ g/ml) and by PCR with primers UpagtBF-DwagtBR. Double-crossover events were searched by culturing gentamicin-resistant colonies into YPG medium without antibiotic overnight before plating to YPG plates containing 5% of sucrose. The loss of the suicide vector and the deletion of *agtB* in the sucrose-resistant colonies were verified by PCR (primers UpagtBF-DwagtBR) and sequencing (GenoScreen, Lille, France).

Bacterial culture conditions

The octopine–mannityl-type *A. tumefaciens* R10 and R10 Δ agtB strains were cultivated overnight at 28°C in AB media supplemented with mannitol (2 g/l). After washing the pellet with 0.8% NaCl, strains were inoculated in AB minimal medium supplemented with 2 mM of carbon/nitrogen sources (agropine or agropinic acid) or in the absence of any carbon/nitrogen source, in 24-well sterile plates incubated at 28°C during 4 days. Growth of cells was measured every 8 h by optical density at 600 nm. Analyses were performed in three replicates.

Cloning, expression and purification of mature AgtB and AgaA

The synthetic genes (Genscript) coding for the mature AgtB and AgaA were inserted into pET-28b and pET-29b, respectively. *Escherichia coli* BL21 pLysS was transformed by pET-28b-*agtB* and *E. coli* Rosetta pLysS

by pET-29b-*agaA*. Cells were grown at 37°C in LB broth supplemented with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside to induce protein production. Cells were centrifuged, resuspended in a buffer of 50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole and 500 mM NaCl, and disrupted by sonication. After centrifugation at 25 000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was loaded onto a 5 ml His-Trap column (GE Healthcare). Protein elution was performed with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. Protein fractions were loaded onto a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 150 mM NaCl. The protein fractions were pooled, concentrated at 30 mg/ml and 15 mg/ml for AgtB and AgaA, respectively, and stored at –80°C.

Crystallization and structure determination

Crystallization conditions (Table 1) for liganded AgtB and AgaA (molar ratio of protein : ligand used was 1 : 5) were screened using QIAGEN kits (Valencia, CA) with a Cartesian nanodrop robot (Genomic solutions) and were manually optimized. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (mother liquor supplemented with 25% PEG 400 or/and 25% glycerol) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA 1 and 2 beamlines equipped with a PILATUS 6M and an EIGER 9M as a detector, respectively, at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France). Data processing was performed using the XDS package [30] (Table 1). Structure determinations were performed by molecular replacement with PHASER [31]. The coordinates of the N- and C-terminal domains of the PBP MotA (PDB: 5L9G) [21] were used as search models for the liganded AgtB structures. For the AgaA–agropinic acid structure, the coordinates of the N-terminal and the C-terminal domains of an AgaA partial model built using the server @TOME-2 [32], which performs fold-recognition, were used. The partial AgaA model from the best matching template based on the structure of the *E. coli* putative-binding protein Ylib (PDB: 1UQW) was built using SCWRL 3.0 [33]. Refinement of each structure was performed with BUSTER-2.10 [34] and TLS group. NCS restraints were applied when more than one molecule was present in the asymmetric unit. Inspection of the density maps and manual rebuilding was performed using COOT [35]. The three-dimensional models of agropinic acid and agropine were generated with the ProDRG webserver [36]. Refinement details of each structure are shown in Table 1. Molecular graphics images were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Fluorescence titration measurements

Each ligand bound to AgtB or AgaA was monitored by autofluorescence by exciting the protein at a wavelength of 295 nm and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophans at 335 nm. All experiments were performed at 22°C in 96-well plates (1/2 Area Plate-96F, PerkinElmer) using Tecan Infinite M1000 (Tecan, Männedorf, Switzerland) in 25 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (1 μM) and increasing concentrations of ligand. Each ligand has no emission signal at 335 nm. The data were analyzed using Origin® 7 software and fitted to the following equation:

$$f = \Delta\text{Fluorescence}_{\text{max}} \times \text{abs}(x)/(K_D + \text{abs}(x)).$$

Isothermal titration microcalorimetry measurements

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal (Malvern). The experiments were carried out at 20°C. Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) varied from 30 to 75 μM. Nineteen injections of 2 μl ligand solution (agropine, agropinic acid, mannopine and mannopinic acid) at concentrations ranging from 400 to 675 μM were performed at intervals of 180 s while stirring at 500 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with the software supplied by MicroCal (ORIGIN®). This software uses the relationship between the heat generated by each injection and Δ*H* (enthalpy change in kcal mol^{–1}), *K*_a (the association-binding constant in M^{–1}), *n* (the number of binding sites), total protein concentration, and free and total ligand concentrations [37].

Distance tree

Sequences were analyzed using BlastP from NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/>). Alignments of AgtB/AgaA and related sequences were conducted using MUSCLE

Table 1 Crystallographic data and refinement parameters

Values for the highest resolution shell are in parentheses.

Protein	AgtB–agropinic acid	AgtB–agropinic acid	AgtB–agropinic acid	AgaA–agropinic acid
Crystallization conditions	15% PEG 4K, 0.1 M Tris (pH 8.5), 0.2 M sodium acetate	30% PEG 8K, 0.1 M Tris (pH 8.5)	28% PEG 8K, 0.1 M Tris (pH 8.5), 0.2 M CaCl ₂	1.8 M AS, 0.1 M Mes (pH 6.5), 0.2 M Zn acetate
PDB code	6HLY	6HLZ	6HM2	6HLX
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>C</i> 2	<i>P</i> 1	<i>P</i> 6 ₅ 22
Cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 40.8 <i>b</i> = 108.8 <i>c</i> = 64.1	<i>a</i> = 170.8 <i>b</i> = 40.9 <i>c</i> = 117.4 <i>β</i> = 115.1	<i>a</i> = 40.6 <i>b</i> = 86.3 <i>c</i> = 106.5 <i>α</i> = 71.1 <i>β</i> = 81 <i>γ</i> = 76.3	<i>a</i> = 89.3 <i>b</i> = 89.3 <i>c</i> = 285.8
Number of molecules in the au	1	2	5	1
Resolution (Å)	50–1.4 (1.48–1.4)	50–1.9 (2–1.9)	50–1.74 (1.85–1.74)	50–1.65 (1.74–1.65)
No. of observed reflections	294 363 (35 081)	316 647 (46 781)	451 101 (64 995)	2 274 669 (341 154)
No. of unique reflections	57 167 (8745)	58 982 (8971)	129 664 (19 223)	82 437 (12 777)
<i>R</i> _{sym} (%) ¹	5 (95.1)	14.9 (93.3)	11.6 (89.7)	13.2 (205.2)
<i>R</i> _{pim} (%)	3.4 (90.1)	10.5 (70.4)	10.2 (73.8)	3.8 (76.7)
Completeness (%)	99.2 (95.7)	98.8 (93.9)	95.6 (87.3)	99.6 (97.6)
<i>I</i> / <i>σ</i>	15.3 (1.1)	7 (1.2)	7.58 (1.3)	19.2 (1.73)
<i>CC</i> _{1/2}	99.9 (48.9)	99.2 (68.8)	99.4 (52.8)	99.9 (60.5)
<i>R</i> _{cryst} (%) ²	18.2 (24.8)	20.5 (29.2)	17.3 (24.6)	15.6 (25.1)
<i>R</i> _{free} (%) ³	21.3 (23.6)	25.4 (32.4)	20.1 (24.7)	17.4 (27.7)
No. of atoms				
Protein	2488	4858	12 075	3865
Ligand	20	40	80	20
Water	291	620	999	470
r.m.s. bond deviation (Å)	0.01	0.01	0.01	0.01
r.m.s. angle deviation (°)	1	1	0.98	0.97
Average <i>B</i> (Å ²)				
Protein	26.9	34.7	37.0	27.6
Ligand	15.5	29.3	21.8	20
Water	38.1	41.9	31.9	39.3
Clashscore ⁴	0.99	2.09	1.7	2.63
MolProbity score ⁴	0.94	1.21	1.05	1.11
Ramachandran plot (%)				
Favored	98	98	98	99
Allowed	2	2	2	1
Outliers	0	0	0	0

¹ $R_{sym} = \frac{\sum_{hk} \sum_i |I_i(hk) - \langle I(hk) \rangle|}{\sum_{hk} \sum_i I_i(hk)}$, where $I_i(hk)$ is the i th observed amplitude of reflection hk and $\langle I(hk) \rangle$ is the mean amplitude for all observations i of reflection hk .

² $R_{cryst} = \frac{\sum |F_{obs} - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$.

³5% of the data were set aside for free *R*-factor calculation. *CC*_{1/2} = percentage of correlation between intensities from random half-dataset [45].

⁴Calculated with MolProbity [46].

software. The distance tree was built using Mega software, version 7. Topology was inferred using the neighbor-joining method [38]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was generated to represent the sequence relatedness of the proteins analyzed. The sequence distances were computed using the Poisson correction method and are in units of the number of amino acid substitutions per site.

Results

AgtB and AgaA exhibit a high affinity for agropinic acid but only AgtB binds agropine

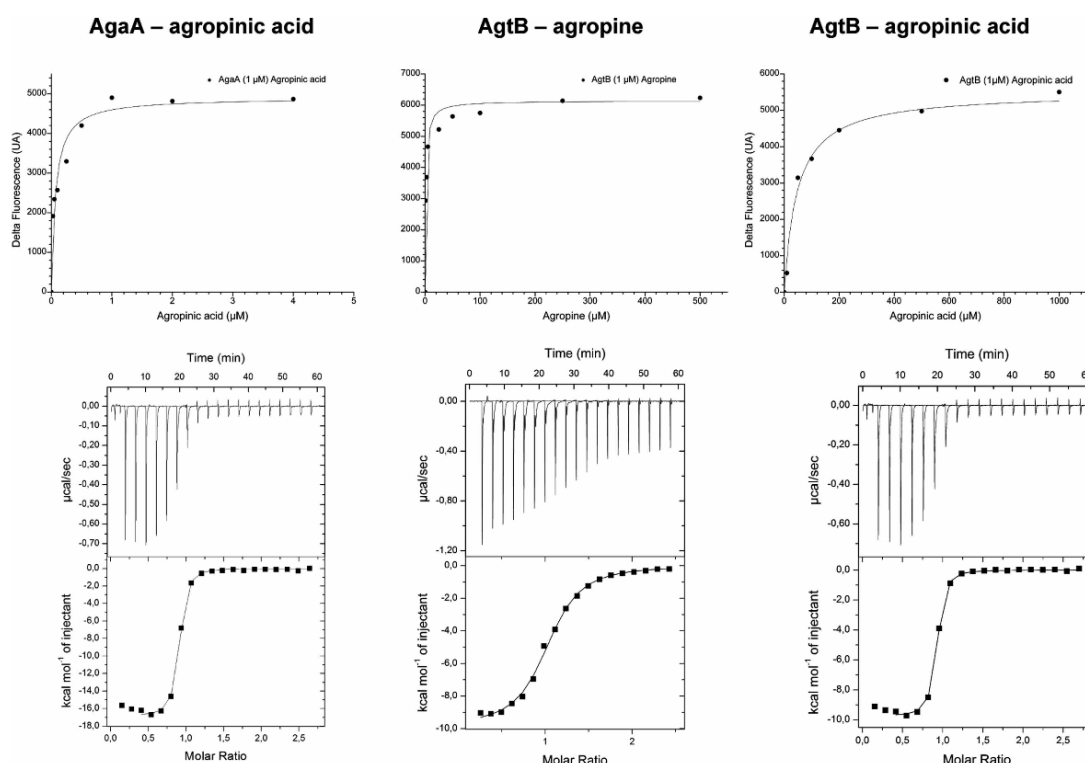
Binding of agropinic acid and freshly purified agropine to the purified recombinant mature proteins AgtB and AgaA were explored using tryptophan fluorescence spectroscopy (AgtB and AgaA possess 16 and 5 tryptophans, respectively) and isothermal titration microcalorimetry. Intrinsic protein fluorescence titration experiments for AgtB yielded apparent dissociation constant K_D values of $1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ with agropine. No interaction could be measured between AgaA and agropine. In contrast, AgaA and AgtB share a similar affinity in the nanomolar range for agropinic acid (47 ± 5.6 and 67 ± 10.6 nM, respectively), showing that both PBPs are efficient for agropinic acid binding (Figure 2). Using isothermal titration microcalorimetry, very similar K_D values were obtained (Figure 2). The microcalorimetry data confirmed the 1 : 1 binding stoichiometry for both AgtB and AgaA, and revealed a negative enthalpy change for all ligands, meaning that the binding was enthalpy-driven, involving polar interactions mainly. No interaction between each protein and mannopine or mannopinic acid could be measured.

PBP AgtB is responsible for agropine uptake

The octopine-mannityl-type *A. tumefaciens* R10 strain was from our laboratory collection. The non-polar R10 Δ agtB mutant corresponds to a mutant defective for AgtB, i.e. a strain in which the sole agtB gene is deleted with no effect on the expression of the downstream genes, when compared with the wild-type (WT) R10 strain. The growth profiles of WT and R10 Δ agtB were compared in minimal medium containing agropinic acid or freshly purified agropine as the sole source of carbon/nitrogen or no carbon/nitrogen source (Figure 3). Under these conditions, both the R10 Δ agtB mutant and the WT strains grew on agropinic acid, suggesting that another transport system can uptake agropinic acid in line with the presence of the PBP AgaA. In contrast with what was observed for the WT strain, the R10 Δ agtB mutant did not grow on agropine during the first 50 h. After 50 h, growth was observed for the mutant due to the appearance of agropinic acid in the media, a feature that we verified by mass spectrometry. This presence of agropinic acid originated from spontaneous lactamization of agropine in line with what has been previously observed and reported [6,14]. Therefore, AgtB associated with its ABC transporter is the sole transport system responsible for the uptake and assimilation of agropine in pure culture.

Ligand-binding site of AgtB: a PBP from cluster D

The mature AgtB expression plasmid was a synthetic gene lacking the first 29 signal sequence residues that serve for the localization to the bacterial periplasm. Nonetheless, the expressed protein contains an N-terminal sequence of 20 residues corresponding to cloning artifact including a His-tag. The first X-ray structure of the liganded AgtB was determined at 1.74 Å resolution in *P1* space group (Table 1) by molecular replacement using the coordinates of the N- and C-terminal domains of the PBP MotA (PDB: 5L9G) [21] as search models. The liganded crystal contains five very similar molecules in the asymmetric unit as indicates the average root-mean-square deviation (RMSD) of 0.39 Å for all C α atoms. Because electron density maps were of high resolution, they revealed the structure of a ligand bound between the two closed lobes of AgtB. It was an agropinic acid molecule with a very well-defined oxoproline ring, no agropine as expected. The mass spectrometry analysis of the agropine solution used for the first AgtB–agropine co-crystallization trials revealed the presence of both agropine and agropinic acid. Using freshly purified agropine, we screened additional crystallization conditions to obtain an AgtB–agropine complex. New crystals appeared within 2 weeks. A second structure in a different space group (*C2*) at 1.9 Å resolution also revealed the presence of a bound agropinic acid. The asymmetric unit contains two similar AgtB–agropinic acid molecules. We determined at 1.4 Å resolution in *P2*₁*2*₁*2*₁ the structure of AgtB co-crystallized with agropinic acid. One molecule is present in the asymmetric unit. The monomeric AgtB of 343 amino acids possesses a typical fold of cluster D within the PBP structural classification [39] (Figure 4A). The N-terminal lobe consists of residues (30–127 and



Protein Ligand	Fluorescence		ITC					
	K_D	R^2	K_D	n	Enthalpy (ΔH)	Entropy (ΔS)	Entropic contribu- tion ($-T\Delta S$)	Free energy (ΔG)
	<i>nM</i>		<i>nM</i>		<i>cal/mol</i>	<i>cal/mol/deg</i>	<i>cal/mol</i>	<i>cal/mol</i>
AgaA								
Agropinic acid	67 ± 10.6	0.96	72.5 ± 7.7	0.87	-9749	-0.56	164	-9585
AgtB								
Agropine	1451 ± 193	0.98	1831 ± 169	1.01	-9840	-7.32	2145	-7695
Agropinic acid	47 ± 5.6	0.99	65 ± 18	1.05	-14940	-18.1	5306	-9634

Figure 2. ITC and fluorescence K_D measurements of AgtB and AgaA towards agropine/agropinic acid.

The top graphs show fluorescence monitoring of each protein upon titration with each ligand and fit (solid line) to a single-binding model using Origin 7. Measures were done in triplicate. The lower graphs correspond to microcalorimetry experiments. The top panel shows heat differences upon injection of ligand and the low panel shows integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single-binding model using Microcal ORIGIN. ITC experiments were performed twice. Calculated parameters for each experiment are indicated in a table.

253–342), and the C-terminal lobe comprises the residues 133–247. Two short segments define the hinge region connecting the two lobes.

All the liganded AgtB structures are very similar to the bound agropinic acid making the same numerous direct interactions with AgtB or via water molecules. The oxoproline ring of the agropinic acid is surrounded by two aromatic residues (Tyr37 and Phe130), and forms six H-bonds involving its carbonyl group and the side chains of Tyr37, Glu252 and Glu89 as well as its carboxylate group and the side chains of Arg229 and Tyr288 (Figure 4B). Glu89 appears to be a critical amino acid as its side chain maintains both the oxoproline

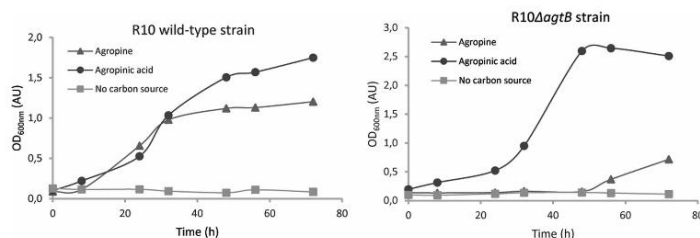


Figure 3. AgtB involvement in agropine consumption.

Four days' growth (OD at 600 nm) of *A. tumefaciens* R10 WT strain (top panel) and the R10 Δ agtB mutant (bottom panel) in AB minimal medium supplemented with agropine (▲) or agropinic acid (●) as carbon/nitrogen sources and in the absence of any carbon/nitrogen source (■). Analyses were performed in three replicates.

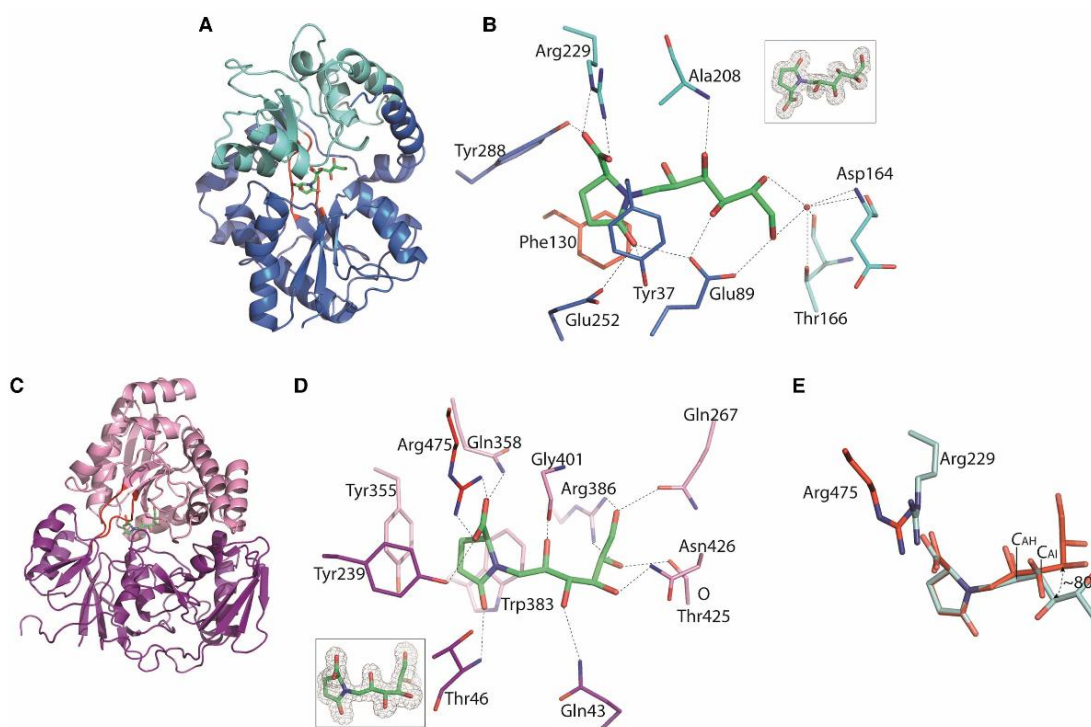


Figure 4. Ribbon representation of AgtB and AgaA structures and their ligand-binding sites.

(A) Agropinic acid in green is located in the cleft of AgtB between the lobes 1 and 2 shown in cyan and in blue, respectively, and the hinge region is in red. (B) Agropinic acid bound to the binding site of AgtB is shown in the same code color as in (A). Hydrogen bonds between AgtB and its ligand are shown as dashed lines in black (distances are up to 3.2 Å). The ligand is shown in its annealing $F_o - F_c$ omit map contoured at 4σ . (C) Agropinic acid in green is located in the cleft of AgaA between the lobes 1 and 2 shown in purple and in pink, respectively, and the hinge region is in red. (D) Agropinic acid bound to the binding site of AgaA is shown in the same code color as in (C). Hydrogen bonds between AgaA and its ligand are shown as dashed lines in black (distances are up to 3.2 Å). The ligand is shown in its annealing $F_o - F_c$ omit map contoured at 4σ . (E) Superposition of the bound agropinic acid in AgtB (cyan) and in AgaA (red) showing one functionally conserved residue. A rotation of $\sim 80^\circ$ around the carbon-bond $C_{AH} - C_{AI}$ between both sugar moieties of agropinic acid is observed.

ring and the deoxymannosyl (sugar) part of the ligand through three H-bonds. The deoxymannosyl part of agropinic acid interacts with the main chain amino group of Ala208 and with five water molecules. Only one of these is shown in Figure 4B, which establishes the most numerous polar interactions, involving the main

chain of Asp164 as well as the carbonyl main chain and the side chain of Thr166. Although the oxoproline part of agropinic acid is well maintained in the binding site, no interaction was measured by fluorescence between AgaA and a single oxoproline residue, suggesting the requirement of the sugar part for the ligand binding.

SSM-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>) reports the PBPs MotA (PDB: 5L9G) and *A. tumefaciens* C58 Atu4243 with GABA (PDB: 4EUO) as structurally closest to AgtB with RMSD lower than 2: 1.56 Å over 283 C α atoms with 31% sequence identity and 1.65 Å over 301 C α atoms with 33% sequence identity, respectively. Although AgtB and MotA bind opines from the same opine family, their ligand-binding sites have one residue in common corresponding to Arg229 in AgtB and Arg238 in MotA, which locks the carboxylate group of the ligand. Upon superposition of both liganded MotA and AgtB structures, the presence of the tryptophans cluster at positions 165, 214 and 235 in MotA would prevent the binding of agropinic acid to MotA due to steric hindrance with the deoxymannosyl moiety (Supplementary Figure S1). In the same way, AgtB could not bind mannopine as observed in MotA because the glutamine part of mannopine would make steric hindrance with Met128 and Tyr288 (Ser128 and Thr297 in MotA, respectively), and the presence of Tyr37 in AgtB (Ser37 in MotA) would also create a steric clash with the deoxymannosyl moiety of mannopine (Supplementary Figure S1). The ligand-binding sites between AgtB and the GABA-binding Atu4243 share three residues: Glu89, Arg229 and Tyr288 in AgtB, which are Glu82, Arg225 and Tyr284 in Atu4243. Atu4243 presents a narrow pocket adapted for a selective GABA-binding due to the presence of several aromatic residues making van der Waals contacts and restricting the size of the ligand-binding site to accommodate GABA. As observed for MotA, AgtB possesses a larger binding site compared with Atu4243 preventing GABA binding.

Ligand-binding site of AgaA: a PBP from cluster C

The mature AgaA expression plasmid was obtained by cloning the *agaA* gene lacking the nucleotides corresponding to the first 24 signal sequence residues that serve for localization to bacterial periplasm. The X-ray structure of the liganded AgaA with agropinic acid was determined at 1.65 Å resolution (Table 1) by molecular replacement using the coordinates of the N- and C-terminal domains of a partial model of AgaA built from the *E. coli* putative-binding protein Ylib (PDB: 1UQW) as search models. The liganded crystal contained one molecule in the asymmetric unit. AgaA is a monomer of 493 residues composed of two lobes, each formed by a central β -sheet flanked by α -helices (Figure 4C). The biggest lobe (lobe 1) consists of residues 25–258 and 479–509, and the smallest (lobe 2) comprises the residues 264–473. Two short segments define the hinge region connecting the two lobes. AgaA fold belongs to the cluster C within the PBP structural classification [39] as SSM-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>) reports: RMSD between AgaA and similar PBP structures binding oligopeptide range from 1.85 to 2.6 Å over 423–456 residues. A detailed structural comparison is irrelevant because AgaA presents a distinct ligand-binding site.

The agropinic acid bound between the two lobes of AgaA is well defined in the electron density maps and is surrounded by Gln43, Thr46, Tyr239, Gln267, Tyr355, Gln358, Trp383, Arg386, Gly401, Thr425, Asn426 and Arg475 residues (Figure 4D). The oxoproline part of the ligand, wedged between the aromatic residues Tyr239, Tyr355 and Trp383, interacts via its carboxylate group with the guanidinium group of Arg475 and the side chains of Gln358 and Tyr239, and via its carbonyl group with Thr46. Each hydroxyl group of the ligand deoxymannosyl moiety makes at least one H-bond with AgaA involving five side chains (Gln43, Gln267, Arg386, Thr425 and Asn426) and the main chain carbonyl of Gly401. As observed for AgtB, although the oxoproline part of agropinic acid is well held in the binding site, no interaction was measured by fluorescence between AgaA and a single oxoproline residue, suggesting that the sugar part is strictly needed for ligand binding.

Comparison between AgtB and AgaA structures

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

Superimposed AgtB–agropinic acid and AgaA–agropinic acid structures according to their ligand show no structurally common residue in the binding site. However, Arg229 residue in AgtB and Arg475 in AgaA conserved the same function in both proteins: their guanidinium group makes two interactions with the carboxylate group of the agropinic acid (Figure 4E). The curvature of the sugar moiety of agropinic acid in AgtB differs in AgaA by a rotation of $\sim 80^\circ$ around the carbon-bond C_{AH}–C_{AI}, while the oxoproline moiety of the ligand adopts a similar conformation in both PBPs.

Agtb is present in a few bacteria only

Searching for AgtB conservation in the bacterial kingdom (protein database at NCBI) and subsequent topology analysis revealed the existence of 18 PBPs with sequences at least 65% identical with that of AgtB from strain R10 and the occurrence of clades (Figure 5). One of these, termed the AgtB clade, contains AgtB R10 and 9 highly similar orthologues sharing 93% sequence identity. It encompasses octopine/mannityl-opine-type (R10, B6, Ach5 and TT111), agropinopine/mannityl-opine-type (Bo542, ATAM) *A. tumefaciens* strains and other plant-associated bacteria such as *Rhizobium* sp. and *R. rhizogenes* (formerly *A. rhizogenes*). More distantly related (73% sequence identity), AgtB proteins from the *Agrobacterium larrymoorei* strain ATCC 51759 and β -proteobacteria *Burkholderia* sp. strain PAMC 26561 seem capable of binding agropine and agropinic acid. All the above-mentioned bacteria possess the agropinic acid-binding signature of seven amino acids: Tyr37, Glu89, Phe130, Ala208, Arg229, Glu252 and Tyr288. Outside the AgtB clade, AgtB orthologues were detected in the *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Polaromonas*, *Ensifer* and *Sinorhizobium* genera. In these bacteria, the signature slightly degenerates. Modeling indicates that the binding may not be affected. The binding signature, however, appears strongly degenerated in MotA, a PBP that displayed only 31% sequence identity with AgtB.

AgaA is conserved among rhizobiales

Searching for AgaA conservation leads to the identification of 72 PBPs with sequences at least 40% identical with that of AgaA from strain R10 and to the delineation of the AgaA clade with a solid bootstrap value of 100% containing the highly AgaA-similar PBPs (14 in total) that share more than 91% sequence identity (Figure 6). All of them are described as agropinic acid-binding proteins and display an agropinic acid-binding signature composed of 12 amino acids: Gln43, Thr46, Tyr239, Gln267, Tyr355, Gln/His358, Trp383, Arg386, Gly401, Thr425, Asn426 and Arg475. Residue 358 can be a glutamine (five PBPs) or histidine (nine PBPs); these two residues assume the same role toward the ligand. They all belong to *Agrobacterium* and *Rhizobium* genera. In the nearest subgroup (8 PBPs) that gathers sequences from the *Rhizobium* and *Neorhizobium*

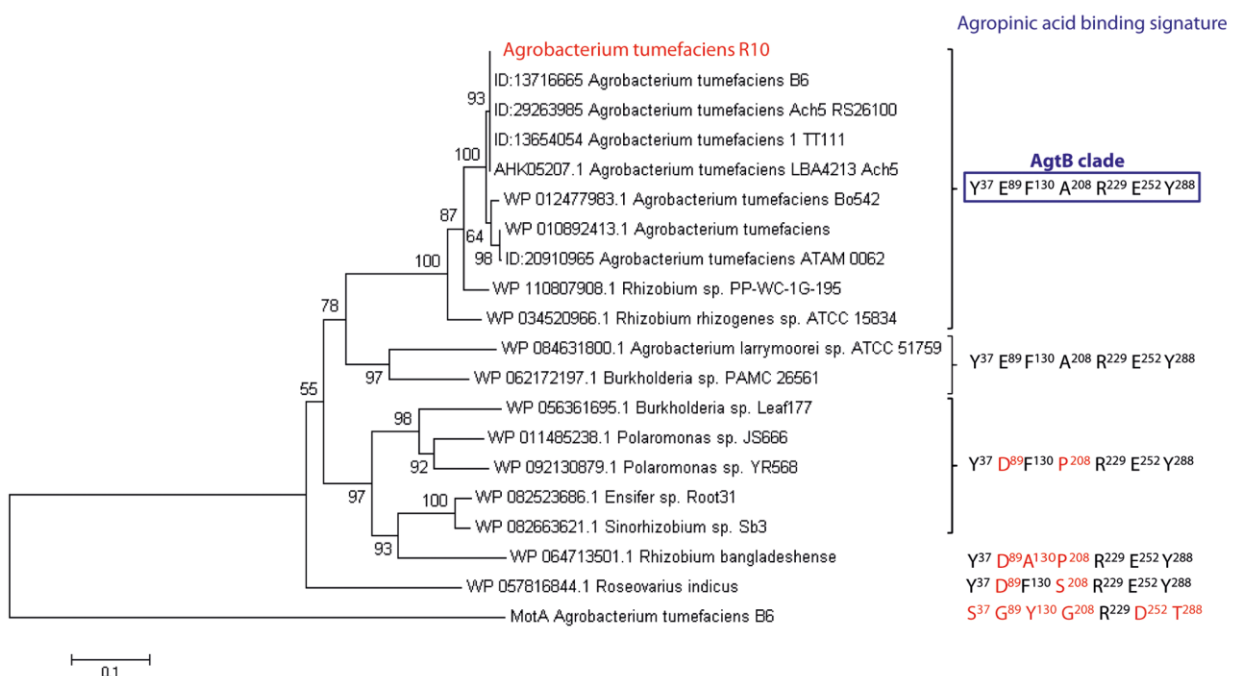


Figure 5. Distance tree and AgtB-binding signature.

For each protein clade, the residues, which are identical with (black) and different from (red) those involved in the agropinic acid binding of *A. tumefaciens* R10 AgtB, are indicated. The sequence distances were computed using the Poisson correction method and are in units of the number of amino acid substitutions per site.

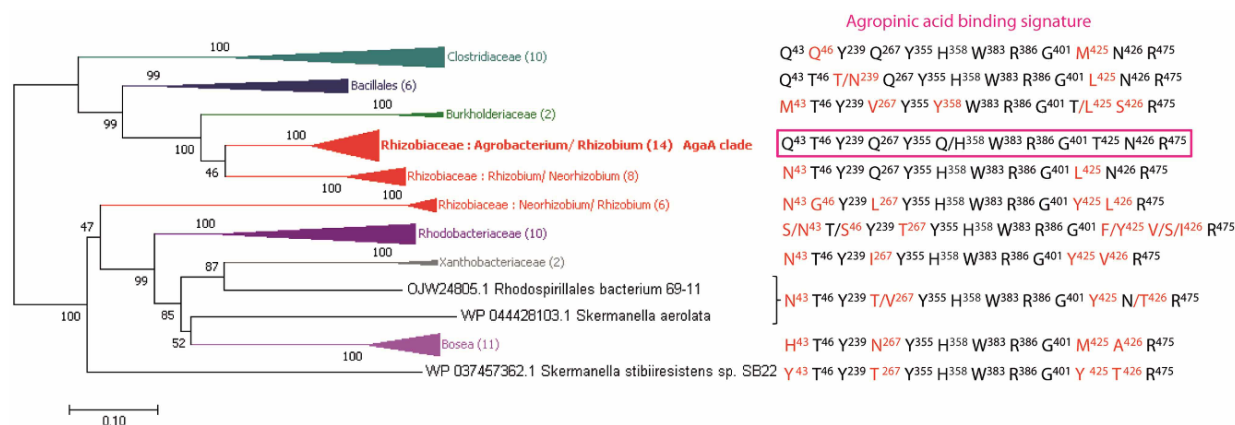


Figure 6. Distance tree and AgaA-binding signature.

For each protein clade, the residues, which are identical with (black) and different from (red) those involved in the agropinic acid binding of *A. tumefaciens* R10 AgaA, are indicated. Number in bracket represents the number of AgaA-related PBPs per clade. The sequence distances were computed using the Poisson correction method and are in units of the number of amino acid substitutions per site.

genera, the only changes observed in PBPs were the replacement of Thr425 by Leu425 and that of Gln43 by Asn43 in the binding signature. These two changes should not alter the binding of agropinic acid, as modeling revealed. Outside the AgaA clade and its closest group, the signature degenerates with changes that should alter the agropinic acid binding.

Discussion

Ti plasmid genes drive the synthesis (in the plant cells) and assimilation (in the bacterial cells) of opines that are instrumental in the construction of the ecological niche of *Agrobacterium*. The mannityl-opine family gathers four opines: mannopine, mannopinic acid, agropine and agropinic acid. Mannopine and mannopinic acid are imine conjugates of mannose and glutamine or glutamate, respectively. Agropine is a cyclized derivative (a lactone) of mannopine and agropinic acid (a lactam) is generated non-enzymatically from the three other mannityl opines by spontaneous rearrangements [6,14]. We focused on these two latter opines because molecular and structural data on their transporter in pathogenic agrobacteria were missing, in contrast with the characterized PBP MotA involved in mannopine transport [21].

Previous genetic experiments have shown that agropine and agropinic acid should be imported into agrobacteria via the AgtB- and AgaA-mediated transport system, respectively [23,26,27,40,41]. This work reveals the structural basis of the PBPs AgtB and AgaA, which belong to two different structural clusters [39] and are determined by genes located in two different regions of Ti-plasmids of octopine/mannityl-opine-type and agropine/mannityl-opines-type *Agrobacterium* strains. Using a genetic approach and growth assays, we showed that the presence of AgtB is compulsory for the binding and assimilation of the opine agropine. Using two different biophysical methods, we demonstrated that AgtB can bind agropine with an affinity in the micromolar range. An unexpected outcome of our study was that AgtB can also bind agropinic acid. Remarkably indeed, AgtB that so far appears to be the sole agrobacterial agropine transporter is not selective for agropine since it displays an affinity for agropinic acid 30-fold higher than that for agropine. This feature does not impair *Agrobacterium* ability to take up and utilize agropine because agropine is the precursor of agropinic acid and because the uptake of agropine is a process faster than the lactamization. In agreement, in young tumors induced by octopine/mannityl-opine-type *Agrobacterium* strains (R10/B6 strains), the main mannityl opines are agropine, mannopine and mannopinic acid, agropinic acid being barely detectable ([42] and Dessaux, unpublished results). The main role of AgtB would therefore be the transport of the abundant agropine in the first stage of tumor formation, i.e. as soon as this opine is produced.

But, the PBP AgaA recognizes agropinic acid as a unique ligand and displays a high affinity for it. Thus, the plant pathogen *A. tumefaciens* strains R10/B6 possess two Ti plasmid regions for agropinic acid import/degradation and exhibit two agropinic acid-binding PBPs, each with its own molecular signature characterized from

the high-resolution crystal structures. Similarly, two pathways/regions (suggesting two PBPs) were reported for mannopinic acid assimilation using genetic approaches: one specific and the other unspecific [23,27,43]. Therefore, two uptake systems coexist for each agropinic and mannopinic acid. Nonetheless, they are differently regulated. Indeed, genes of the specific region containing the determinants of the PBPs AgaA and MoaA for agropinic and mannopinic acids uptake, respectively, are inducible by these two opines, while the nonspecific ones containing the genes coding the PBPs AgtB and likely MotA for agropinic and mannopinic acids uptake, respectively, are inducible by mannopine and agropine. Though this global scheme seems to be well established, the fine regulation of mannityl-opines utilization is still unclear, partly due to the complexity in the organization of the genes, the imbrication of the transport and catabolic pathways, and the lack of molecular and structural data on the numerous transcriptional regulators controlling these functions.

It was tempting to speculate that the occurrence of two PBPs (AgtB and AgaA) capable of transporting efficiently agropinic acid might correlate with an abundance of agropinic acid in the tumor resulting from the spontaneous degradation of the other mannityl opines. As indicated above, however, agropinic acid is not the most abundant opine in young tumors, but it is eventually present in concentrations equivalent to those of the other mannityl opines in aging tumors ([42] and Dessaux, unpublished results). A dual uptake system for agropinic acid that involves high-affinity transporters may therefore provide a selective advantage for pathogenic agrobacteria in this environment, mostly considering that bacterial competitors of *Agrobacterium* are more frequently prone to use agropinic acid than agropine (Dessaux, unpublished results). Agropinic acid uptake therefore remain essential for agrobacteria to assimilate this opine and maintain their competitiveness in the tumor environment where the substantial production of mannityl opines [14] contributes to the establishment of the ecological niche of agrobacteria [44].

On the structural point of view, all attempts to obtain agropine bound to AgtB failed due to (i) the instability of agropine in the time course of crystallization process, which lasts for 10–15 days and to (ii) a better affinity of AgtB for agropinic acid. Co-crystallization with agropine led to different crystal forms with agropinic acid bound to AgtB. Nevertheless, it was straightforward to model manually an agropine at the position of the observed bound agropinic acid as both ligands share a common sugar moiety, which has served as a guide to anchor the ligand in the ligand-binding site (Supplementary Figure S2). This revealed that the ligand-binding site of AgtB can accommodate agropine. If the co-crystals of AgtB–agropine could appear in a short time (e.g. few hours), the structure of AgtB with agropine could be determined.

Database Depositions

The atomic coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank under PDB: 6HLY, 6HLZ and 6HM2 for AgtB with agropinic acid in *P*₂₁₂₁₂₁, *C*₂ and *P*₁, respectively, and PDB: 6HLX for AgaA with agropinic acid.

Abbreviations

ABC, ATP-binding cassette; PBP, periplasmic-binding protein; RMSD, root-mean-square deviation; WT, wild-type.

Author Contribution

Y.D. provided the agropine, agropinic acid, mannopine and mannopinic acid compounds and information on their metabolism and related determinants. F.P. purified agropine. T.M. and C.L. performed the non-polar AgtB mutant. A.V. performed the growth assays. L.M., A.V. and S.M. performed all the crystallography work. L.M. and A.V. performed the fluorescence assays. M.A.-N. performed the microcalorimetry experiments. A.V. and S.M. performed the phylogenetic analysis. S.M. wrote the manuscript. All the authors discussed the results and contributed to the writing of the manuscript.

Funding

T.M. received a doctoral grant from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. L.M., A.V. and S.M. were supported by CNRS and ANR-Blanc SENSOR [ANR-12-BSV8-0003-01/02/03]. This work benefited from the I2BC crystallization and microcalorimetry platforms and from the server @TOME-2, all supported by FRISBI ANR-10-INSB-05-01 and the I2BC mass spectrometry SiCaPS platform.

Acknowledgements

We acknowledge SOLEIL for the provision of synchrotron radiation facilities (proposal ID: 20130869, 20140774 and 20160782) in using Proxima beamlines. We deeply thank Ricardo Rodriguez de la Vega (ESE, Orsay) for his helpful discussion on tree construction.

Competing Interests

The Authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

References

- 1 Nester, E.W. (2014) Agrobacterium: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.* **5**, 730 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- 2 Dessaux, Y. and Faure, D. (2018) Niche construction and exploitation by *Agrobacterium*: how to survive and face competition in soil and plant habitats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **418**, 55–86 https://doi.org/10.1007/82_2018_83
- 3 Pitzschke, A. and Hirt, H. (2010) New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J.* **29**, 1021–1032 <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.8>
- 4 Gelvin, S.B. (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 16–37 <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- 5 Tempé, J. and Petit, A. (1983) La piste des opines. In *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* (Pühler, A., ed.), pp. 14–32, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- 6 Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K. and Murphy, P.J. (1998) Opines and opine-like molecules involved in plant–rhizobiaceae interactions. In *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., eds.), pp. 173–197, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands
- 7 Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M. et al. (1979) Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **204**, 251–266 <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0026>
- 8 Wilson, M., Savka, M.A., Hwang, I., Farrand, S.K. and Lindow, S.E. (1995) Altered epiphytic colonization of mannitol opine-producing transgenic tobacco plants by a mannitol opine-catabolizing strain of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2151–2158 PMID:16535040
- 9 Savka, M.A. and Farrand, S.K. (1997) Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nat. Biotechnol.* **15**, 363–368 <https://doi.org/10.1038/nbt0497-363>
- 10 Oger, P., Petit, A. and Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nat. Biotechnol.* **15**, 369–372 <https://doi.org/10.1038/nbt0497-369>
- 11 Guyon, P., Petit, A., Tempé, J. and Dessaux, Y. (1993) Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 92–98 <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-092>
- 12 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 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004444>
- 13 El Sahili, A., Li, S.Z., Lang, J., Virus, C., Planamente, S., Ahmar, M. et al. (2015) A pyranose-2-phosphate motif is responsible for both antibiotic import and quorum-sensing regulation in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog.* **11**, e1005071 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005071>
- 14 Tate, M.E., Ellis, J.G., Kerr, A., Tempé, J., Murray, K.E. and Shaw, K.J. (1982) Agropine: a revised structure. *Carbohydr. Res.* **104**, 105–120 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82224-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82224-7)
- 15 Dessaux, Y., Guyon, P., Farrand, S.K., Petit, A. and Tempé, J. (1986) Agrobacterium Ti and Ri plasmids specify enzymic lactonization of mannopine to agropine. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2549–2559 <https://doi.org/10.1099/00221287-132-9-2549>
- 16 Hong, S.B., Hwang, I., Dessaux, Y., Guyon, P., Kim, K.S. and Farrand, S.K. (1997) A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by Agrobacterium strains. *J. Bacteriol.* **179**, 4831–4840 <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4831-4840.1997>
- 17 Hong, S.B. and Farrand, S.K. (1994) Functional role of the Ti plasmid-encoded catabolic mannopine cyclase in mannitol opine catabolism by Agrobacterium spp. *J. Bacteriol.* **176**, 3576–3583 <https://doi.org/10.1128/jb.176.12.3576-3583.1994>
- 18 Klapwijk, P.M., Oudshorn, M. and Schilperoort, R.A. (1977) Unducible permease involved in the uptake of octopine, lysopine and octopinic acid by *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying virulence-associated plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 1–11 <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-1>
- 19 Klapwijk, P.M., Scheulderman, T. and Schilperoort, R.A. (1978) Co-ordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for a common regulatory gene and separate operons. *J. Bacteriol.* **136**, 775–785 PMID:711678
- 20 Chilton, W.S. and Chilton, M.D. (1984) Mannitol opine analogs allow isolation of catabolic pathway regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **158**, 650–658 PMID:6427182
- 21 Marty, L., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Faure, D. and Morera, S. (2016) Structural basis for high specificity of amadori compound and mannopine opine binding in bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* **291**, 22638–22649 <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.745562>
- 22 Vigouroux, A., El Sahili, A., Lang, J., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Faure, D. et al. (2017) Structural basis for high specificity of octopine binding in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci. Rep.* **7**, 18033 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18243-8>
- 23 Dessaux, Y., Tempé, J. and Farrand, S.K. (1987) Genetic analysis of mannitol opine catabolism in octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* strain 15955. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 301–308 <https://doi.org/10.1007/BF00330457>
- 24 Farrand, S.K., Tempé, J. and Dessaux, Y. (1990) Localization and characterization of the region encoding catabolism of mannopinic acid from the octopine-type Ti plasmid pT15955. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 259–267 <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-259>
- 25 Kim, K.S., Chilton, W.S. and Farrand, S.K. (1996) A Ti plasmid-encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region-encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors. *J. Bacteriol.* **178**, 3285–3292 <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3285-3292.1996>

- 26 Oger, P., Kim, K.S., Sackett, R.L., Piper, K.R. and Farrand, S.K. (1998) Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of *traR*, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol. Microbiol.* **27**, 277–288 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00671.x>
- 27 Lyi, S.M., Jafri, S. and Winans, S.C. (1999) Mannopinic acid and agropinic acid catabolism region of the octopine-type Ti plasmid pTi15955. *Mol. Microbiol.* **31**, 339–347 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01178.x>
- 28 Meyer, T., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Comte, G., Vial, L., Lavire, C. et al. (2018) The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. *J. Biol. Chem.* **293**, 7930–7941 <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001856>
- 29 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 [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)
- 30 Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- 31 McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- 32 Pons, J.L. and Labesse, G. (2009) @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res.* **37**, W485–W491 <https://doi.org/10.1093/nar/gkp368>
- 33 Canutescu, A.A., Shelenkov, A.A. and Dunbrack, Jr, R.L. (2003) A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci.* **12**, 2001–2014 <https://doi.org/10.1110/ps.03154503>
- 34 Blanc, E., Roversi, P., Vornrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M. and Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2210–2221 <https://doi.org/10.1107/S0907444904016427>
- 35 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- 36 Schuttelkopf, A.W. and van Aalten, D.M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1355–1363 <https://doi.org/10.1107/S0907444904011679>
- 37 Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. and Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90213-3)
- 38 Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 39 Berntsson, R.P., Smits, S.H., Schmitt, L., Slotboom, D.J. and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **584**, 2606–2617 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043>
- 40 Hong, S.B., Dessaux, Y., Chilton, W.S. and Farrand, S.K. (1993) Organization and regulation of the mannopine cyclase-associated opine catabolism genes in *Agrobacterium tumefaciens* 15955. *J. Bacteriol.* **175**, 401–410 <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.401-410.1993>
- 41 Kim, K.S. and Farrand, S.K. (1996) Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. *J. Bacteriol.* **178**, 3275–3284 <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3275-3284.1996>
- 42 Scott, I.M., Firmin, J.L., Butcher, D.N., Searle, L.M., Sogoke, A.K., Eagles, J. et al. (1979) Analysis of a range of crown gall and normal plant tissues for Ti plasmid-determined compounds. *Mol. Gen. Genet.* **176**, 57–65 <https://doi.org/10.1007/BF00334296>
- 43 Dessaux, Y., Guyon, P., Petit, A., Tempe, J., Demarez, M., Legrain, C. et al. (1988) Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation. *J. Bacteriol.* **170**, 2939–2946 <https://doi.org/10.1128/jb.170.7.2939-2946.1988>
- 44 Guyon, P., Chilton, M.D., Petit, A. and Tempe, J. (1980) Agropine in 'null-type' crown gall tumors: evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 2693–2697 <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2693>
- 45 Karplus, P.A. and Diederichs, K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030–1033 <https://doi.org/10.1126/science.1218231>
- 46 Chen, V.B., Arendall, III, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J. et al. (2010) Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>

Article 2: Import pathways of the four mannityl-opines into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*: structural, affinity and in vivo approaches.

Research Article

Import pathways of the mannityl-opines into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*: structural, affinity and *in vivo* approaches

Armelle Vigouroux^{1,*}, Jeanne Doré^{2,*}, Loïc Marty¹, Magali Aumont-Nicaise¹, Pierre Legrand³, Yves Dessaux¹, Ludovic Vial² and Solange Moréra¹

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France; ²Ecologie Microbienne, CNRS, UMR 5557, INRA, UMR 1418, Université Lyon 1, Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne, Lyon, France; ³Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint Aubin BP48, Gif-sur-Yvette 91192, France

Correspondence: Solange Moréra (solange.morera@i2bc.paris-saclay.fr)

Agrobacterium tumefaciens pathogens use specific compounds denoted opines as nutrients in their plant tumor niche. These opines are produced by the host plant cells genetically modified by agrobacteria. They are imported into bacteria via solute-binding proteins (SBPs) in association with ATP-binding cassette transporters. The mannityl-opine family encompasses mannopine, mannopinic acid, agropine and agropinic acid. Structural and affinity data on mannopinic acid bound to SBPs are currently lacking while those of the three others mannityl opines are available. We investigated the molecular basis of two pathways for mannopinic acid uptake. MoaA was proposed as the specific SBP for mannopinic acid import in mannityl opines-assimilating agrobacteria, which was validated here using genetic studies and affinity measurements. We structurally characterized the mannopinic acid-binding mode of MoaA in two crystal forms at 2.05 and 1.57 Å resolution. We demonstrated that the non-specific SBP MotA, so far characterized as mannopine and Amadori compound importer, was also able to transport mannopinic acid. The structure of MotA bound to mannopinic acid at 2.2 Å resolution defines a different mannopinic acid-binding signature, similar to that of mannopine. Combining *in vitro* and *in vivo* approaches, this work allowed us to complete the characterization of the mannityl-opines assimilation pathways, highlighting the important role of two dual imports of agropinic and mannopinic acids. Our data shed new light on how the mannityl-opines contribute to the establishment of the ecological niche of agrobacteria from the early to the late stages of tumor development.

Introduction

Pathogenic agrobacteria harbor a tumor-inducing (Ti) plasmid [1,2], and transfer a portion of this, namely the T-DNA, to the plant cells upon infection [3,4]. In a wide range of mostly dicotyledoneous plants, this allows the creation of an ecological niche (called tumor niche or opine niche) for the agrobacteria, characterized by the formation of a tumor [1]. The expression of T-DNA genes in plants drives the synthesis of (i), plant hormones responsible for the tumor formation (crown-gall disease) and (ii) novel organic compounds called opines. Opines are either sugar-phosphodiester or the products of condensed amino acids with ketoacids or sugars [2,5,6]. They are specifically utilized as nutrients by the inciting agrobacteria and confer upon these pathogens an advantage when in competition with other members of the soil microflora for the colonization of opine-rich environments [7–12]. Some opines, designated conjugative opines, such as octopine or agrocinopine (actually only the arabinose-2-phosphate moiety of the agrocinopine is recognized) [13], stimulate the horizontal transfer (conjugative transfer) of the Ti-plasmid from pathogenic *Agrobacterium* to non-pathogenic *Agrobacterium* [6].

*These authors contributed equally to this article.

Received: 28 November 2019
Revised: 8 January 2020
Accepted: 10 January 2020

Accepted Manuscript online:
10 January 2020
Version of Record published:
6 February 2020

Over 20 opines have been identified in *Agrobacterium*-induced plant tumors. They fall into distinct families according to their precursors, which are sugars, amino acids and ketoacids. They are not all present at the same time in a tumor, and opine contents as well as opine degradation properties are specific for a given Ti-plasmid. For example, *Agrobacterium tumefaciens* strains B6 and R10 possess Ti plasmid genes that code for enzymes responsible for the synthesis of the mannityl-opines, a group composed of four compounds containing mannose conjugated with either glutamate or glutamine. Mannopine (1-deoxy-mannosyl-glutamine) and mannopinic acid (1-deoxy-mannosyl-glutamate) are unmodified conjugates while agropine (1-deoxy-mannitoyl-glutamine,1',2'-lactone) and agropinic acid (1-deoxy-mannosyl-glutamate lactam) are cyclized derivatives of mannopine [14] (Figure 1). Agropine is formed from mannopine [15,16], while mannopine and mannopinic acid are formed from a precursor from the chrysopine opine family, named 1-deoxy-fructosyl-glutamine (DFG) and 1-deoxy-fructosyl-glutamate (DFGA), respectively [17]. DFG and DFGA are known as Amadori compounds (a name used for any derivative of aminodeoxysugars) present in decaying plant materials. They differ only in their amino-acid moiety (glutamine versus glutamate). Notably, mannopine and agropine can quickly degrade into agropinic acid (mannityl-glutamic acid lactam) through a spontaneous lactamization whereas mannopinic acid does it only slowly [6,14].

Opine catabolic genes (import and degradation) are located in segments outside the T-DNA region on the Ti-plasmid. They are generally clustered in operons and regulons, and their expression is inducible by the opine itself or a catabolized/degraded form of it [6,13,18–20]. Two sets of genes are present in the catabolic region. The first one encodes the transport system that often consists in an ATP-binding cassette (ABC) transporter and its cognate periplasmic-binding protein, commonly named solute-binding protein (SBP). The second encodes the enzymes involved in the degradation of the opines to molecules that belong to central bacterial metabolism. To date, we have characterized three mannityl-opine binding SBPs: MotA (mannopine opine import), AgtB (agropine and agropinic acid opines import) and AgaA (agropinic acid opine import) (Figure 1) [21,22]. Only one mannityl-opine compound i.e. mannopinic acid, remained structurally unstudied with SBPs so far.

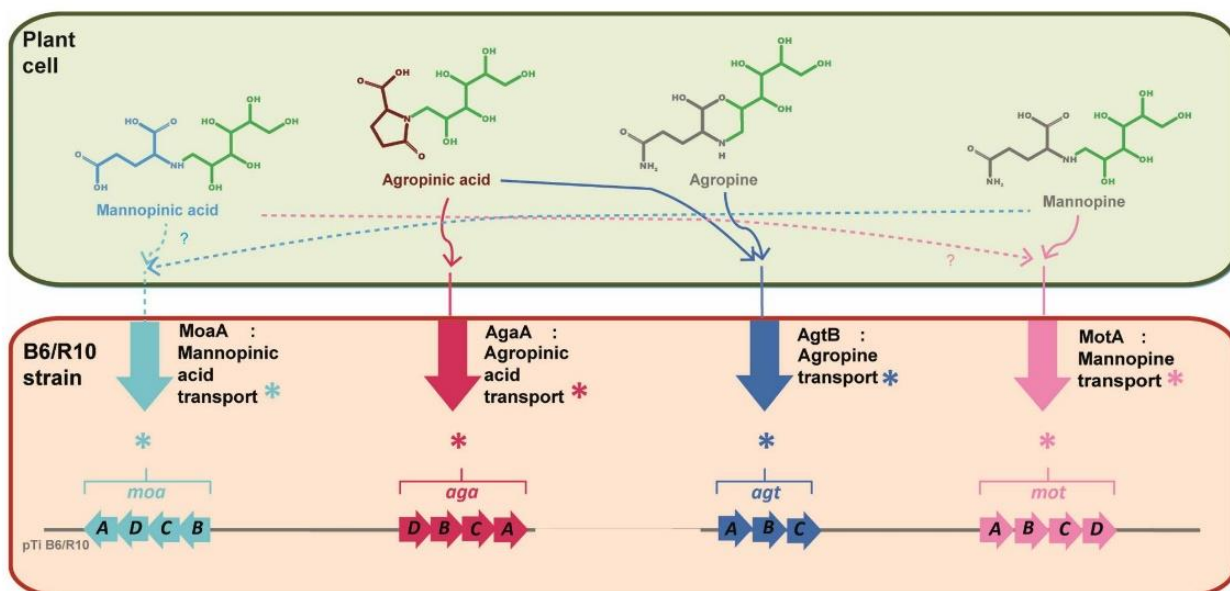


Figure 1. Transport of mannopine, agropine (both gray and green), agropinic acid (dark orange and green) and mannopinic acid (blue and green) from transformed plant cells to *A. tumefaciens* octopine/mannityl-type R10/B6 strain.

In plant tumor cells, all the genes allowing the synthesis of mannopine, mannopinic acid and agropine are located on the T-DNA incorporated into the plant genome. Agropinic acid results from the spontaneous lactamization of the three other mannityl opines: agropine, mannopine and mannopinic acid. In *A. tumefaciens* R10/B6, the (*motA-D*) genes located on the Ti plasmid, are shown in pink code for DFG and mannopine import [21]. The (*agtABC*) and (*agaA-D*) genes coding for agropine/agropinic acid and agropinic acid import [22], respectively, are shown in blue and magenta. The (*moaA-D*) genes located on the Ti plasmid are proposed as encoding mannopinic acid import and are shown in cyan.

To finalize our work on mannityl-opine import into pathogenic agrobacteria, we investigated the transport system of mannopinic acid and the structural and biochemical properties of the SBP MoaA, which was predicted as a mannopinic acid-binding protein. This prediction results from genetic investigations (mapping of gene regions) and opine uptake/transport experiments [23–27]. We first focused on the genetic and molecular role of the SBP MoaA through an integrative approach using a defective mutant *in vivo*, crystallography and affinity measurements. We showed that MoaA very efficiently binds mannopinic acid in *A. tumefaciens* R10. Nonetheless, MoaA was not the sole transporter of this opine as shown by data obtained using the defective non-polar mutant R10 Δ moaA. Using genetic approaches through single and double non-polar defective mutants (R10 Δ motA and R10 Δ moaA Δ motA) and affinity measurements, we demonstrated that the non-specific SBP MotA, so far characterized as mannopine and Amadori compound importer, was also capable to transport mannopinic acid. We also performed the *in vivo* study of agropinic acid transport using single and double non-polar defective mutants (R10 Δ agtB, R10 Δ agaA and R10 Δ agtB Δ agaA).

We structurally characterized the mannopinic acid-binding mode of both MoaA and MotA and identified two mannopinic acid-binding signatures (a selective and a non-selective). We also used the synthetic opine analog glucopinic acid, which constitutes the sugar part-C2 epimer of mannopinic acid to probe ligand specificity. Overall, our data on import and specificity on the mannityl-opine family are now complete and provide new insights into their utilization in host-interacting agrobacteria.

Experimental

Synthesis and purification of opiines

The used agropine and agropinic acid were synthesized from mannopine as previously described [14,22]. The used mannopine was the same as in Marty et al. [21]. Mannopinic acid and the synthetic glucopinic acid were laboratory products also checked by mass spectrometry.

Construction of the single and double non-polar defective mutants in

A. tumefaciens R10

The octopine-mannityl-type *A. tumefaciens* R10 strain was from our laboratory collection. The octopine-mannityl-type R10 Δ moaA, R10 Δ motA and R10 Δ agaA, single defective mutants were constructed according to a strategy previously described for R10 Δ agtB mutant [22,28]. Briefly, ~1000 pb of the recombinant region containing the upstream and downstream region flanking the *moaA* or *motA* or *agaA* gene were generated by PCR using primers listed in Supplementary Table S1. These fragments were designed to delete only the coding sequence of each target gene without affected neighboring genes. Each recombinant fragment was inserted into a *Apal* and *SpeI* digested suicide vector pJQ200sk [29], by infusion technology (Takara clonotech, Kyoto, Japan). The resulting plasmid (pJQ200sk- Δ moaA, pJQ200sk- Δ motA or pJQ200sk- Δ agaA) was introduced into *A. tumefaciens* R10 by electroporation. The colonies with plasmid integration were selected on YPG (yeast extract, 5 g/l, peptone, 5 g/l, glucose, 10 g/l and pH adjusted to 7.2) medium plates supplemented with gentamicin (20 μ g/ml) and verified by PCR with primers UpF-DwR. Double-crossover events were searched by culturing overnight the gentamicine resistant colonies into YPG medium without antibiotic before plating on YPG plates containing 5% of sucrose. Gene deletion in the sucrose resistant colonies was verified by PCR (with primers UpF-DwR, Supplementary Table S1). The double non-polar R10 Δ moaA Δ motA and R10 Δ agaA Δ agtB mutants were obtained following the same procedure, pJQ200sk- Δ moaA or pJQ200sk- Δ agaA plasmid was introduced into *A. tumefaciens* R10 Δ motA and R10 Δ agtB.

Bacterial culture conditions

The octopine-mannityl-type *A. tumefaciens* R10 and all defective mutant strains were cultivated overnight at 28°C in AB medium supplemented with mannitol (2 g/l) instead of glucose. After washing the pellet with 0.8% NaCl, strains were inoculated in AB minimal medium supplemented with 2 mM of carbon sources (mannopine, mannopinic acid, agropinic acid and agropine) or in absence of any carbon source, in 24-well sterile plates incubated at 28°C during 50 h. Cells growth was measured every 20 min by optical density at 600 nm using Tecan Infinite M1000 (Tecan, Männedorf, Switzerland). Analyses were performed in four technical replicates and in two biological replicates.

Cloning, expression and purification of mature MoaA and MotA

The synthetic gene (Genscript, Piscataway, NJ) coding for the mature MoaA was inserted into pET-29b. *Escherichia coli* BL21 pLysS were transformed by pET-29b-*moaA*. Cells were grown at 37°C in LB broth then at 16°C supplemented with 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside to induce protein production during 4 h. Cells were centrifuged, resuspended in a buffer of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM imidazole and 300 mM NaCl, and disrupted by sonication. After centrifugation at 25 000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was loaded onto a 5 ml His-Trap column (GE Healthcare). Protein elution was performed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM imidazole and 300 mM NaCl. Protein fractions were loaded onto a gel filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl. The protein fractions were pooled, concentrated at 14 mg/ml and stored at –80°C. MotA was expressed and purified as previously described [21].

Expression and purification of mature seleniated MoaA

The *E. coli* BL21 cell transformed with the plasmid pET-29b-*moaA* were grown overnight at 28°C in M9 media supplemented with 0.4% glucose, 2 mM MgSO₄, 1 μM CaCl₂, 100 mg/l of lysine, threonine and phenylalanine, 50 mg/L of leucine, valine, isoleucine and methionine. The pelleted cells were resuspended in fresh M9 media (same as above) with 100 mg/l of selenomethionine instead of methionine for 1 h at 37°C before inducing the expression with 0.1 mM IPTG 4 h at 16°C. Cells were centrifuged at 4000 g for 15 min at 4°C. The purification protocol was the same as described above for the wild-type protein.

Crystallization and structure determination

MotA was co-crystallized with mannopinic acid and glucopinic acid instead of mannopine or glucopine as previously described [21]. Crystallization conditions (Table 1) for liganded seleniated MoaA (molar ratio of protein:ligand used was 1:5) were screened using QIAGEN kits (Valencia, CA) with a Mosquito nanodrop robot (TTP Labtech) and were manually optimized. Crystals were transferred to a cryo-protectant solution (mother liquor supplemented with 25% PEG 400 for PEG conditions or 30% sucrose for AS conditions) and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K on the PROXIMA 1 and 2 beamlines equipped with a PILATUS 6M and an EIGER 9M as detectors, respectively, at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France). Data processing was performed using the XDS package [30] (Table 1). The crystal structure of the MoaA-mannopinic acid complex was determined by single anomalous dispersion (SAD) method from selenomethionine-labeled protein and further refined at 2.05 Å resolution using a higher resolution dataset. Solvent content analysis using CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) indicated the presence of two monomers in the asymmetric unit. The positions of 4 over 5 selenium atoms per monomer were found using SHELX suite program [31]. The SAD phases were calculated using PHASER [32] and further refined by density modification performed using PARRROT (CCP4 suite). An iterative process of manual building in COOT combined with phase calculation where a partial model was used as input, allowed modeling of the complete polypeptide chain. Other structure determinations of MoaA and those of MotA were performed by molecular replacement with PHASER [32]. The co-ordinates of MotA (PDB 5L9G and 5L9L) [21] were used as search models for MotA-mannopinic acid and MotA-agropinic acid structures, respectively. The refinement of each structure was performed with BUSTER-2.10 [33] using TLS group and NCS restraints. Inspection of the density maps and manual rebuilding were performed using COOT [34]. The three-dimensional models of mannopinic acid and glucopinic acid were generated with the ProDRG webserver [35]. The refinement details of each structure are shown in Table 1. Molecular graphic images were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Fluorescence titration measurements

Each ligand bound to MoaA or MotA was monitored by autofluorescence by exciting the protein at a wavelength of 295 nm and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophan at 335 nm. All experiments were performed at 22°C in 96-well plates (1/2 Area Plate-96F, PerkinElmer) using Tecan Infinite M1000 (Tecan, Männedorf, Switzerland) in 25 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (1 μM) and increasing concentrations of ligand. Each ligand has no emission signal at 335 nm. The data were analyzed using Origin® 7 software and fitted to the equation $f = \Delta\text{Fluorescence}_{\text{max}} \cdot \text{abs}(x) / (K_D + \text{abs}(x))$.

Table 1 Crystallographic data and refinement parameters

	MoaA SeMet	MoaA SeMet	MoaA	MoaA	MotA	MotA
PDB code	SAD phasing	6TFQ	6TFX	6TFS	6TG2	6TG3
Wavelength (Å)	0.978	1	1	1	0.978	0.978
Crystallization conditions	2 M AS, 100 mM Tris–HCl pH 8	2 M AS, 100 mM Tris–HCl pH 8	20% PEG 4000, 100 mM MES pH 6.5, 200 mM MgCl ₂	2 M AS, 100 mM Tris–HCl pH 8	25% PEG 4000, 100 mM Tris pH 8.5, 200 mM CaCl ₂	25% PEG 4000, 100 mM Tris pH 8.5, 200 mM CaCl ₂
Number of molecules in asymmetric unit	2	2	2	2	4	4
Opine	Mannopinic acid	Mannopinic acid	Mannopinic acid	Glucopinic acid	Mannopinic acid	Glucopinic acid
Space group	P3212	P3212	P21	P3212	P21	P21
Cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 155.8 <i>b</i> = 155.8 <i>c</i> = 182.1 β = 120	<i>a</i> = 156.0 <i>b</i> = 156.0 <i>c</i> = 181.7 β = 120	<i>a</i> = 63.0 <i>b</i> = 77.9 <i>c</i> = 104.0 β = 107.46	<i>a</i> = 156.6 <i>b</i> = 156.6 <i>c</i> = 183.0 β = 120	<i>a</i> = 67.9 <i>b</i> = 132.1 <i>c</i> = 69.5 β = 91.2	<i>a</i> = 68.6 <i>b</i> = 131.9 <i>c</i> = 70.4 β = 91.7
Resolution (Å)	50–2.5 (2.65–2.5)	50–2.05 (2.17–2.05)	50–1.57 (1.66–1.57)	50–2 (2.12–2)	50–2.2 (2.34–2.2)	50–1.85 (1.96–1.85)
No. of observed reflections	1 833 447 (293 177)	2 267 911 (371 179)	894 940(140 376)	2 987 025 (453 519)	182 317(28 269)	741 942(114 819)
No. of unique reflections	87 534(13 939)	157 907(25 177)	134 434(21 895)	171 659(26 916)	60 300(9388)	106 626(16 773)
<i>R</i> _{sym} (%)	15.1 (84.9)	10.6 (161.3)	9.4 (94.7)	14 (247)	13.5 (90.7)	8.4 (114.3)
<i>R</i> _{pim} (%)	3.4 (18.7)	2.9 (42.6)	4 (40.2)	3.5 (60.7)	9.3 (61.9)	3.4 (46.2)
Completeness (%)	99.8 (98.9)	99.9 (99)	99.5 (97.6)	99.5 (96.9)	97.8 (94.4)	99.5 (96.9)
<i>I</i> / σ	17.36 (3.1)	15.01 (1.27)	11.8 (1.7)	13.61 (0.88)	6.31 (1.27)	12.42 (1.42)
CC1/2	99.8 (88.8)	99.9 (54.6)	99.8 (64.6)	99.9 (51.8)	99 (51)	99.9 (69.9)
<i>R</i> _{cryst} (%)		18.5	16.3	18.3	18.6	17.8
<i>R</i> _{free} (%)		19.9	18.2	19.4	21.9	19.8
rms bond deviation (Å)		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
rms angle deviation (°)		1.11	1.07	1.06	1.06	1.1
Average B (Å ²)						
Protein A/B/C/D		50.6/56	23.3/24.1	47.4/52.3	41.6/42.9/44.7/43	42.7/43.4/48.1/48.2
Ligand		42.3/44.4	18.9/18.8	40/41.8	32/35.1/32.7/31.3	36/35/36.6/34.9
Water		58.6	32.1	57.1	41.3	41.1
Clashscore ¹		1.54	1.34	1.09	1.16	0.86
MolProbity score ¹		1.31	0.86	1.18	1.2	1.06
Ramachandran plot (%)						
Favored		97.25	98	97.15	97.99	98.92
Outliers		0.2	0.2	0.2	0	0

Values for the highest resolution shell are in parentheses.

CC_{1/2} = percentage of correlation between intensities from random half-dataset [41].

¹Calculated with MolProbity [42].

Isothermal titration microcalorimetry measurements

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal (Malvern). The experiments were carried out at 20°C. Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) varied from 50 to 100 μM. Nineteen injections of 2 μl ligand solution (mannopine, mannopinic acid agropine and agropinic acid) at concentrations ranging from 580 to 1000 μM were

performed at intervals of 180 s while stirring at 500 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with software supplied by MicroCal (ORIGIN[®]). This software uses the relationship between the heat generated by each injection and ΔH (enthalpy change in Kcal.Mol⁻¹), K_a (the association binding constant in M⁻¹), n (the number of binding sites), total protein concentration and free and total ligand concentrations [36].

Distance tree

Sequences were analyzed using BlastP from NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/>). Alignments of MoaA and related sequences were conducted using MUSCLE software. The distance tree was built using Mega software, version 7. Topology was inferred using the neighbor-joining method [37]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was generated to represent the sequence relatedness of the proteins analyzed. The sequence distances were computed using the Poisson correction method and are in units of the number of amino acid substitutions per site.

Results

Each SBP MoaA and MotA can import mannopinic acid and only MotA can import mannopine

The non-polar R10 $\Delta moaA$ and R10 $\Delta motA$ mutants correspond to a mutant defective for MoaA and MotA, respectively, whereas the non-polar R10 $\Delta moaA\Delta motA$ to a mutant defective for the two SBPs MoaA and MotA. In each strain, one gene (either *moaA* or *motA*) is deleted but this deletion has no effect on the expression of the downstream genes, when compared with the wild-type (WT) R10 strain. The growth profiles of WT, R10 $\Delta moaA$, R10 $\Delta motA$ and R10 $\Delta moaA\Delta motA$ were compared in minimal medium containing mannopinic acid (Figure 2A) or mannopine (Figure 2B) as the sole source of carbon. Under these conditions, each single deficient mutant (MoaA and MotA) and the WT strains grew on mannopinic acid. In contrast, the R10 $\Delta moaA\Delta motA$ double mutant did not grow on mannopinic acid or mannopine, neither did the R10 $\Delta motA$ mutant on mannopine. Therefore, MotA associated with its ABC transporter is the sole transport system

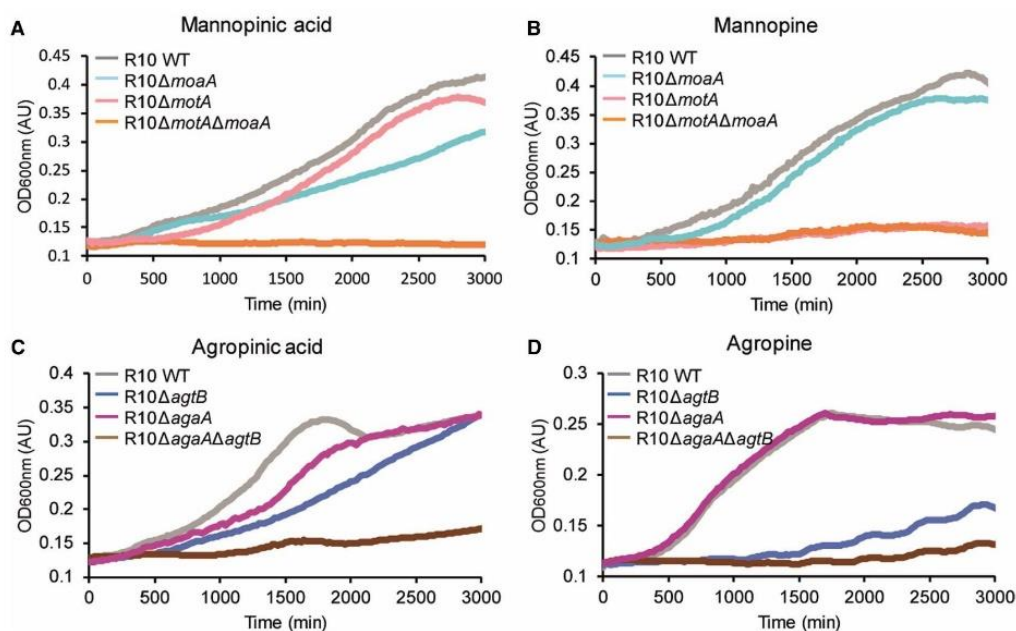


Figure 2. Mannopinic acid (A), mannopine (B), agropinic acid (C), and agropine (D) uptake in wild-type and single/double mutants of *A. tumefaciens* R10 strains.

3000 min growth (OD at 600 nm) of *A. tumefaciens* R10 wild-type strain (gray) and the R10 $\Delta moaA$ (cyan), R10 $\Delta motA$ (pink), R10 $\Delta moaA\Delta motA$ (orange), R10 $\Delta agaA$ (magenta), R10 $\Delta agtB$ (blue) and R10 $\Delta agaA\Delta agtB$ (brown) mutants in AB minimal medium supplemented with each mannityl-opine as a carbon source.

responsible for the uptake and assimilation of mannopine in pure culture while both MotA and MoeA with their respective ABC transporter can import mannopinic acid used as nutrient.

Each SBP AgaA and AgtB can import agropinic acid and only AgtB can import agropine

We have previously showed that AgtB associated to its ABC transporter is the sole transport system responsible for the uptake and assimilation of agropine in pure culture [22]. In this study, we constructed the non-polar R10 Δ agaA and R10 Δ agtB Δ agaA defective mutants. The growth profiles of WT, R10 Δ agtB, R10 Δ agaA and R10 Δ agtB Δ agaA were compared in minimal medium containing agropinic acid (Figure 2C) or agropine (Figure 2D) as the sole source of carbon. Under these conditions, the R10 Δ agaA mutant and WT strains grew on both agropinic acid and mannopinic acid. In contrast, the R10 Δ agtB Δ agaA double mutant did not grow on agropinic acid, proving that both SBPs AgaA and AgtB were responsible for agropinic acid uptake and assimilation in pure culture in line with their affinity for agropinic acid [22].

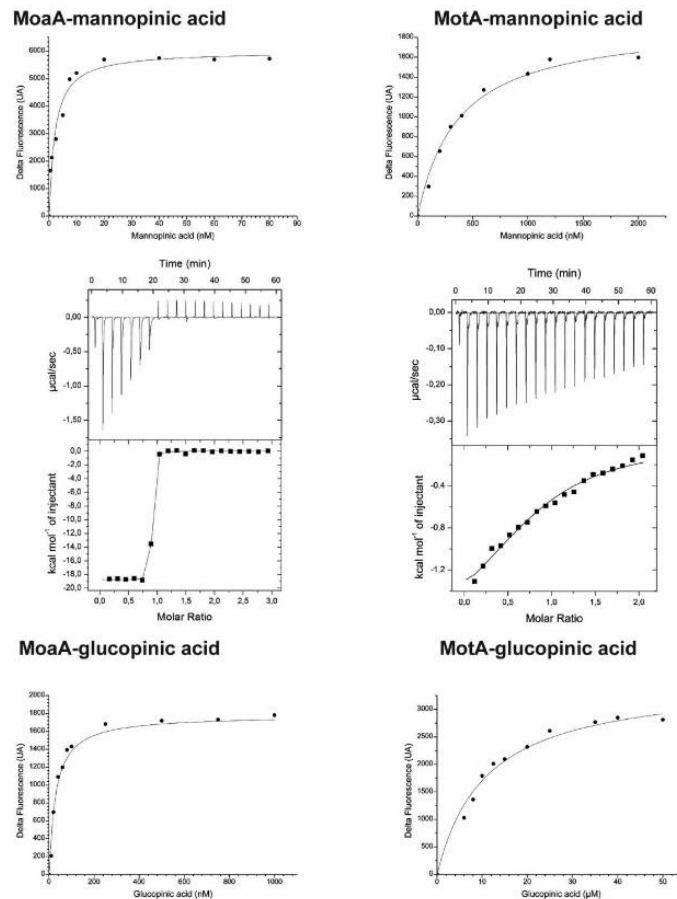
MoeA exhibits a high affinity for mannopinic acid and MotA can bind mannopinic acid

Binding of mannopinic acid to the purified recombinant mature proteins MoeA and MotA was explored using tryptophan fluorescence spectroscopy (MoeA and MotA possess 8 and 11 tryptophan residues, respectively) and isothermal titration microcalorimetry. Intrinsic protein fluorescence titration experiments for MoeA and MotA yielded apparent dissociation constant K_D values of 2.1 ± 0.2 nM and 3.9 ± 0.2 μ M, respectively (Figure 3). Therefore, MoeA is highly efficient for mannopinic acid binding. No interaction could be measured between MoeA and mannopine. This result is in agreement with the results of the growth assays showing that MotA is the sole SBP for mannopine uptake. MotA displays an apparent dissociation constant K_D value of 4 ± 0.5 nM for mannopine [21]. As expected, no interaction could be measured between MoeA or MotA and agropinic acid or agropine. No interaction could be either measured between MotA and glutamate. Both MoeA and MotA can bind the synthetic glucopinic acid with lower affinities than those for mannopinic acid (Figure 3). Using isothermal titration microcalorimetry, similar K_D values were obtained (Figure 3). The microcalorimetry data confirmed the 1:1 binding stoichiometry for both MoeA and MotA and revealed a negative enthalpy change for the ligand, meaning that the binding was enthalpy-driven, involving polar interactions mainly.

Ligand-binding site of MoeA, a SBP from cluster C

The expressed mature SBP MoeA lacks the first 29 signal sequence residues that serve for the localization to the bacterial periplasm and contains a C-terminal sequence His-tag. The X-ray structure of the seleniated liganded MoeA was determined at 2.5 Å resolution in $P3_12$ space group by SAD method and further refined at 2.05 Å resolution using a dataset from a different crystal grown in ammonium sulfate conditions (Table 1). MoeA with glucopinic acid crystallized in the same condition and the complexed structure was determined at 2 Å resolution. The MoeA-mannopinic acid complex also crystallized in PEG conditions leading to $P2_1$ space group crystals diffracting up to 1.57 Å resolution. Both crystal forms contain two very similar MoeA structures within the asymmetric unit, as indicated by the average root mean square deviation (RMSD of 0.4 Å for all C α atoms). The mature monomeric MoeA of 494 amino acids possesses a typical fold of cluster C within the SBP structural classification [38] (Figure 4A). The N-terminal lobe consists of residues (30–273 and 492–523) and the C-terminal lobe comprises the residues 279–488. Two short segments define the hinge region connecting the two lobes. SSM-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>) reports RMSD between MoeA and similar SBPs range from 2 to 2.2 Å over 448–463 C α atoms corresponding to 19–24% sequence identity. Thus, a detailed structural comparison is irrelevant because MoeA presents a distinct ligand-binding site.

The mannopinic acid bound between the two lobes of MoeA is well defined in the electron density maps. It is surrounded by Thr54, Arg57, Gln254, Glu277, Asn279, Arg312, Gly369, His395, His399, Tyr412, Gly413, Arg416 and Asn488 and makes numerous polar interactions with MoeA (Figure 4B). The glutamate moiety forms two salt bridges with Arg57 and Arg416 and a H-bond with the side chain of Tyr412. Its carboxylate group interacts with the side chains of His395 and His399 and the amino group of Thr54 while its amino group makes hydrogen bonds with the carboxyl group of Glu277 and Thr54 side chain. The sugar moiety interacts with seven amino acids: Gln254, Asn279, Glu277, Arg312, Gly369, Gly413 and Asn488. The synthetic



	Fluorescence		ITC					
	K _D (nM)	R ²	K _D (nM)	N	Enthalpie (ΔH) (cal/mol)	Entropy (ΔS) (cal/mol/deg)	Entropic contribution (-TΔS) (cal/mol)	Free enthalpy (ΔG) (cal/mol)
MoaA-mannopinic acid	2.1 ± 0.2	0.97	7.1 ± 0.2	0.86	-1872 ± 63	-26.6	7797.79	-5925.16
MotA-mannopinic acid	3901 ± 194	0.99	4202 ± 2150	0.83	-1959 ± 215	13.3	-3898.89	-5857.89
MotA-mannopine [21]	4 ± 0.5	0.98	19.8 ± 3	0.84	-22620 ± 78.3	-41.9	12282.9	-10337
MoaA-glucopinic acid	29.2 ± 2.9	0.98						
MotA-glucopinic acid	10815 ± 512	0.98						

Figure 3. ITC and fluorescence K_D measurements of MoaA and MotA towards mannopinic acid and mannopine, and fluorescence K_D measurements of MoaA and MotA towards glucopinic acid.

Protein concentration was at 1 μ M for fluorescence experiments. The top graphs show fluorescence monitoring of each protein upon titration with each ligand and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicate. The lower graphs correspond to microcalorimetry experiments. The top panel shows heat differences upon injection of ligand and low panel shows integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single binding model using Microcal ORIGIN. ITC experiments were performed twice. Calculated parameters for each experiment are indicated in a table and the previous data for MotA with mannopine are indicated [21].

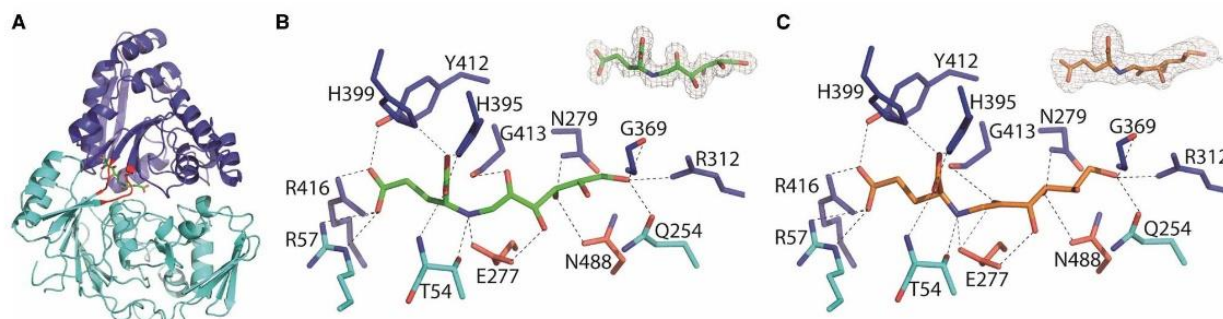


Figure 4. Ribbon representation of MoeA structure and its ligand-binding site.

(A) Mannopinic acid in green is located in the cleft of MoeA between the lobes 1 and 2 shown in cyan and in blue, respectively, and the hinge region is in red. (B) Mannopinic acid (green) and (C) glucopinic acid (orange) bound to the binding site of MoeA in the same code color as in (A). Each ligand is shown in its annealing Fo–Fc omit map contoured at 4σ . Hydrogen bonds between MoeA and each ligand are shown as dashed lines in black (distances are up to 3.2 Å).

analog glucopinic acid binds to MoeA very similarly than does mannopinic acid although its C2 hydroxyl in the sugar part is shifted by 1.9 Å compared with mannopinic acid (Figure 4C).

Mannopinic acid bound to MotA

We previously reported the structures of the mature MotA (a SBP from cluster D) in complex with mannopine, DFG and the synthetic glucopine [21]. The X-ray structures of MotA liganded with mannopinic acid and glucopinic acid were determined at 2.2 and 1.85 Å resolution, respectively (Table 1, Figure 5) by molecular replacement using the co-ordinates of MotA-mannopine structure (PDB 5L9G) and MotA-glucopine structure (PDB 5L9L) as a search model, respectively. Both liganded crystals contained four very similar molecules in the asymmetric unit (RMSD of 0.28 Å). They adopt the same closed conformation as previously observed (RMSD between 0.35 and 0.42 Å for all C α molecules). Mannopinic acid and mannopine fully overlap, as do glucopinic acid and glucopine (Figures 5B,C). Thus, mannopinic acid interactions with MotA are identical with those of mannopine with MotA previously described [21]. This is also the case between glucopinic acid and glucopine. The glutamate moiety of mannopinic acid interacts with the protein side chains of Ser128, Asp261 and Thr297. The carboxylate part is maintained by the guanidinium group of Arg238 and Ser37 side chain, and the amino group makes a hydrogen bond with the carboxyl group of Asp261 (Figures 5C,D). The sugar moiety interacts with Gln67, Gln87, Gly89, Asp92 and Asp261 residues (Figures 5C,D). The hydrogen bond formed between the glutamate side chain of both acidic ligands and the side chain of Asp261 is due to a favorable environment where all oxygen atoms of each carboxylate are involved in polar interactions, preventing any negative charge. Nonetheless, this interaction may be responsible for the affinity of MotA 1000-fold lower for mannopinic acid than for mannopine. A lower affinity (200-fold) of MotA is also observed for glucopinic acid compared with that for glucopine. In contrast with a micromolar-range interaction observed between MotA and glutamine as ligand, the lack of interaction between MotA and glutamate as ligand suggests that an electrostatic repulsion may occur between Asp261 and the ligand glutamate.

The comparison between the bound mannopinic acid and glucopinic acid leads to the same observation as that between the bound mannopine and glucopine, previously described [21]. The glutamate moiety of each ligand superimpose making similar protein contacts whereas their sugar moiety adopt a different conformation that induces the rearrangement of Asp92 side chain and slightly different protein interactions.

MoeA is present in a very few bacteria only

Searching for MoeA conservation in the bacterial kingdom (protein database at NCBI), and subsequent topology analysis revealed the existence of 10 SBPs with sequence at least 70% identical with that of MoeA from strain R10, and the occurrence of clades (Supplementary Figure S1). One of these, termed the MoeA clade, contains MoeA R10 and 7 highly similar orthologues sharing over 88% sequence identity. It encompasses octopine/mannityl-opines-type (R10, B6, Ach5, 15955 and TT111) and agropinicopine/mannityl-opines-type (LBA4404, Bo542, CFBP1873) *A. tumefaciens* strains. These bacteria possess the mannopinic acid-binding

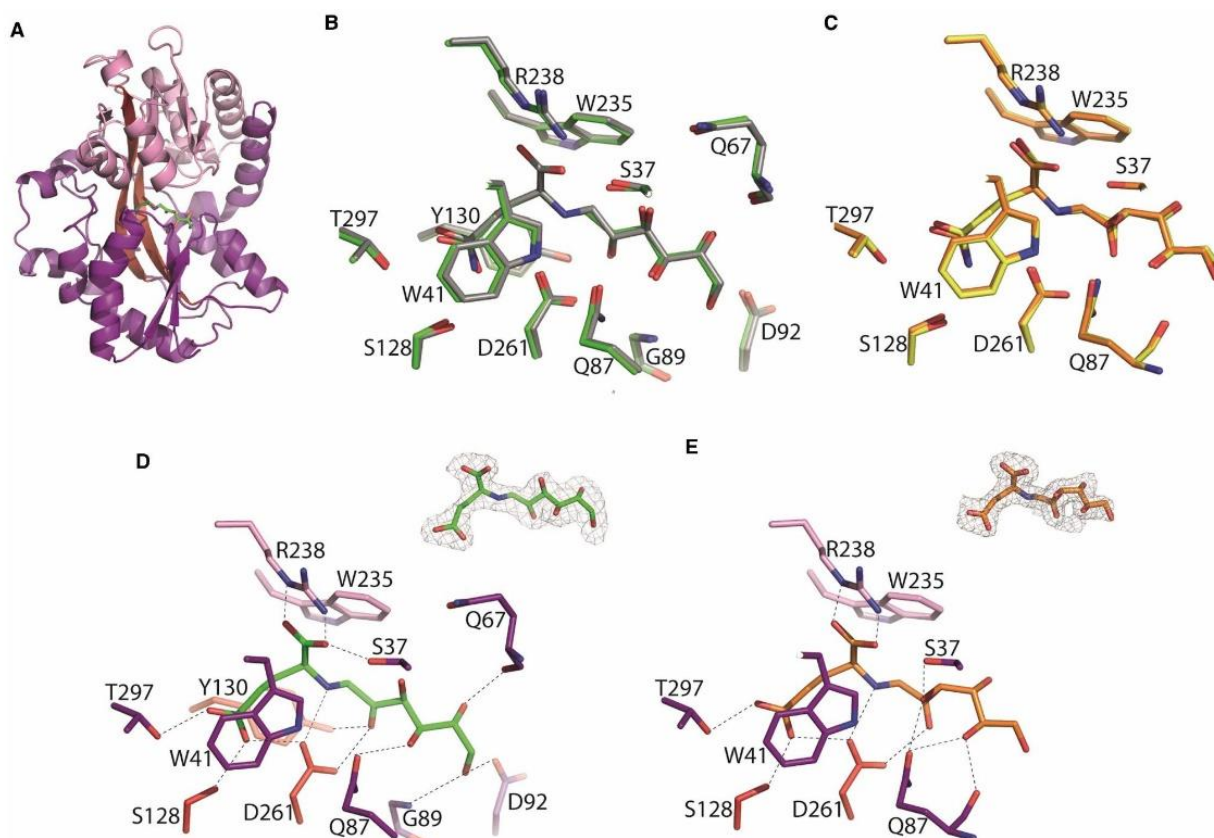


Figure 5. Ribbon representation of MotA structure and its ligand-binding site.

(A) Mannopinic acid in green is located in the cleft of MotA between the lobes 1 and 2 shown in purple and in pink, respectively, and the hinge region is in red. (B) Superposition of mannopinic acid in green and mannopine in gray (PDB: 5L9G) in the binding site of MotA. (C) Superposition of glucopinic acid in orange and glucopine in yellow (PDB: 5L9L) in the binding site of MotA. (D) Mannopinic acid in green and (E) glucopinic acid in orange bound to the binding site of MotA in the same code color as in (A), and their annealing Fo–Fc omp map contoured at 4σ . Hydrogens bonds between MotA and each ligant are shown as dashed lines in black (distance below 3.2 Å).

signature of 13 amino acids: Thr54, Arg57, Gln254, Glu277, Asn279, Arg312, Gly369, His395, His399, Tyr412, Gly413, Arg416 and Asn488. Outside the MoaA-clade, more distantly related (71–72% sequence identity), MoaA orthologues were detected in other plant-associated bacteria such as *Rhizobiales*, *Bosea* and *Methylobacterium*. In these bacteria, the signature degenerates with two mutated residues (Gln254 versus Ala and Gly369 versus Ser) and modeling indicates that the binding may be slightly affected due to the presence of the serine side chain at position 369.

Discussion

This work allowed us to finalize our study on the molecular and affinity characterization of the transport system of all members of the mannityl-opine family, which encompasses four opines: mannopine, mannopinic acid, agropine and agropinic acid. In contrast with all others opines from pathogenic agrobacteria such as the well-known members of octopine or nopaline families, the mannityl-opines do not result from a one-step formation in the transformed plant cells (Figure 6). Three enzymes namely Mas2, Mas1 and Ags, encoded by genes located in the T-DNA region and integrated into the plant genome, are responsible for the production of the mannityl opines. More precisely, the Amadori compounds DFG/DFGA are synthesized from fructose and glutamine/glutamate by Mas2, mannopine/mannopinic acid from DFG/DFGA by Mas1 and agropine from mannopine by Ags [14] (Figure 6). Agropinic acid originates from the rapid spontaneous lactamization of

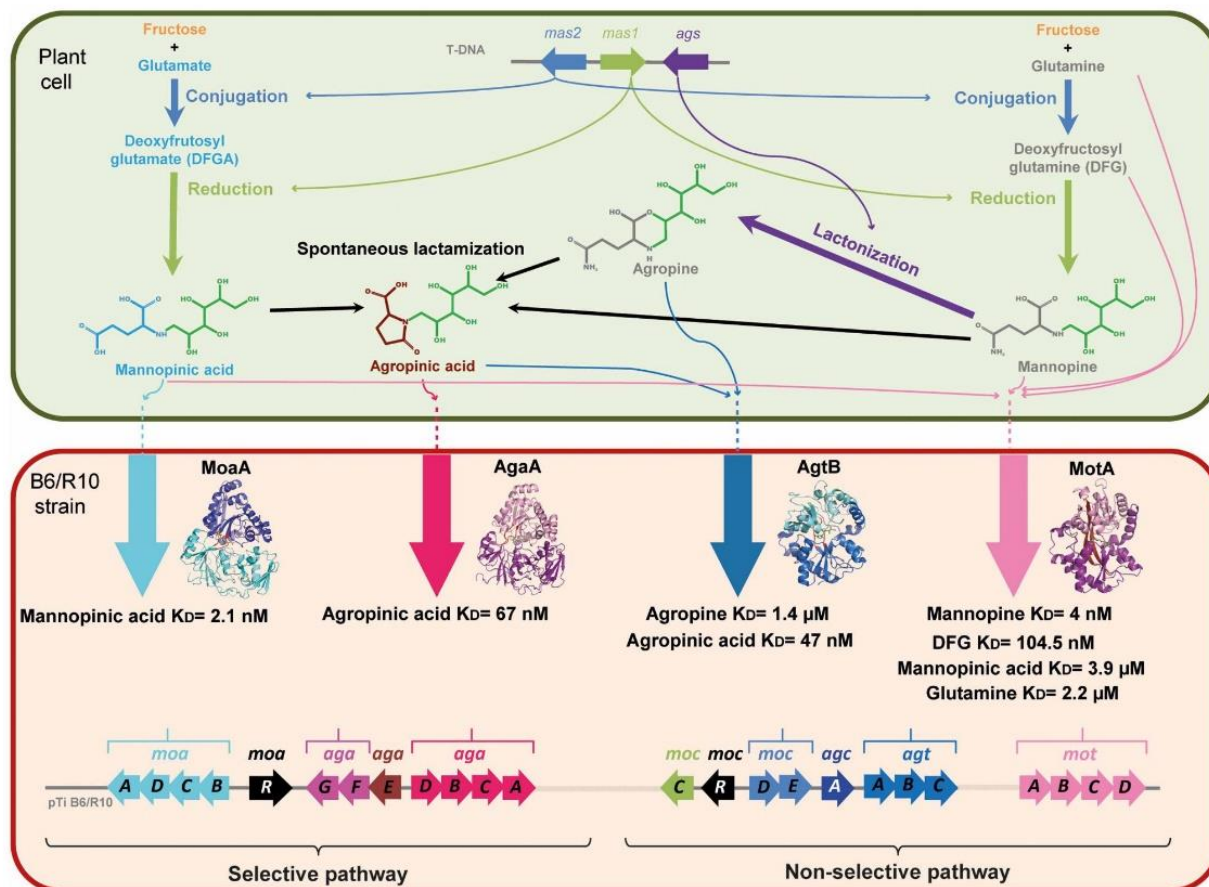


Figure 6. Metabolism of mannityl-opines in transformed plant cells and in *A. tumefaciens* R10/B6 strains.

In modified plant cell, the *mas1* and *mas2* genes responsible for the biosynthesis of mannopinic acid and mannopine are located on the T-DNA as well as *ags* gene product, which catalyzes the lactonization of mannopine to agropine. Agropinic acid results from a spontaneous lactamization of the three mannityl-opines: agropine, mannopine and mannopinic acid. In *A. tumefaciens* B6/R10 strain, two transport pathways for agropinic acid and mannopinic acid coexist. The (*moaADCB*) genes (cyan) and the (*motABDC*) genes (pink) located on the Ti plasmid code for the selective and non-selective transport of mannopinic acid, respectively. The (*agaACDB*) genes (magenta) and (*agtABC*) genes (blue) code for the selective and non-selective transport of agropinic acid, respectively. The structure of the four SBPs MoaA-, AgaA-, AgtB- and MotA-mediated transport bound to their preferred mannityl-opine, which are mannopinic acid, agropinic acid, agropine and mannopine, respectively, are shown. Affinity values are indicated. The (*agaE*), (*agaFG*), (*agcA*), (*mocC*) and (*mocDE*) genes products are involved in mannityl-opines degradation. The (*moaR*) and (*mocR*) genes code for a corresponding transcriptional regulator of each genes cluster.

mannopine and agropine, and also of mannopinic acid but slower [6] (Dessaux, unpublished results). Once produced in the plant cells, these opines are released and imported into pathogenic agrobacteria to be assimilated as nutrients.

Combining *in vitro* approaches (affinity and structural data with phylogeny analyses) and *in vivo* approaches with bacterial growth assays using defective mutants, we characterized mannopinic acid assimilation, provided molecular and structural data of the SBP MoaA and new insights about specificity and selectivity of the SBP MotA [21]. Together with the reported study of the two SBPs AgtB and AgaA [22], the four MoaA-, AgaA-, MotA- and AgtB-mediated mannityl-opines transport systems in pathogenic agrobacteria are now well characterized.

The SBPs MoaA and AgaA are encoded by genes belonging to the same Ti-plasmid region that is distinct from that harboring the genes coding for the SBPs MotA and AgtB (Figure 6). Previous genetic experiments suggested that MoaA-mediated transport system should import mannopinic acid into agrobacteria [23,26,27].

Here, we demonstrated that the SBP MoaA recognizes mannopinic acid as a unique ligand. In parallel, AgaA binds agropinic acid as the unique mannityl-opine [22]. It should be noted that MoaA and AgaA belong to the same cluster C of SBP classification, and each possesses a specific and selective molecular binding signature for its single mannityl-opine. In contrast, MotA and AgtB, which do not belong to cluster C and do not share a similar cluster fold, appear not selective for a mannityl-opine. Indeed, MotA described as binding mannopine and DFG (the precursor of mannopine) [21] is also capable of binding mannopinic acid (Figure 6) and AgtB can take up both agropine and agropinic acid. Therefore, two binding modes of mannopinic acid import and two binding modes of agropinic acid import coexist in agrobacteria. From growth assays with single and double non-polar defective mutants of MotA, AgtB, MoaA and AgaA, we proved that *A. tumefaciens* R10/B6 strains use these two double uptake/degradation systems of mannityl-opines. This is in agreement with previous genetic approaches suggesting the occurrence of two pathways/regions for mannopinic acid and agropinic acid catabolism in the octopine/mannityl-opines type Ti-plasmid [23,27,39].

The above data questions the evolutionary interest of agrobacteria to have acquired and maintained two double uptake systems, characterized by two agropinic acid-binding SBPs and two mannopinic acid-binding SBPs with their own molecular signature (selective versus non-selective). The most probable value of the occurrence of two import systems for agropinic and mannopinic acid might be the gain of a trophic advantage for agrobacteria all along the plant tumor construction. Indeed, even before the appearance of the outgrowth characteristic for the tumor, mannityl-opines are detected at the bacterial inoculation site on plants, the most abundant being mannopinic acid, mannopine and agropine, whereas agropinic acid is present only in trace amounts. In this scheme, we propose that MoaA efficiently import mannopinic acid (K_D of 2.1 nM) as soon as the opine is produced. In agreement, the phylogenetic analysis of the conservation of its molecular binding signature indicates that MoaA is present only in octopine/mannityl-opines-type or agropinic/mannityl-opines-type *Agrobacterium* strains. This is almost the same observation than that made for the PBP MotA, which transports mannopine very efficiently (K_D of 4 nM) compared with its precursor DFG (K_D of 104.5 nM) and the related compound mannopinic acid (K_D of 3.9 μ M) [21]. The SBP AgtB is also mostly present in pathogenic strains of *Agrobacterium* unlike the SBP AgaA specific for agropinic acid uptake, which is found in many non-pathogenic *Rhizobiaceae* [22]. The ability of *A. tumefaciens* B6/R10 strains to import with high affinity and to degrade mannopinic acid and mannopine from the early stage of plant infection or tumor formation would allow the bacteria to settle immediately in the emerging tumor environment, gaining an immediate advantage over competing non-agrobacterial strains. In the course of tumor maturation, the formation of agropine, which involves the transformation of mannopine, would also reduce the amount of available mannopine and modulate the ratio of opines over time. Therefore, this could limit the competition between agrobacteria and non-agrobacterial isolates associated with plants, some of these later being indeed naturally capable of assimilating (transport and degradation) mannopine, while the degradation of agropine is almost limited to only agrobacteria and members of closely related clades (Dessaux, unpublished results). In the case that mannopine is all transformed into agropine or is present at very low concentration, the PBP MotA would serve as a second transporter of mannopinic acid allowing a larger import of this specific nutrient. Notably, mannopinic acid is the most stable opine in time, in contrast with agropine and mannopine, which become agropinic acid. In aging tumors, the existence of the double transport systems of import of mannopinic acid and agropinic acid is likely crucial, especially since agropinic acid accumulates in these tumors [40], (Dessaux, unpublished results). Overall, our data shed new light on how the four mannityl-opines contribute to the establishment of the ecological niche of agrobacteria from the early to the late stages of tumor development.

Abbreviations

ABC, ATP-binding cassette; DFG, 1-deoxy-fructosyl-glutamine; DFGA, 1-deoxy-fructosyl-glutamate; ITC, isothermal titration microcalorimetry; PDB, protein data bank; RMSD, root mean square deviation; SAD, single anomalous dispersion; SBP, solute-binding protein.

Author Contribution

Y.D. provided the agropine, agropinic acid, mannopine, mannopinic acid and glucopinic acid compounds and information on their metabolism and related determinants. J.D. and L.V. performed the non-polar mutants and the growth assays. A.V., L.M., P.L. and S.M. performed all the crystallography work. L.M. and A.V. performed the fluorescence assays. M.A.-N. performed the microcalorimetry experiments. A.V. and S.M. performed the

phylogenetic analysis. S.M. wrote the manuscript. All the authors discussed the results and contributed to the writing of the manuscript.

Funding

A.V., L.M. and S.M. were supported by CNRS and ANR-Blanc SENSOR (ANR-12-BSV8-0003-01/02/03). This work benefited from the I2BC crystallization and microcalorimetry platforms supported by FRISBI ANR-10-INSB-05-01.

Acknowledgements

We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposals ID 20140774 and 20170872) in using PROXIMA beamlines.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Data Availability

The atomic co-ordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank under PDB 6TFQ and 6TFX for MoaA in complex with mannopinic acid in P₃₂12 and P2₁ space groups, respectively, PDB 6TFS for MoaA with glucopinic acid and PDB 6TG2 and 6TG3 for MotA with mannopinic acid and glucopinic acid, respectively.

References

- 1 Nester, E.W. (2014) *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant. Sci.* **5**, 730 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- 2 Dessaux, Y. and Faure, D. (2018) Niche construction and exploitation by *Agrobacterium*: how to survive and face competition in soil and plant habitats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **418**, 55–86 https://doi.org/10.1007/82_2018_83
- 3 Pitzschke, A. and Hirt, H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J.* **29**, 1021–1032 <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.8>
- 4 Gelvin, S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 16–37 <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- 5 Tempé, J. and Petit, A. (1983) La piste des opines. In: *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* (Pühler, A., ed.), pp. 14–32, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg
- 6 Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K. and Murphy, P. J. (1998) Opines and opine-like molecules involved in plant–rhizobiaceae interactions. In: *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* (Spaink, H.P. et al., eds), pp. 173–197, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands
- 7 Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M. et al. (1979) Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **204**, 251–266 <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0026>
- 8 Wilson, M., Savka, M.A., Hwang, I., Farrand, S.K. and Lindow, S.E. (1995) Altered Epiphytic Colonization of mannityl opine-producing transgenic tobacco plants by a mannityl opine-catabolizing strain of pseudomonas syringae. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2151–2158 <https://doi.org/10.1128/AEM.61.6.2151-2158.1995>
- 9 Savka, M.A. and Farrand, S.K. (1997) Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nat. Biotechnol.* **15**, 363–368 <https://doi.org/10.1038/nbt0497-363>
- 10 Oger, P., Petit, A. and Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nat. Biotechnol.* **15**, 369–372 <https://doi.org/10.1038/nbt0497-369>
- 11 Guyon, P., Petit, A., Tempé, J. and Dessaux, Y. (1993) Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 92–98 <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-092>
- 12 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 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004444>
- 13 El Sahili, A., Li, S.Z., Lang, J., Virus, C., Planamente, S., Ahmar, M. et al. (2015) A Pyranose-2-phosphate motif is responsible for both antibiotic import and quorum-sensing regulation in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog.* **11**, e1005071 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005071>
- 14 Tate, M.E., Ellis, J.G., Kerr, A., Tempé, J., Murray, K.E. and Shaw, K.J. (1982) Agropine: a revised structure. *Carbohydr. Res.* **104**, 105–120 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82224-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82224-7)
- 15 Dessaux, Y., Guyon, P., Farrand, S.K., Petit, A. and Tempe, J. (1986) *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids specify enzymic lactonization of mannopine to agropine. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2549–2559 <https://doi.org/10.1099/00221287-132-9-2549>
- 16 Hong, S.B., Hwang, I., Dessaux, Y., Guyon, P., Kim, K.S. and Farrand, S.K. (1997) A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by *Agrobacterium* strains. *J. Bacteriol.* **179**, 4831–4840 <https://doi.org/10.1128/JB.179.15.4831-4840.1997>
- 17 Hong, S.B. and Farrand, S.K. (1994) Functional role of the Ti plasmid-encoded catabolic mannopine cyclase in mannityl opine catabolism by *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* **176**, 3576–3583 <https://doi.org/10.1128/JB.176.12.3576-3583.1994>

- 18 Klapwijk, P.M., Oudshorn, M. and Schilperoort, R.A. (1977) Inducible permease involved in the uptake of octopine, lysopine and octopinic acid by *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying virulence-associated plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 1–11 <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-1>
- 19 Klapwijk, P.M., Scheulderman, T. and Schilperoort, R.A. (1978) Coordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for a common regulatory gene and separate operons. *J. Bacteriol.* **136**, 775–785 <https://doi.org/10.1128/JB.136.2.775-785.1978>
- 20 Chilton, W.S. and Chilton, M.D. (1984) Mannityl opine analogs allow isolation of catabolic pathway regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **158**, 650–658 <https://doi.org/10.1128/JB.158.2.650-658.1984>
- 21 Marty, L., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Dessaux, Y., Faure, D. and Morera, S. (2016) Structural basis for high specificity of amadori compound and mannopine opine binding in bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* **291**, 22638–22649 <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.745562>
- 22 Marty, L., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Pelissier, F., Meyer, T., Lavire, C. et al. (2019) Structural basis for two efficient modes of agropinic acid opine import into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochem. J.* **476**, 165–178 <https://doi.org/10.1042/BCJ20180861>
- 23 Dessaux, Y., Tempe, J. and Farrand, S.K. (1987) Genetic analysis of mannityl opine catabolism in octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* strain 15955. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 301–308 <https://doi.org/10.1007/BF00330457>
- 24 Farrand, S.K., Tempe, J. and Dessaux, Y. (1990) Localization and characterization of the region encoding catabolism of mannopinic acid from the octopine-type Ti plasmid pTi15955. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**, 259–267 <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-259>
- 25 Kim, K.S., Chilton, W.S. and Farrand, S.K. (1996) A Ti plasmid-encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region-encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors. *J. Bacteriol.* **178**, 3285–3292 <https://doi.org/10.1128/JB.178.11.3285-3292.1996>
- 26 Oger, P., Kim, K.S., Sackett, R.L., Piper, K.R. and Farrand, S.K. (1998) Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of traR, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol. Microbiol.* **27**, 277–288 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00671.x>
- 27 Lyi, S.M., Jafri, S. and Winans, S.C. (1999) Mannopinic acid and agropinic acid catabolism region of the octopine-type Ti plasmid pTi15955. *Mol. Microbiol.* **31**, 339–347 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01178.x>
- 28 Meyer, T., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Comte, G., Vial, L., Lavire, C. et al. (2018) The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. *J. Biol. Chem.* **293**, 7930–7941 <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001856>
- 29 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 [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)
- 30 Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- 31 Sheldrick, G.M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A* **64**, 112–122 <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>
- 32 McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- 33 Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M. and Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2210–2221 <https://doi.org/10.1107/S0907444904016427>
- 34 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- 35 Schuttelkopf, A.W. and van Aalten, D.M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1355–1363 <https://doi.org/10.1107/S0907444904011679>
- 36 Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. and Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90213-3)
- 37 Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 38 Berntsson, R.P., Smits, S.H., Schmitt, L., Slotboom, D.J. and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **584**, 2606–2617 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043>
- 39 Dessaux, Y., Guyon, P., Petit, A., Tempe, J., Demarez, M., Legrain, C. et al. (1988) Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation. *J. Bacteriol.* **170**, 2939–2946 <https://doi.org/10.1128/JB.170.7.2939-2946.1988>
- 40 Scott, I.M., Firmin, J.L., Butcher, D.N., Searle, L.M., Sogeki, A.K., Eagles, J. et al. (1979) Analysis of a range of crown gall and normal plant tissues for Ti plasmid-determined compounds. *Mol. Genet. Genom.* **176**, 57–65 <https://doi.org/10.1007/BF00334296>
- 41 Karplus, P.A. and Diederichs, K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030–1033 <https://doi.org/10.1126/science.1218231>
- 42 Chen, V.B., Arendall, III, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J. et al. (2010) Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>

Chapitre 3 : Identification et caractérisation structurale de la PBP MelB impliquée dans la perception des RFO et du galactinol chez *A. fabrum* C58

1. Le contexte scientifique

Les interactions entre la plante et les bactéries de la rhizosphère sont dynamiques et largement influencées par les exsudats racinaires, ayant des conséquences bénéfiques ou néfastes pour la croissance et la santé des plantes. Les graines en germination qui sont en contact avec le sol et les microorganismes, influencent la composition de la rhizosphère et favorisent la croissance de microorganismes capables d'exploiter le carbone libéré par les graines/plantes.

Parmi les exsudats racinaires, les sucres de la famille du raffinose (RFO) s'accumulent dans les graines comme source d'énergie et sont relargués dans la rhizosphère pendant la germination. Le galactinol, précurseur des RFO, quant à lui s'accumule dans les plantes en réponse à une infection bactérienne, et joue un rôle dans la résistance des plantes contre les stress abiotiques et biotiques.

Chez la bactérie *Ensifer meliloti* 1021, une PBP associée à un transporteur ABC responsable du transport des RFO a été décrite. Les RFO y sont dégradés par des α -galactosidases, pour être utilisés comme nutriment et leur assimilation est associée à un avantage trophique dans les interactions plante-bactérie (*Bringhurst, Cardon, and Gage 2001; Gage and Long 1998*).

Des analyses *in silico* sur les α -galactosidases d'*A. fabrum* C58 indiquent que la souche posséderait un opéron, *mel*, capable de transporter et de dégrader les RFO. Cet opéron serait similaire à l'opéron *agg* d'*E. meliloti* 1021. Il code pour une PBP MelB, un transporteur ABC et deux α -galactosidases. Nous avons fait l'hypothèse que l'opéron *mel* chez *A. fabrum* C58 serait responsable du transport et de l'assimilation des RFO.

2. La présentation des travaux

Dans le but de caractériser la PBP MelB et d'étudier le rôle de cette protéine dans les phases précoces de la colonisation de la rhizosphère, nous avons combiné une étude structurale avec des approches génétiques et fonctionnelles. Ce travail est une collaboration avec Thibault Meyer et Céline Lavire (Ecologie Microbienne, Lyon) qui ont réalisé l'étude fonctionnelle *in vitro* et *in planta* sur les souches d'*A. fabrum* WT et le mutant dépourvu *melB*.

Les études structurales et biophysiques ont montré que MelB peut fixer trois sucres de la famille des RFO (mélibiose, raffinose, stachyose), le galactose et le galactinol, avec une préférence pour les sucres à deux unités. *In cellulo*, lorsque l'on compare la croissance de la souche WT avec le mutant dépourvu *melB*, sur milieu minimum complété en RFO ou galactinol, nous confirmons que MelB est responsable du transport de ces sucres. L'étude phylogénique suggère que MelB, qui est conservée chez les *Rhizobiaceae*, est un élément qui permet à ces bactéries de coloniser très tôt les plantes.

Nous avons conclu que MelB est la PBP responsable du transport des RFO et du galactinol chez *A. fabrum*. De plus, *in planta*, MelB confère à la bactérie un avantage sélectif lors de la colonisation précoce des plants de tomates.

Mon travail a consisté à purifier MelB et à déterminer les conditions de cristallisation des complexes MelB-ligands. J'ai résolu la structure de MelB-raffinose par phasage SAD et déterminé les autres structures par remplacement moléculaire en utilisant la structure MelB-raffinose comme modèle. Pour l'étude des interactions ligands (RFO, galactinol, galactose) avec MelB, j'ai mesuré les affinités par fluorescence intrinsèque. Ces résultats ont été confirmés par microcalorimétrie sur la PF de l'i2BC (Magali Aumont-Nicaise). J'ai aussi participé à l'étude de l'occurrence et à la parenté de cette PBP chez d'autres bactéries par des études de phylogénie.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant publié dans *Journal of Biological Chemistry* (Meyer et al. 2018).

Article 3: The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*



The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*

Received for publication, January 13, 2018, and in revised form, March 27, 2018. Published, Papers in Press, March 30, 2018, DOI 10.1074/jbc.RA118.001856

Thibault Meyer^{†1,2}, Armelle Vigouroux^{§1}, Magali Aumont-Nicaise[§], Gilles Comte[†], Ludovic Vial[†], Céline Lavire^{†3}, and Solange Moréra^{§4}

From the [†]UMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne, Lyon, France and [§]CNRS CEA Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Edited by Joseph M. Jez

The bacterial plant pathogen *Agrobacterium fabrum* uses periplasmic-binding proteins (PBPs) along with ABC transporters to import a wide variety of plant molecules as nutrients. Nonetheless, how *A. fabrum* acquires plant metabolites is incompletely understood. Using genetic approaches and affinity measurements, we identified here the PBP MelB and its transporter as being responsible for the uptake of the raffinose family of oligosaccharides (RFO), which are the most widespread D-galactose-containing oligosaccharides in higher plants. We also found that the RFO precursor galactinol, recently described as a plant defense molecule, is imported into *Agrobacterium* via MelB with nanomolar range affinity. Structural analyses and binding mode comparisons of the X-ray structures of MelB in complex with raffinose, stachyose, galactinol, galactose, and melibiose (a raffinose degradation product) revealed how MelB recognizes the nonreducing end galactose common to all these ligands and that MelB has a strong preference for a two-unit sugar ligand. Of note, MelB conferred a competitive advantage to *A. fabrum* in colonizing the rhizosphere of tomato plants. Our integrative work highlights the structural and functional characteristics of melibiose and galactinol assimilation by *A. fabrum*, leading to a competitive advantage for these bacteria in the rhizosphere. We propose that the PBP MelB, which is highly conserved among both symbionts and pathogens from *Rhizobiace* family, is a major trait in these bacteria required for early steps of plant colonization.

The plant–rhizospheric microbial population interaction is dynamic and largely influenced by root exudates, with either beneficial or harmful consequences for plant growth develop-

ment and health (1). The germinating seeds in contact with the surrounding soil and microorganisms have strong influences on the rhizosphere composition and favor fast-growing microorganisms able to exploit carbon released, to resist to antimicrobial compounds, and to outcompete other surrounding bacteria (2–4). Raffinose and stachyose from the raffinose family of oligosaccharides (RFO)⁵ accumulate in plant seeds as energy-storage metabolites, and are released during plant germination (2, 5). The precursor of RFO synthesis, namely galactinol, a D-galactose bound to an inositol, is produced by the plant enzyme galactinol synthase (GalS) (5, 6) (Fig. 1). Galactinol plays an important role in plant health, being involved in plant resistance against abiotic (drought and temperature) (7, 8) and biotic stresses (9–11). Indeed, this molecule, which accumulates in plants in response to bacterial inoculation, is involved in the induced systemic resistance to phytopathogens (9). Raffinose and stachyose are synthesized from sucrose by the subsequent addition of activated galactose moieties donated by galactinol using plant raffinose and stachyose synthases, respectively (Fig. 1). Therefore, RFOs are α -(1,6)-galactosyl extensions of sucrose.

Periplasmic-binding proteins (PBPs) associated with their ATP-binding cassette (ABC) transporter are essential for transport (12). A PBP-mediated transport system is responsible for RFO uptake from seed exudates into bacterial cells as previously shown in *Ensifer meliloti* 1021 (13, 14). RFOs, which are degraded by α -galactosidases in this latter strain, are used as nutrients, and their assimilation may be involved in bacterial survival in plant rhizosphere (13, 14). In more detail, raffinose and stachyose can be degraded into melibiose and fructose, and raffinose and galactose, respectively (15, 16). Bacterial assimilation of RFOs and melibiose was associated with trophic advantage in plant–bacteria interaction (14, 17), whereas nothing was known for galactinol. *Agrobacteria* are telluric and rhizosphere bacteria, commonly isolated from roots of numerous plants as commensal bacteria. They can also be pathogenic with the presence of the tumor-inducing plasmid (18, 19). They are then able to create their own ecological niche after plant cell transformation that leads to tumor formation in a wide range of

This work was supported by CNRS (Mission pour l'interdisciplinarité, Agromics 2014–2016) (to T. M., A. V., S. M., and C. L.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Figs. S1 and S2 and Tables S1 and S2.

The atomic coordinates and structure factors (codes 6EPY, 6EQ1, 6EQ8, 6EQ0, and 6EPZ) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

¹ This work was submitted to fulfill the requirements for a doctorate of biology at ED341-E2M2 from Université de Lyon, granted from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

² These authors contributed equally to this work.

³ To whom correspondence may be addressed. E-mail: celine.lavire@univ-lyon1.fr.

⁴ To whom correspondence may be addressed. E-mail: solange.morera@i2bc.paris-saclay.fr.

⁵ The abbreviations used are: RFOs, raffinose family of oligosaccharides; PBP, periplasmic-binding protein; YPG medium, yeast peptone glucose medium; ITC, isothermal titration microcalorimetry; RMSD, root mean square deviation; dpi, days post inoculation; eGFP, enhanced GFP.

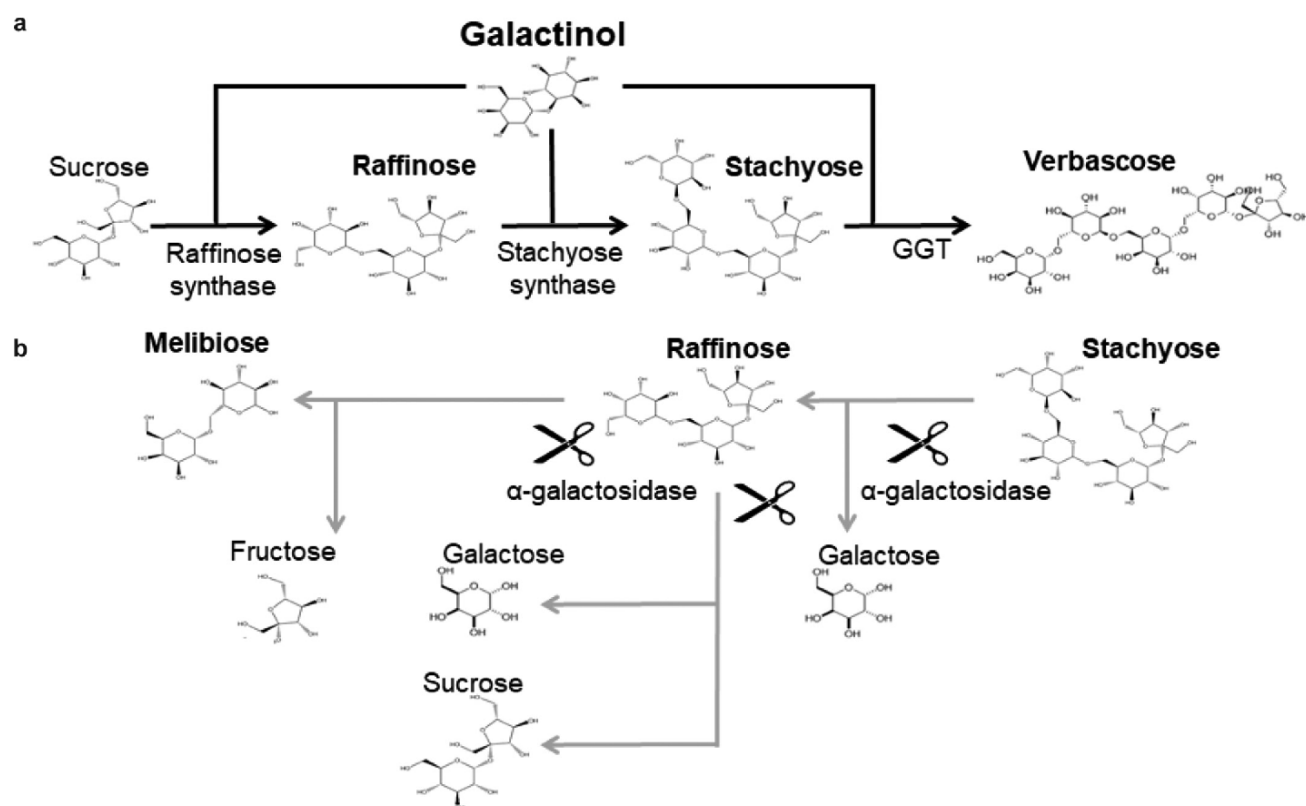


Figure 1. RFO synthesis and degradation. Reactions for synthesis (a) are represented with *black arrows* whereas those for degradation (b) are with *gray arrows*. The first step of RFOs biosynthesis starts with the formation of galactinol from UDP-galactose and inositol catalyzed by the plant enzyme galactinol synthase. Raffinose, stachyose, and verbascose are synthesized from sucrose by the subsequent addition of activated galactose moieties donated by galactinol using plant raffinose and stachyose synthases and galactan:galactan galactosyltransferase (GGT), respectively. Cleavage, shown by scissors, of raffinose by an α -galactosidase leads to the formation of either melibiose and fructose or sucrose and galactose. For RFOs of higher degree of polymerization (DP), an α -galactosidase activity results in RFOs of lower DP and galactose.

plants (18). An *in silico* analysis of α -galactosidases distribution in bacteria indicated that *Agrobacterium fabrum* C58 strain contains an operon putatively involved in RFO transport and degradation (20–22). This operon that we named *mel* is similar to the *agp* operon of *E. meliloti* (13, 14), and encodes the PBP MelB (Atu4661) which shares 73% sequence identity with the PBP AgpA, its associated ABC transporter (Atu4662–Atu4664), and two α -galactosidases (Atu4660 and Atu4665). All these latter proteins display between 74 and 86% sequence identity with their *E. meliloti* corresponding homologues (Fig. 2a).

We hypothesized that this *mel* operon was responsible for the transport and assimilation of α -galactosides in *A. fabrum*. Here, we focused on its transport function, and investigated the genetic and molecular role of the PBP MelB through an integrative approach using a defective mutant *in cellulose* and *in planta*, crystallography, and affinity measurements. We showed that MelB was the PBP responsible for RFO, melibiose, and galactinol import into *A. fabrum* C58, displaying the highest affinity for galactinol in nanomolar range and preferring to bind a 2-unit ligand. We structurally characterized the binding mode of MelB for its different ligands. Overall, our work highlights how the capacity of agrobacteria to assimilate plant α -galactosides confers on them an advantage in colonizing efficiently the plant tomato rhizosphere, explaining why the PBP MelB is highly conserved among symbionts and pathogen rhizobiales.

Results

The PBP MelB is responsible for galactinol, melibiose, and RFOs (raffinose and stachyose) uptake

The growth profiles of *A. fabrum* C58 wildtype (WT) and C58 Δ *melB*-defective mutant for MelB were compared in rich (YPG) and minimal medium containing RFOs, their derivatives or succinate (as control) as the sole source of carbon. The C58 Δ *melB* mutant has the same growth rate as the WT strain in minimum medium with succinate and in rich medium. However, the C58 Δ *melB* mutant did not grow on galactinol, melibiose, raffinose, and stachyose, in contrast to WT (Fig. 2b). Therefore, MelB associated to its ABC transporter is the transport system responsible for the uptake and is necessary for the assimilation of these four molecules in pure culture.

MelB exhibits a high affinity for galactinol

Binding of galactinol, melibiose, raffinose, and stachyose to the purified recombinant mature protein MelB was explored using tryptophan fluorescence spectroscopy (MelB possesses 16 tryptophans) and isothermal titration microcalorimetry (ITC). Intrinsic protein fluorescence titration experiments yielded apparent dissociation constant K_D values of 10 ± 1 nM and 72 ± 4 nM with galactinol and melibiose, respectively, showing that MelB is very efficient for galactinol binding.

Galactinol and melibiose bound to MelB

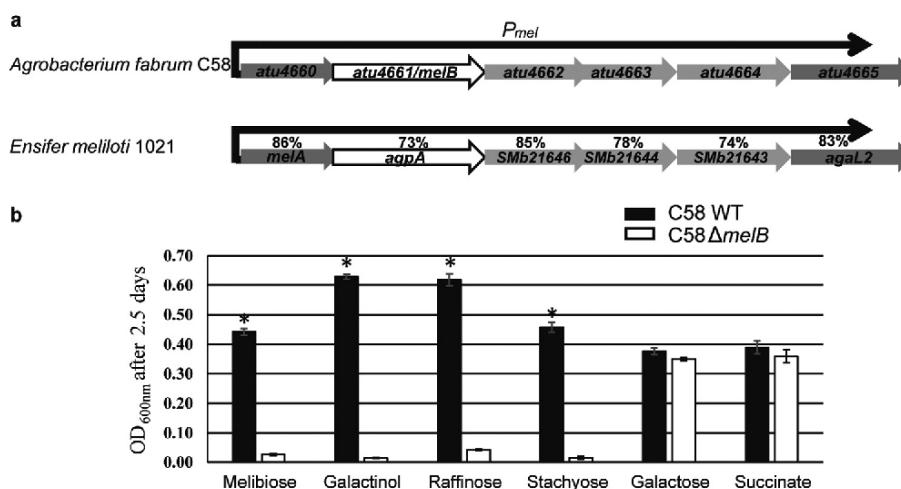


Figure 2. The *mel* operon structure and MelB involvement in galactinol, melibiose, and RFO consumption. *a*, *atu4660-atu4665* genes belong to the same transcription unit (operon prediction by Westover *et al.* (22) that we called the *mel* operon). The *mel* promoter P_{mel} indicates the gene transcription direction. Both *atu4660* and *atu4665* genes are annotated as two α -galactosidases, *atu4661* as the PBP MelB and *atu4662-atu4664* genes as the associated ABC transporter. Comparison is between the *mel* operon genes and their homologues in *E. melliloti* 1021 (13, 14), the percentages of sequence identity between each homologous protein are indicated; for example, the PBPs AgpA and MelB share 73% sequence identity. *b*, 2.5 days growth (A at 600 nm) of *A. fabrum* C58 WT strain (in white) and the C58Δ*melB* mutant (in black) in AT minimal medium supplemented with different carbon sources. Standard deviations were calculated from five technical and two biological replicates. Asterisks indicated significant differences (Mann-Whitney p value = 0.05).

Reducing the ligand size to a monosaccharide (galactose) or increasing it resulted in a substantial affinity reduction compared with galactinol: K_D values of 35-fold higher for the raffinose, and over 1000-fold higher for both galactose and stachyose, respectively (Table 1 and Fig. S1). The K_D values were slightly higher using ITC than those determined by auto-fluorescence, but this increased K_D was consistent (Table 1 and Fig. S1). Because MelB was not stable at high concentration during the time course of ITC experiment, we were not able to measure an interpretable signal for the stachyose binding. The ITC data confirmed the 1:1 binding stoichiometry for all ligands and revealed a high enthalpy of binding for galactinol and melibiose meaning that both ligands use the same binding mechanism mainly involving polar interactions. In contrast, the binding mode of raffinose was characterized by an unfavorable enthalpy contribution and a strong entropy term indicating that hydrophobic interactions may play a predominant role and/or a displacement of water molecules occurs upon ligand binding. The galactose interaction adopts an intermediate behavior with a high entropy term, accompanied by a weakly favorable enthalpy of binding, suggesting that polar bonds are less important for galactose alone compared with a 2-unit ligand, resulting in a lower enthalpy, thus a weaker affinity. MelB is specific for α -(1,6)-galactosides (RFOs). Indeed, no interaction could be measured with glucose, sucrose, cellobiose, lactose, and α -(1,6)-glucosides.

Thermal denaturation experiments revealed a contribution of more than 3 °C for two ligands for protein stability (Fig. S2). Indeed, adding galactinol or melibiose led to a melting temperature (T_m) of over 46 °C compared with the 43 °C for the unliganded protein in agreement with the measured K_D values. Galactose or stachyose binding did not stabilize MelB whereas the raffinose binding produced a slight effect with a T_m of 45 °C.

MelB is a PBP from cluster C

The mature MelB expression plasmid was a synthetic gene lacking the first 18 signal sequence residues that serve for localization to bacterial periplasm. The numbering used for the description of residues corresponds to the mature protein of 677 amino acids. Because MelB is the biggest PBP so far and shares low sequence identity (around 20%) compared with PBPs with known three-dimensional structures, we first solved the structure of seleniated MelB in complex with raffinose at 2 Å resolution by single wavelength anomalous dispersion method. The asymmetric unit is composed of four similar MelB-raffinose complexes (average root mean square deviation (RMSD) value of 0.4 Å). By the molecular replacement method, we then solved the structure of MelB in complex with galactinol, melibiose, galactose, and stachyose at 2.2, 1.8, 2.5, and 2.1 Å resolution, respectively (Table 2). The asymmetric unit of the galactinol and melibiose complexes also contains four very similar molecules with RMSD values between monomers ranging from 0.2 to 0.4 Å whereas that of the galactose and stachyose complexes possesses two identical molecules. Moreover, the five ligand-bound structures are very similar with an average RMSD value of 0.4 Å. They all adopt a closed conformation. MelB fold is monomeric, composed of two lobes, each formed by a central β -sheet flanked by α -helices (Fig. 3a). The biggest lobe (lobe 1) consists of residues 8–354 and 619–678 and the smallest (lobe 2) comprises the residues 364–610. Two short segments (Fig. 3a) define the hinge region connecting the two lobes. MelB possesses a typical fold of cluster C within the PBP structural classification (12) as SSM-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>)⁶ reports: RMSD between MelB and similar PBP structures binding oligopeptide are over 2.6 Å for 450 C α

⁶ Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party hosted site.

Table 1
Affinity measurement for MelB K_D values were measured by intrinsic protein fluorescence titration (Fluorescence) and by isothermal titration microcalorimetry (ITC).

	Fluorescence		ITC					
	K_D	R^2	K_D	n	Enthalpy (ΔH)	Entropy (ΔS)	Entropic contribution ($-T\Delta S$)	Free enthalpy (ΔG)
	μM		μM		cal/mol	cal/mol/deg	cal/mol	cal/mol
Galactinol	0.010 \pm 0.001	0.99	0.12 \pm 0.03	0.83	-6908	8	-2356	-9264
Melibiose	0.072 \pm 0.004	0.99	0.76 \pm 0.11	0.94	-6412	6.1	-1794	-8206
Raffinose	0.347 \pm 0.42	0.99	2.9 \pm 0.5	0.97	2115	32.5	-9527	-7412
Galactose	13.8 \pm 3	0.99	24 \pm 2	1	-797	18.4	-5393	-6190
Stachyose	24.6 \pm 2.4	0.99	Not determined					

Table 2
Crystallographic data and refinement parameters

Values for the highest resolution shell are in parentheses.

	MelB				
	Raffinose (SeMet)	Galactinol	Melibiose	Galactose	Stachyose
PDB code	6EPY	6EQ8	6EPZ	6EQ0	6EQ1
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
Cell parameters (\AA , $^\circ$)	$a = 354.3$ $b = 74.3$ $c = 108.2$ $\beta = 105.5$	$a = 355.3$ $b = 73.7$ $c = 108.1$ $\beta = 105.5$	$a = 351.6$ $b = 73.7$ $c = 107.6$ $\beta = 105.4$	$a = 107.8$ $b = 73.9$ $c = 171.1$ $\beta = 92.5$	$a = 108.2$ $b = 74$ $c = 171.4$ $\beta = 92.4$
Resolution (\AA)	50-2 (2.17-2)	50-2.2 (2.3-2.2)	48-1.8 (1.9-1.8)	50-2.5 (2.59-2.5)	50-2.1 (2.2-2.1)
No. of observed reflections	1,143,584 (175,894)	725,141 (106,000)	1,633,125 (250,861)	314,407 (48,297)	541,503 (82,382)
No. of unique reflections	333,472 (51,505)	137,636 (20,717)	246,319 (38,629)	49,700 (7682)	79,391 (12,494)
R_{sym} (%)	7 (52.8)	17.1 (112.5)	10 (77.2)	18.2 (100)	15.4 (200)
Completeness (%)	99.8 (94.4)	98.7 (92.6)	99.4 (97.1)	99.2 (95.7)	99.6 (97.9)
I/σ	10.8 (2)	7.5 (1.5)	11.4 (1.9)	9 (1.6)	8.12 (0.7)
$CC_{1/2}$	99.8 (80.1)	99.3 (57.9)	99.8 (80)	99.1 (51.2)	99.7 (50.1)
R_{cryst} (%)	17.5	18.5	17.7	19.4	19.1
R_{free} (%)	19.9	21.7	19.5	24.2	22.5
RMS bond deviation (\AA)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
RMS angle deviation ($^\circ$)	1.0	1.09	1	1.16	1.13
Average B (\AA^2)					
protein	44.3	45.6	33.7	55.9	52.6
ligand	41.2	36.6	30.5	40.5	44.7
solvent	51.7	49.6	39.2	55	52.2

 $CC_{1/2}$ = percentage of correlation between intensities from random half-dataset (40).

atoms. Nonetheless, a detailed structural comparison is irrelevant because MelB presents a distinct ligand-binding site.

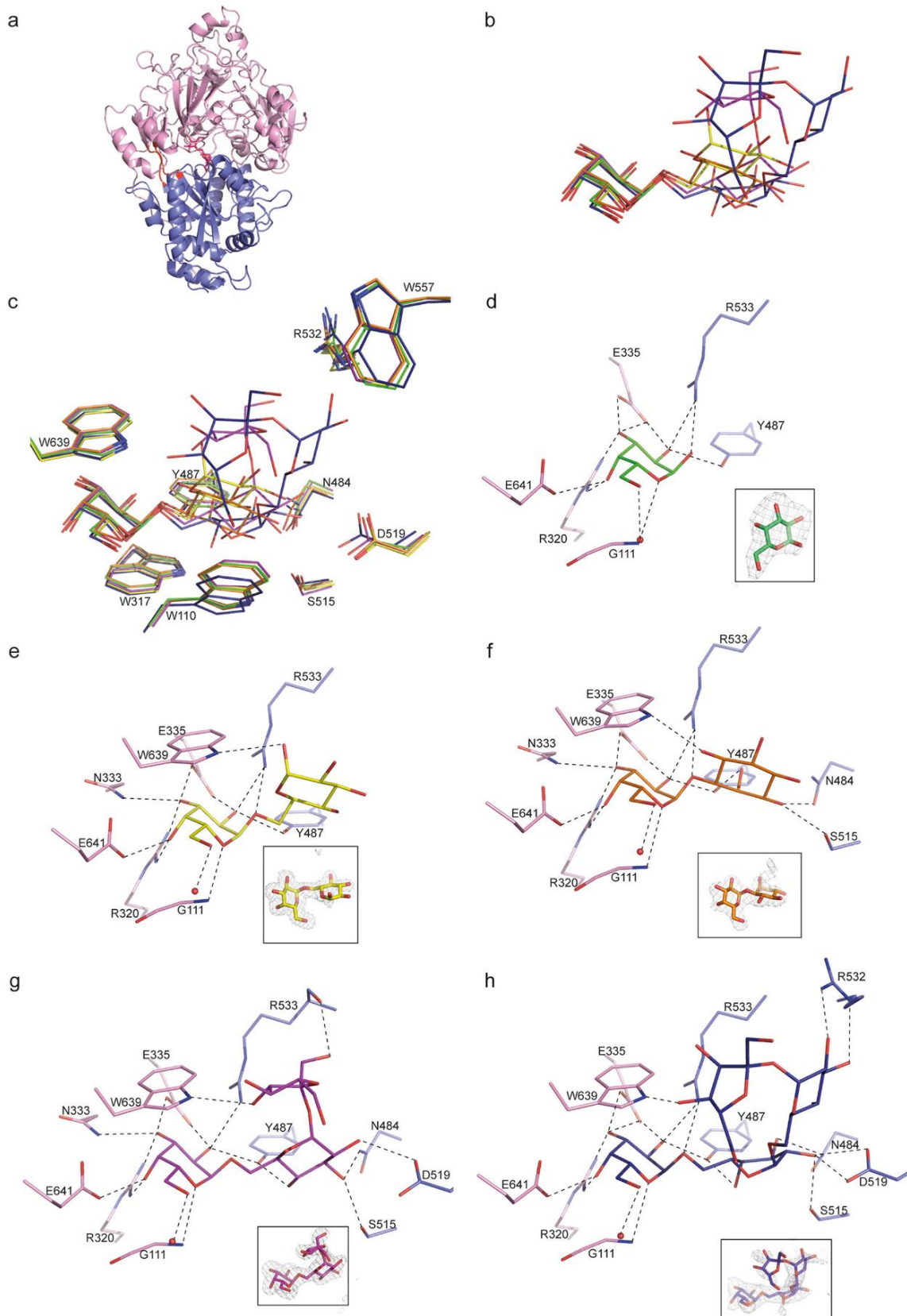
Ligand-binding site of MelB

All ligands are bound between the two closed lobes of MelB. The size and the volume of the ligand-binding site constrain the conformation of bound RFOs. Indeed, raffinose and stachyose bind in a very compact form (Fig. 3*b*), and the addition of a galactosyl moiety at the nonreducing end of stachyose corresponding to verbasose will abolish its binding, because the pocket is not large enough to accommodate a pentasaccharide. All ligands are well defined in their electron density maps except the fructose moiety of the stachyose likely responsible for its low affinity (Fig. 3, *c-h*). They share a buried nonreducing end galactosyl unit wedged between two aromatic residues (Trp³¹⁷ and Trp⁶³⁹) which superimposes very well with the bound galactose alone (Fig. 3, *c-h*). These galactoses at position 1 make 10 similar protein contacts involving the main chain amino group of Gly¹¹¹ and the side chains of Arg³²⁰, Asn³³³, Glu³³⁵, and Glu⁶⁴¹ from lobe 1 and both side chains of Tyr⁴⁸⁷ and Arg⁵³³ from lobe 2. The O6 atom of this pyranose interacts with a conserved water molecule observed in each complexed structure (except in molecule B of MelB-galactose complex), which in turn makes hydrogen bonds with the amino group of Gly¹¹² and the side chain of Asp¹¹⁴. In both structures of MelB

in complex with galactose and stachyose, the galactose at position 1 does not interact with Asn³³³ but because of two hydrogen bonds with the side chain of Glu³³⁵, it conserves 10 interactions with MelB. Modeling a glucosyl unit at the nonreducing end (position 1) creates steric hindrance between the equatorial C4-OH and the Trp⁶³⁹ indol explaining the specificity of MelB for a galactosyl unit at position 1 as shown by the affinity measurement.

In contrast to position 1, at position 2, the glucosyl moieties of melibiose and raffinose, the inositol moiety of galactinol and the galactose moiety of stachyose do not superimpose and can shift up to 3.5 \AA to allow, for example, the fructose or the sucrose accommodation of raffinose and stachyose in the ligand-binding site, respectively (Fig. 3, *b* and *c*). A conformational change less than 1 \AA for Trp¹¹⁰ and Tyr⁴⁸⁷ side chains is observed to accommodate a glucosyl unit at position 2 (Fig. 3*c*). More arrangements from amino acids of lobe 2 can occur to accommodate the glucosyl units at positions 3 and 4 (Fig. 3*c*). For example, Trp⁵⁵⁷ is pushed away by more than 1 \AA compared with the other liganded structures to find a room for the fructose at position 4. All units at position 2 have in common the stacking onto the aromatic indol of Trp¹¹⁰, with the optimum one for the inositol because of the shorter link (one carbon shorter) between the two subunits of galactinol compared with melibiose and RFOs. The melibiose's glucose and the inositol

Galactinol and melibiose bound to MelB



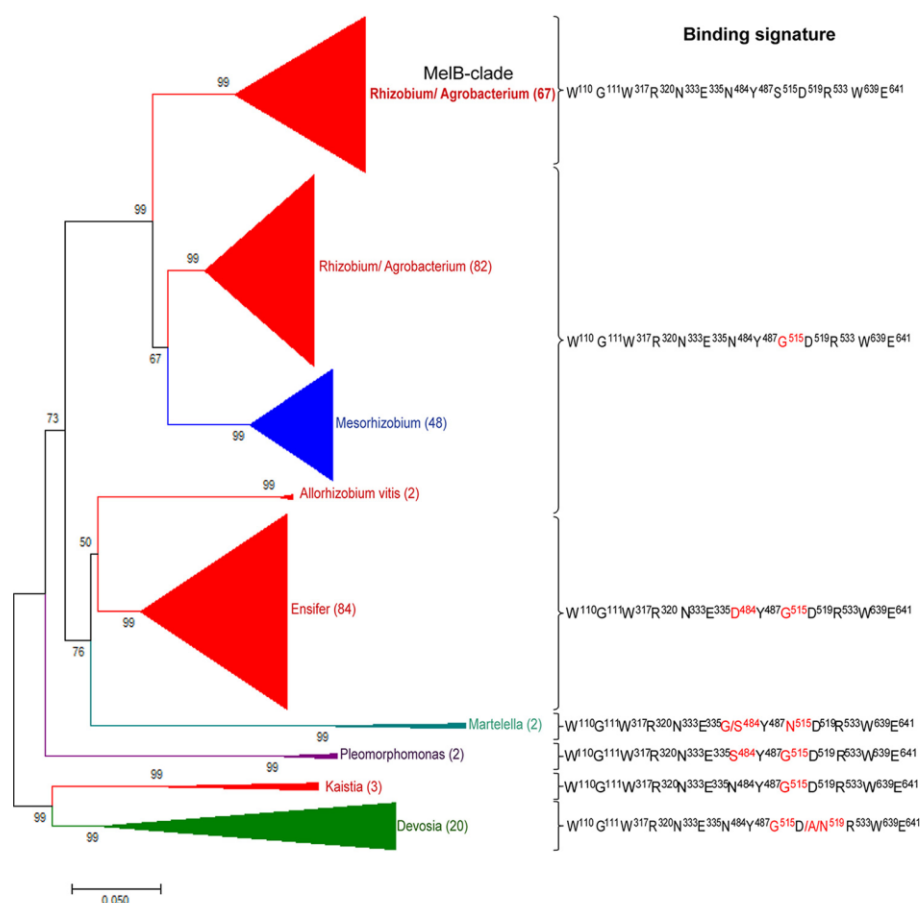


Figure 4. MelB phylogeny and binding signature. For each protein clade, the residues, which are identical to (*black*) and different from (*red*) those involved in the galactinol/melibiose/raffinose binding of *A. fabrum* C58 MelB are indicated. Number in bracket represents the number of MelB-relative PBPs per clade.

share only one protein contact: an oxygen interacts with the NH of the Trp⁶³⁹ side chain (Fig. 3, *e* and *f*). The inositol makes three additional hydrogen bonds with Asn⁴⁸⁴, Tyr⁴⁸⁷, and Ser⁵¹⁵ from lobe 2 whereas the rest of the oxygen of the melibiose's glucose interacts with the protein side chains via water molecules only. In contrast, the glucose moiety of raffinose and the galactose moiety of stachyose at position 2 make an additional H-bond compared with inositol involving the side chains of Asp⁵¹⁹ (Fig. 3, *g* and *h*). The fructose at position 3 in raffinose interacts with the main chain of Arg⁵³³ from lobe 2 and the NH of the Trp⁶³⁹ indol from lobe 1 (Fig. 3*g*). In contrast, Arg⁵³² side chain makes two H-bonds with the glucose moiety at position 3 in stachyose whereas only one is present between the fructose moiety at position 4 and the Trp⁶³⁹ side chain (Fig. 3*h*).

MelB is highly conserved among rhizobiales

Searching for MelB conservation in the bacterial kingdom (protein database at NCBI), and subsequent phylogenetic anal-

ysis revealed >310 PBPs above 65% sequence identity (Fig. 4). Galactinol-, melibiose-, and raffinose-binding signatures share 10 amino acids Trp¹¹⁰-Gly¹¹¹-Trp³¹⁷-Arg³²⁰-Asn³³³-Glu³³⁵-Tyr⁴⁸⁷-Arg⁵³³-Trp⁶³⁹-Glu⁶⁴¹. Stachyose binding shares only nine of these latter because Asn³³³ does not interact with stachyose. Two additional residues (Asn⁴⁸⁴ and Ser⁵¹⁵) are involved in galactinol, raffinose, and stachyose binding compared with melibiose binding. One additional residue Asp⁵¹⁹ belongs to the raffinose and stachyose signatures. A last additional residue Arg⁵³² defines the stachyose-binding signature composed of 13 residues in total. Members of the MelB subgroup (67 PBPs) display more than 90% identity sequence with the conserved binding signature. They all belong to *Rhizobium* and *Agrobacterium* genera. Outside the MelB cluster, the signature slightly degenerates for galactinol and raffinose binding. Nonetheless, modeling indicates that their binding would not be affected. Remark-

Figure 3. Ribbon representation of MelB structures and ligand-binding site. *a*, raffinose in *magenta* is located in the cleft between lobes 1 and 2 shown in *slate* and in *pink*, respectively, and the hinge region is in *red*. *b*, superposition of the bound galactose, melibiose, galactinol, raffinose, and stachyose shown in *green*, *yellow*, *orange*, *magenta*, and *blue* sticks, respectively, in the binding site of MelB. *c*, same figure as in *b* showing the stacking between ligands and tryptophan (Trp⁶³⁹, Trp³¹⁷, and Trp¹¹⁰). Except Trp⁶³⁹ and Trp³¹⁷, all the other labeled amino acids mainly from lobe 2 can move up to 1 Å upon ligand binding. *d-h*, galactose (*d*), melibiose (*e*), galactinol (*f*), raffinose (*g*), and stachyose (*h*) bound to the binding site of MelB are shown in the same code color as in *b*. Hydrogen bonds between MelB and each ligand are shown as *dashed lines in black* (distances are up to 3.2 Å). A water molecule forming a hydrogen bond with each ligand is shown as a *red circle*. Each ligand is shown in its annealing Fo-Fc omit map contoured at 4σ.

Galactinol and melibiose bound to MelB

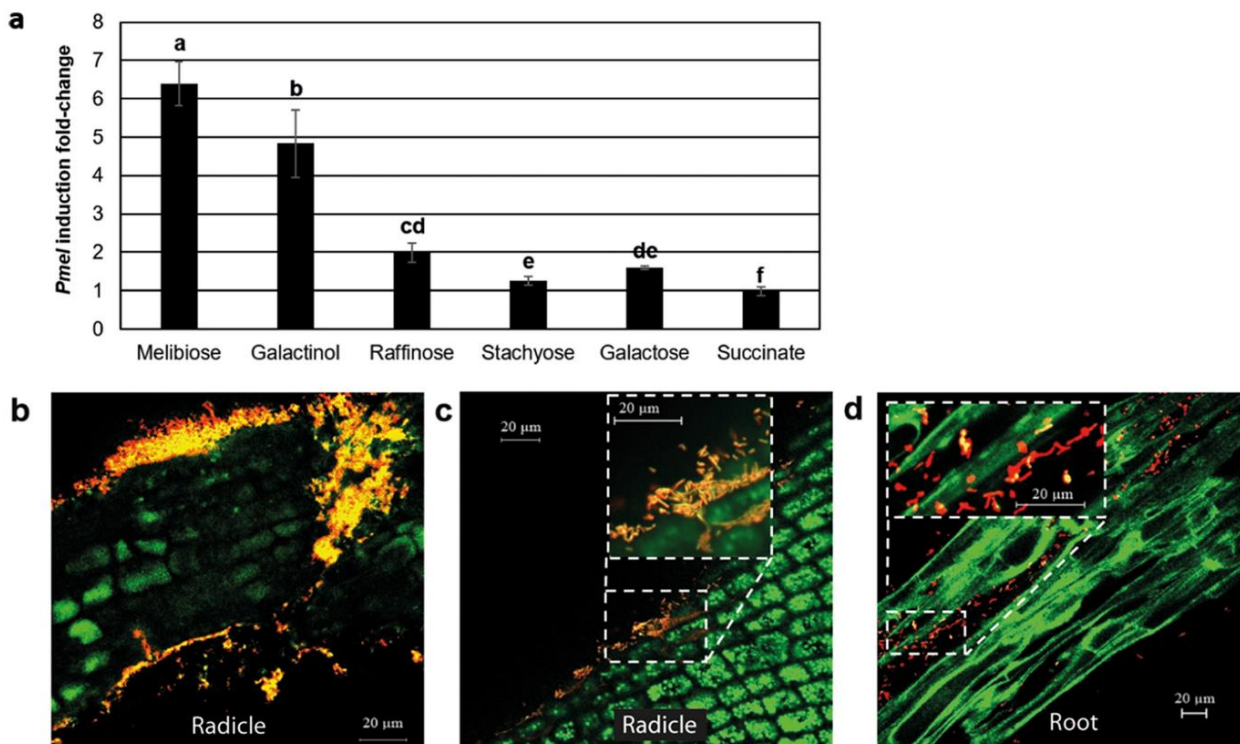


Figure 5. Expression of *mel* operon genes in *cellulo* and in tomato radicle and root. *a*, comparison of *mel* operon gene expression in AT minimal medium supplemented with different carbon sources. Standard deviations were obtained from four technical and two biological replicates. Letters above histograms indicate significant different -fold change values (Tukey's test, p value = 0.05). *b–d*, bacterial *mel* operon gene expression at two early stages of plant growth. Gene expression was monitored using the pOT1eM-*P_{mel}* transcriptional reporter fusion by confocal microscopy at 2 (*b* and *c*) and 14 (*d*) dpi, corresponding to radicle emergence and root elongation stages, respectively. Representative pictures from five plants per stages are shown. Red fluorescence from *M*-cherry indicates the presence of bacteria, whereas yellow fluorescence shows bacteria that were both active and able to express *P_{mel}-egfp*. Plant auto fluorescence, represented in green allows distinguishing different types of plant cells, small compact cells from the radicle and elongated cells from the growing root. The scale is represented in white. Most cells expressed *P_{mel}-egfp* at 2 dpi, whereas at 14 dpi, few cells only expressed the transcriptional fusion.

ably, all these PBPs belong to soil- and plant-interacting genera.

Galactinol and melibiose are inducers of *mel* operon genes

We constructed the C58 pOT1e-*P_{mel}* reporter fusion strain to study *in cellulo* gene expression of *mel* operon in the presence of commercial compounds. Compared with succinate, slight but significant inductions were observed with raffinose, galactose, and stachyose (2-, 1.6-, and 1.25-fold change values, respectively) (Fig. 5*a*). In contrast, galactinol and melibiose are efficient inducers with 4.8- and 6.5-fold change values, respectively.

mel operon genes are expressed in early plant colonization

At two early stages of plant colonization, *in planta* expression of *mel* operon has been studied in the WT strain harboring the pOT1eM-*P_{mel}* plasmid reporter fusion (*m*-cherry constitutive expression and *egfp* inducible expression). 48 h after seed imbibition and inoculation, most bacteria in contact with the radicle cells expressed *mel* operon, as shown by the yellow cells in Fig. 5, *b* and *c*. 14 days after seed imbibition and inoculation, among bacterial cells present on plant roots (red and yellow cells), some of them were still expressing RFO uptake and degradation genes (yellow cells in Fig. 5*d*). Thus, *mel* operon was more expressed at the beginning of plant colonization.

The PBP MelB confers a competitive advantage in colonizing tomato rhizosphere

The colonization of plant rhizosphere by *A. fabrum* C58 WT and C58 Δ *melB* mutant was evaluated at 2 days post inoculation (dpi) and 14 dpi (Fig. 6). When tomato seeds were inoculated with each strain individually, the bacterial colonization level did not significantly differ at 2 dpi (Mann-Whitney p value of 0.09) whereas at 14 dpi, this was slightly higher for the WT strain (Mann-Whitney p value $< 2.2 \times 10^{-16}$) (Fig. 6*a*). When *A. fabrum* C58 WT and C58 Δ *melB* mutant were co-inoculated, a slight and a drastic reduced fitness was observed for the C58 Δ *melB* mutant at 2 and 14 dpi, respectively (Fig. 6*b*), revealing a selective advantage conferred by galactinol/melibiose/RFO exploitation under a competitive challenge.

Discussion

This work reveals the molecular and ecological roles, and structural basis of the PBP MelB, encoded by the linear chromosome of *A. fabrum* C58.

At the beginning of the study, we made the straightforward assumption that MelB was behaving like its homologous PBP AgpA from *E. meliloti* described as an α -galactoside transporter (13). Our gene expression analyses and growth assays experiments showed that similarly to what has been reported for expression of *agp* operon genes in *E. meliloti*, α -galactosides

Galactinol and melibiose bound to MelB

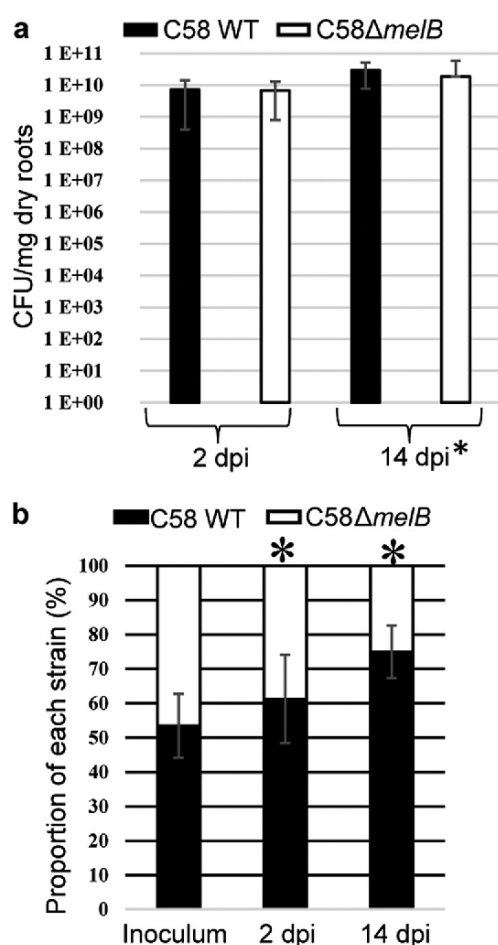


Figure 6. MelB confers a competitive advantage in tomato roots. *a*, *A. fabrum* bacterial concentration (cfu/mg dry roots) in tomato roots (at 2 and 14 dpi) infected with either *A. fabrum* C58 WT or C58Δ*melB* mutant. Standard deviations were calculated from three technical and five biological replicates. *b*, proportion of *A. fabrum* genotypes (%) in inoculum and tomato root at 2 and 14 dpi infected with a mixture (1:1 ratio) of *A. fabrum* C58 WT and C58Δ*melB* mutant. Standard deviations were calculated from 4 biological replicates and 10 independent assays. Asterisks indicate significant differences (Mann-Whitney test).

induce expression of *mel* operon genes in *A. fabrum*, and are used as carbon sources after being imported by MelB. Indeed, in contrast to the WT strain, a MelB defective mutant is unable to grow on α -galactosides. Moreover, using two different biophysical methods, we demonstrated that MelB can bind melibiose, raffinose, and stachyose. Because of the small volume cavity of the ligand binding, stachyose displays a weak affinity for MelB (micromolar range) compared with melibiose and raffinose (nanomolar range). The accommodation of stachyose requires drastic conformational constraints on the ligand when bound to the protein. Indeed, only small local rearrangements of few protein side chains (Trp¹¹⁰ and Trp⁵⁵⁷) forming the binding site can occur. With an affinity in the micromolar range, MelB also binds galactose, which is the sugar common to all α -galactosides present at the nonreducing end. Nonetheless, the low affinity of MelB for galactose prevents galactose from competing with melibiose and raffinose. From our results, MelB can appear as an alternative galactose transporter suspected by

Kemner *et al.* (23), which allowed a *chvE-gguABC* defective mutant to grow on galactose (23, 24). Conversely, the presence of the ChvE-GguABC sugar transporter can explain why *melB* defective mutant was still able to grow on galactose.

An unexpected outcome of our study was that galactinol, which is the precursor of α -galactosides production in plants, was uptaken into agrobacteria via the MelB-mediated transport system. Moreover, MelB displays a preference for galactinol with high affinity (nanomolar range) indicating that this molecule must be efficiently imported into *A. fabrum*, in line with the gene expression results. Remarkably, MelB recognizes similarly the nonreducing end galactose common to all tested α -galactosides and galactinol. Overall, using genetic, structural, and affinity data, this work demonstrates that the MelB-mediated transport system contributes to the import of α -galactosides with a strong preference for a 2-unit ligand (melibiose) and mainly contributes to that of galactinol. To our knowledge, this is the first description of a bacterial PBP allowing galactinol import.

The imported sugars are used to sustain bacterial growth. Galactinol- and α -galactoside-rich environments would facilitate the settlement of bacteria capable to assimilate these plant compounds efficiently. From *in planta* competition assays on tomato between the *A. fabrum* WT and *melB* defective mutant, we showed that MelB confers a marked selective advantage in colonizing tomato rhizosphere, and since early time. This observation correlates with the presence of melibiose and raffinose in the plant rhizosphere, as they are highly abundant in the seeds (25) and known to be released during seed germination (14). Hence, the competitive advantage of the WT in the tomato rhizosphere could be because of a trophic advantage of the strain during seed germination. A germinating seed can indeed be considered as a new environment to be colonized. The community composition of the mature plant is influenced by historical contingency (timing and order of arrival) of the seed community members and their ability to efficiently settle in that environment (26), as the first establishing species are known to affect the ability of potential immigrants to establish. This is called the priority effect (27). Thus, the ability of bacteria to compete and settle in germinating seed environment by growing on galactinol or α -galactosides released at this time could have long effect on their ability to persist and colonize plant rhizosphere. This is consistent with our findings that at 14 dpi, the competitive advantage of the WT strain is even higher than the one measured at 2 dpi.

Besides the trophic advantage linked to the *mel* operon, this operon could be associated to another aspect of bacterial plant interactions, linked to plant defense signaling and protection against pathogens. Indeed galactinol is a plant compound involved in plant defense (9–11). For example, *Pseudomonas chlororaphis* O6-mediated induced systemic resistance was shown associated with an elevation of galactinol content within plants, which conferred disease resistance against pathogen attack (9). The disease resistance was associated with induction of the expression of a set of pathogen-responsive genes (9, 10). Moreover, in *Arabidopsis*, deletion of enzymes that decrease the galactinol and/or raffinose content has been shown to increase plant resistance against the phytopathogenic nema-

Galactinol and melibiose bound to MelB

tode *Heterodera schachtii* (11). Similarly, *Agrobacterium mel-* mediated activity could modify the level of plant galactinol and/or raffinose, which could either drive bacterial recognition by the plant or reduce plant defense signaling through the fall of galactinol content. *Agrobacterium* is known to be able to bypass and overcome plant defenses (28). It would thus be of interest to study the involvement of the *mel* operon in that situation.

In this study, we defined the galactinol-/melibiose-/raffinose-binding signature and found out that this is strictly conserved in MelB homologues in *Agrobacterium* and *Rhizobium*, which share a high sequence identity over 90% with MelB. Moreover, phylogenetic and structural data showed that this wide occurrence is extended among *Rhizobiaceae*, all plant-interacting genera (*Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer*, *Marteletta*, *Pleomorphomonas*, *Kaistia*, and *Devosia*). Therefore, whatever advantage it gives, it is tempting to speculate that galactinol/melibiose (and to a lesser extent raffinose) may be associated with a selective pressure toward the acquisition of binding, transport, and degradation functions in microorganisms, making the PBP MelB a major trait in the first step of tomato colonization and likely of other plant species.

Experimental procedures

Bacterial culture conditions

Bacteria and plasmids used in this study are shown in Table S1. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB medium supplemented when it was necessary with appropriate antibiotics (tetracycline 10 µg/ml, gentamicin 15 µg/ml, ampicillin 100 µg/ml). *A. fabrum* C58 strain and its derivatives were cultivated at 28 °C in YPG (yeast extract, 5 g per liter, peptone, 5 g per liter, glucose, 10 g per liter, and pH adjusted to 7.2) rich medium supplemented when required with neomycin (25 µg/ml), kanamycin (25 µg/ml), and/or gentamicin (20 µg/ml). In growth assays, AT minimal medium supplemented with 10 mM ammonium sulfate and 10 mM carbon sources was used. 200 µl were inoculated in Bioscreen honeycomb 100-well sterile plates and incubated in a Bioscreen C Reader (Labsystems, Helsinki, Finland) at 28 °C during 5 days. Cell growth was measured every 20 min. Analyses were performed in five technical replicates and in three biological replicates.

Construction of *melB* defective mutant in *A. fabrum* C58 and transcriptional fusion

The *A. fabrum* C58 $\Delta melB$ defective mutant was constructed as described previously (29) without marker exchange. Briefly, the recombinant region containing the upstream and downstream region flanking the *melB* gene (amplified by PCR using primers listed in Table S2) was inserted into pJQ200sk vector (30) leading to a nonpolar mutant. The resulting plasmid was introduced into *A. fabrum* C58 by electroporation. Bacteria were spread on YPG medium plates containing gentamicin (20 µg/ml) for the first selection and gentamicin-resistant colonies were spread on YPG plates supplemented with 5% sucrose for the second selection. The deletion of *melB* was verified by sequencing (GenoScreen, Lille, France).

The C58 pOT1e-*P_{mel}* transcriptional reporter fusion strain was obtained as follows: the promoter region of *atu4660-atu4665* genes named *P_{mel}* was PCR amplified (using primer

listed in Table S2) and the PCR fragment obtained was ligated into ClaI-SalI digested vector pOT1e. pOT1eM-*P_{mel}* plasmid was obtained by cloning *P_{mel}* into SpeI digested pOT1eM vector as described previously (31). Transcriptional reporter constructions were introduced into *A. fabrum* by electroporation.

Cloning, expression, and purification of mature MelB

The mature MelB expression plasmid was chemically synthesized using codon optimization for the expression in *E. coli* and inserted into pET-9a plasmid using NdeI and BamHI restriction enzyme (GenScript, Piscataway, NJ). *E. coli* BL21 competent cells transformed with pET9a-MelB were grown in LB media at 37 °C until A_{600} of 0.6. 0.5 mM of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture for overnight expression at 20 °C. The cells were pelleted by centrifugation at $4000 \times g$ for 15 min at 4 °C, resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, and 20 mM imidazole, and disrupted by sonication. After centrifugation at $25,000 \times g$ for 30 min, the filtered supernatant was injected on a nickel affinity column (HiTrap 5 ml, GE Healthcare). After a washing step of 6% 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, and 300 mM imidazole (Buffer B), the protein was eluted with Buffer B and injected on a gel filtration Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) using 50 mM Tris-HCl, pH 8, and 150 mM NaCl. The protein fractions were pooled, concentrated at 10.7 mg/ml, and stored at -80 °C.

Expression and purification of mature seleniated MelB

The *E. coli* BL21 cells transformed with the plasmid pET9a-MelB were grown overnight at 28 °C in M9 media supplemented with 0.4% glucose; 2 mM $MgSO_4$; 1 μM $CaCl_2$; 100 mg/liter of lysine, threonine, and phenylalanine; and 50 mg/liter of leucine, valine, isoleucine, and methionine. The pelleted cells were resuspended in fresh M9 media (same as above) with 100 mg/liter of selenomethionine instead of methionine for 1 h at 37 °C before inducing the expression with 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside overnight at 20 °C. The cells were centrifuged at $4000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The purification protocol was the same as described above.

Crystallization and data collection of MelB

Crystallization conditions for seleniated MelB in the presence of 2 mM raffinose were screened using Qiagen kits (Valencia, CA) with a Cartesian NanoDrop robot (Genomic Solutions). The crystals were manually reproduced in hanging drops experiments by mixing equal volumes of protein solution and the precipitant solution 25% PEG 4000, 0.2 M NaCl, 0.1 M Mes, pH 6.5, and 0.2 M $CaCl_2$. For the four other complexes, a similar condition without $CaCl_2$ and 0.6 M NaCl was used. Crystals were transferred to a cryoprotectant solution (mother liquor supplemented with 25% PEG 400) and flash-frozen in liquid nitrogen. X-ray diffraction data sets were collected at 100 K on the Proxima 1 or 2 beamlines (SOLEIL synchrotron, Saint-Aubin, France). Data processing was performed using the XDS package (32) (Table 2).

Structure determination and refinement of MelB

The crystal structure of the MelB-raffinose complex was determined by SAD method from selenomethionine-labeled

protein and refined at 2 Å resolution. Solvent content analysis using CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) indicated the presence of four monomers in the asymmetric unit. The positions of 12 over 15 selenium atoms per monomer were found using SHELX suite program (33). The phases were calculated using PHASER (34) and density modification was performed by PARROT (CCP4 suite). An iterative process of manual building in COOT combined with phase calculation where a partial model was used as input, allowed the modeling of the complete polypeptide chain. The structures of all other liganded MelB were solved using the SeMet-MelB monomer as a search model. Refinement of each structure was performed with BUSTER-2.10 (34), NCS restraints, and TLS group. Because of the strong anisotropy of the crystals of MelB-stachyose, the DEBYE and STARANISO programs developed by Global Phasing Ltd. were applied to the data scaled with AIMLESS using the STARANISO server (<http://staraniso.globalphasing.org>).⁶ These programs perform an anisotropic cut-off of merge intensity data on the basis of an analysis of local $I/s(I)$; compute Bayesian estimates of structure amplitudes, taking into account their anisotropic fall-off; and apply an anisotropic correction to the data. The corrected anisotropic amplitudes were used for further refinement of the MelB-stachyose structure with BUSTER-2.10. Inspection of the density maps and manual rebuilding were performed using COOT (35). The three-dimensional models of stachyose and galactinol were generated with the ProDRG webserver (36), whereas those of melibiose and raffinose were found in the Protein Data Bank. Refinement details of each structure are shown in Table 2. Molecular graphics images were generated using PyMOL.

Fluorescence titration measurements of MelB

Each ligand bound to MelB was monitored by autofluorescence by exciting the protein at a wavelength of 295 nm and monitoring the quenching of fluorescence emission of tryptophans at 335 nm. All experiments were performed at 22 °C in 96-well plates (1/2 Area Plate-96F, PerkinElmer Life Sciences) using Tecan Infinite M1000 (Tecan, Männedorf, Switzerland) in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 150 mM NaCl with a fixed amount of proteins (1 μM) and increasing concentrations of ligand. Each ligand has no emission signal at 335 nm. The data were analyzed using Origin[®] 7 software and fitted to the following equation.

$$f = \Delta\text{Fluorescence}_{\text{max}} \times \text{abs}(x)/(K_D + \text{abs}(x)) \quad (\text{Eq. 1})$$

Isothermal titration microcalorimetry measurements of MelB

Isothermal titration microcalorimetry experiments were performed with an ITC200 isothermal titration calorimeter from MicroCal (GE Healthcare). The experiments were carried out at 20 °C. Protein concentration in the microcalorimeter cell (0.2 ml) varied from 10 to 300 μM. Nineteen injections of 2 μl of ligand solution (raffinose, stachyose, melibiose, galactose, and galactinol) concentration from 0.1 to 2.8 mM were performed at intervals of 180 s while stirring at 500 rpm. The experimental data were fitted to theoretical titration curves with software supplied by MicroCal (ORIGIN[®]). This software uses the rela-

tionship between the heat generated by each injection and ΔH (enthalpy change in kcal mol⁻¹), K_a (the association binding constant in mol⁻¹), n (the number of binding sites), total protein concentration, and free and total ligand concentrations (37).

Differential scanning calorimetry

Thermal stability of the WT and liganded MelB (13 μM and 50 μM for protein and ligand, respectively) was studied by differential scanning calorimetry (DSC) on a MicroCal model VP-DSC in a standard buffer. Each measurement was preceded by a baseline scan with the standard buffer. All solutions were degassed just before loading into the calorimeter. Scans were performed at 1 K·min⁻¹ between 20 and 90 °C. The heat capacity of the buffer was subtracted from that of the protein sample before analysis. Thermodynamic parameters were determined by fitting the data to the following equation,

$$\Delta C_p(T) = \frac{K_d(T) \Delta H_{\text{cal}} \Delta H_{\text{vH}}}{[1 + K_d(T)]^2 RT^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

where K_d is the equilibrium constant for a two-state process, ΔH_{vH} is the enthalpy calculated on the basis of a two-state process, and ΔH_{cal} is the measured enthalpy.

Phylogenetic analysis

Sequences were analyzed using BlastP from NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/>).⁶ Alignments of MelB and related sequences were conducted using ClustalW software. Relationship tree was build using Mega software, version 7. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in units of the number of amino acid substitutions per site.

Measurement of mel operon gene expression

Expression of *mel* operon genes was measured in the C58 pOT1e-P_{mel} strain. Quantification of fluorescence was carried out in a microplate filled with 200 μl of AT medium, supplemented with different carbon sources at a final concentration of 10 mM. Microplate wells were inoculated with overnight cultures to obtain an A_{600} of 0.2. A TECAN apparatus (Tecan SparkTM 15 M, Männedorf, Switzerland) was used to read microplates after 24 h of incubation at 28 °C. The following parameters were used: absorbance at 600 nm, fluorescence excitation at 488 nm, and emission at 510 nm. Results were normalized by the A_{600} and -fold change values were obtained by dividing the fluorescence by the corresponding value obtained from the empty pOT1e vector. The fluorescence level comparison was carried out using the Tukey's test (p value = 0.05) and computed with the "vegan" package in the R v3.1.3 statistical software environment (R Core Team, 2014).

Plant inoculation

For bacterial colonization, competition assays, and confocal observation studies, tomato seeds (*Solanum lycopersicum*

Galactinol and melibiose bound to MelB

“Marmande”) were sterilized as described (38). Seeds were plated on 0.8% agar plant cell culture supplemented with 1.5 g/liter of the Plant-Prod 15-15-30 High K nutrient solution (Master Plant-Prod Inc., Brampton, Ontario, Canada). They were inoculated with 10 μ l of overnight culture (10^6 cfu/ml) of a single strain (*A. fabrum* C58 pTi_{at}u6148:*K_m* derivative of the WT strain (39) or C58 Δ *melB* mutant), or with a mixture of both at 1:1 ratio (competition). Petri dishes were placed 2 days in the dark and then in a climatic chamber at 24 °C with 18/8 h for light/dark and 65% of humidity. To determine bacterial colonization level, roots were ground at 2 and 14 dpi. Serial dilutions of crushed roots were plated on the YPG medium and colonies were counted after 2 days of incubation at 28 °C. Significant difference in the population level resulting from five plants per strain, with enumeration of three Petri dishes for each plant, was evaluated with Mann-Whitney test (p value = 0.05) performed with the R v3.1.3 statistical software environment.

In competition experiments, the colonized bacteria were nonselectively recovered at 2 and 14 dpi. To that end, crushed roots were first plated with a spiral plater (EasySpiral[®], Inter-science, Saint-Nom-la-Bretèche, France) on YPG medium without antibiotics to enable a biologically unbiased recovery of both C58 pTi_{at}u6148:*K_m* WT strain and C58 Δ *melB* mutant (kanamycin sensitive). Two hundred individual colonies were then plated in YPG medium with kanamycin/neomycin to determine the relative proportions of C58 pTi_{at}u6148:*K_m* and C58 Δ *melB* mutant strains (output ratio). The determination of the initial strains ratio of the inoculum was realized using the same protocol. The experimental assays were performed with 10 independent assays and repeated four times. The proportions of WT strains between the initial strain ratio and *in planta* output ratios were compared with the test of equal or given proportions (p value = 0.05).

Confocal microscopy analyses

Visualization of reporter bacterial cells harboring pOT1eM-*P_{mel}* on tomato radicles and roots was performed using a confocal laser scanning microscope (LSM 800 Meta Confocal Microscope, Zeiss, Oberkochen, Germany). In the reporter strain, M-Cherry (red color) is constitutively expressed and enhanced GFP (eGFP) (green color) is expressed under *P_{mel}* control. The red color indicates the bacteria presence (red cells) whereas eGFP reports the induction of *P_{mel}* shown as yellow-green cells. At 2 and 14 dpi, tomato radicles and roots were mounted between a slide and a coverslip in a commercial mounting fluid (Aqua Poly/Mount, Polysciences, Inc., Warrington, PA). The eGFP and the M-cherry were excited with argon laser at 488 nm and 584 nm, respectively, and fluorescence was captured at 528 nm and 607 nm. Analyses of images (five plants per condition) were performed thanks to LSM 800 software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Coordinates

The atomic coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank (PDB) under accession codes 6EPY (seleniated MelB with raffinose), 6EQ1 (MelB with

stachyose), 6EQ8 (MelB with galactinol), 6EPZ (MelB with melibiose) and 6EQ0 (MelB with galactose).

Author contributions—T. M., L. V., and C. L. performed all the microbiology work. A. V. and S. M. performed all the crystallography work. A. V. performed the fluorescence assays. A. V. and M. A. N. performed the microcalorimetry experiments. A. V., T. M., C. L., and S. M. performed the phylogenetic analysis. S. M. and C. L. wrote the manuscript. All the authors discussed the results and contributed to the writing of the manuscript.

Acknowledgments—This work has benefited from the I2BC crystallization and microcalorimetry platforms supported by FRISBI ANR-10-INSB-05-01 as well as from the “Centre Technologique des Microstructures” and the “Serre et chambres climatiques” platforms, supported by the FR BioEnviS Research Federation. We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposals ID 20130869, 20140774, and 20160782) in using Proxima beamlines. We thank Andrew Saurin for critical reading of the manuscript.

References

1. Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 233–266 [CrossRef Medline](#)
2. Nelson, E. B. (2004) Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 271–309 [CrossRef Medline](#)
3. Nelson, E. B. (2018) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* **422**, 7–34 [CrossRef](#)
4. Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., and Jacquesa, M.-A. (2015) Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1257–1266 [CrossRef Medline](#)
5. Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., and Majumder, A. L. (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 656 [CrossRef Medline](#)
6. Nishizawa, A., Yabuta, Y., and Shigeoka, S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* **147**, 1251–1263 [CrossRef Medline](#)
7. Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **29**, 417–426 [CrossRef Medline](#)
8. Ibáñez, C., Collada, C., Casado, R., González-Melendi, P., Aragoncillo, C., and Allona, I. (2013) Winter induction of the galactinol synthase gene is associated with endodormancy in chestnut trees. *Trees* **27**, 1309–1316 [CrossRef](#)
9. Kim, M. S., Cho, S. M., Kang, E. Y., Im, Y. J., Hwangbo, H., Kim, Y. C., Ryu, C.-M., Yang, K. Y., Chung, G. C., and Cho, B. H. (2008) Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 1643–1653 [CrossRef Medline](#)
10. Cho, S. M., Kang, E. Y., Kim, M. S., Yoo, S. J., Im, Y. J., Kim, Y. C., Yang, K. Y., Kim, K. Y., Kim, K. S., Choi, Y. S., and Cho, B. H. (2010) Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* **88**, 452–461 [CrossRef](#)
11. Siddique, S., Endres, S., Sobczak, M., Radakovic, Z. S., Fragner, L., Grun- dler, F. M. W., Weckwerth, W., Tenhaken, R., and Bohlmann, H. (2014) Myo-inositol oxygenase is important for the removal of excess myo-inositol from syncytia induced by *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* **201**, 476–485 [CrossRef Medline](#)
12. Berntsson, R. P.-A., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **584**, 2606–2617 [CrossRef Medline](#)

13. Gage, D. J., and Long, S. R. (1998) α -Galactoside uptake in *Rhizobium meliloti*: Isolation and characterization of *agpA*, a gene encoding a periplasmic binding protein required for melibiose and raffinose utilization. *J. Bacteriol.* **180**, 5739–5748 [Medline](#)
14. Bringhurst, R. M., Cardon, Z. G., and Gage, D. J. (2001) Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4540–4545 [CrossRef](#) [Medline](#)
15. Liljeström, P. L., and Liljeström, P. (1987) Nucleotide sequence of the *melA* gene, Coding for α -galactosidase in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2213–2220 [CrossRef](#) [Medline](#)
16. Charaoui-Boukerzaza, S., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2013) A family 3 glycosyl hydrolase of *Dickeya dadantii* 3937 is involved in the cleavage of aromatic glucosides. *Microbiology.* **159**, 2395–2404 [CrossRef](#) [Medline](#)
17. Liu, Y., Chen, L., Wu, G., Feng, H., Zhang, G., Shen, Q., and Zhang, R. (2017) Identification of root-secreted compounds involved in the communication between cucumber, the beneficial *Bacillus amyloliquefaciens*, and the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **30**, 53–62 [CrossRef](#) [Medline](#)
18. Nester, E. W. (2014) *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.* **5**, 730 [CrossRef](#) [Medline](#)
19. Abarca-Grau, A. M., Penyalver, R., López, M. M., and Marco-Noales, E. (2011) Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces: Biofilms formed by *Agrobacterium* spp. *Plant Pathol.* **60**, 416–425 [CrossRef](#)
20. Hall, B. G., Pikiš, A., and Thompson, J. (2009) Evolution and biochemistry of family 4 glycosidases: Implications for assigning enzyme function in sequence annotations. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 2487–2497 [CrossRef](#) [Medline](#)
21. Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., et al. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science.* **294**, 2317–2323 [CrossRef](#) [Medline](#)
22. Westover, B. P., Buhler, J. D., Sonnenburg, J. L., and Gordon, J. I. (2005) Operon prediction without a training set. *Bioinformatics* **21**, 880–888 [CrossRef](#)
23. Kemner, J. M., Liang, X., and Nester, E. W. (1997) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. *J. Bacteriol.* **179**, 2452–2458 [CrossRef](#) [Medline](#)
24. Cornish, A., Greenwood, J. A., and Jones, C. W. (1989) Binding-protein-dependent sugar transport by *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens* grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3001–3013 [CrossRef](#) [Medline](#)
25. Andersen, K. E., Bjerregaard, C., Møller, P., Sørensen, J. C., and Sørensen, H. (2005) Compositional variations for α -galactosides in different species of leguminosae, brassicaceae, and barley: A chemotaxonomic study based on chemometrics and high-performance capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5809–5817 [CrossRef](#) [Medline](#)
26. Kristin, A., and Miranda, H. (2013) The root microbiota—a fingerprint in the soil? *Plant Soil* **370**, 671–686 [CrossRef](#)
27. Fukami, T., Martijn Bezemer, T., Mortimer, S. R., and van der Putten, W. H. (2005) Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly. *Ecol. Lett.* **8**, 1283–1290 [CrossRef](#)
28. Veena Jiang, H., Doerge, R. W., and Gelvin, S. B. (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J.* **35**, 219–236 [CrossRef](#)
29. 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., and Nesme, X. (2011) Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.* **3**, 762–781 [CrossRef](#)
30. 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 [CrossRef](#) [Medline](#)
31. Meyer, T., Renoud, S., Vigouroux, A., Miomandre, A., Gaillard, V., Kerzaon, I., Prigent-Combaret, C., Comte, G., Moréra, S., Vial, L., and Lavire, C. (2018) Regulation of hydroxycinnamic acid degradation drives *Agrobacterium fabrum* lifestyles. *Mol. Plant Microbe Interact.* [CrossRef](#) [Medline](#)
32. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 [CrossRef](#) [Medline](#)
33. Sheldrick, G. M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A.* **64**, 112–122 [CrossRef](#) [Medline](#)
34. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 [CrossRef](#) [Medline](#)
35. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 [CrossRef](#) [Medline](#)
36. Schüttelkopf, A. W., and van Aalten, D. M. F. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1355–1363 [CrossRef](#) [Medline](#)
37. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137 [CrossRef](#) [Medline](#)
38. Vacheron, J., Moënne-Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves-Martins, M., Muller, D., and Prigent-Combaret, C. (2016) Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front. Plant Sci.* **7**, 1212 [CrossRef](#) [Medline](#)
39. Lang, J., Planamente, S., Mondy, S., Dessaux, Y., Moréra, S., and Faure, D. (2013) Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumour. *Mol. Microbiol.* **90**, 1178–1189 [CrossRef](#) [Medline](#)
40. Karplus, P. A., and Diederichs, K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science.* **336**, 1030–1033 [CrossRef](#) [Medline](#)

The plant defence signal galactinol is used as a resource of high specificity by the pathogen *Agrobacterium fabrum*

Thibault Meyer^{1#}, Armelle Vigouroux^{2#}, Magali Aumont-Nicaise², Gilles Comte¹, Ludovic Vial¹, Céline Lavire^{1*} & Solange Moréra^{2*}

¹ UMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne, Lyon, France; ² Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS CEA Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Running title: Galactinol and melibiose bound to MelB

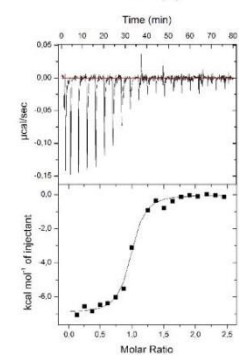
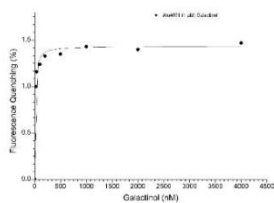
Supporting Information: Figs. S1-S2 and Tables S1-S2

Fig. S1. ITC and fluorescence K_D measurements of MelB towards RFOs and their derivatives. The top graphs show fluorescence monitoring of MelB upon titration with each ligand and fit (solid line) to a single binding model using Origin 7. Measures were done in triplicate. The lower graphs correspond to microcalorimetry experiments. The top panel shows heat differences upon injection of ligand and low panel shows integrated heats of injection with the best fit (solid line) to a single binding model using Microcal ORIGIN.

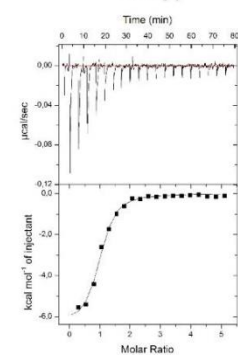
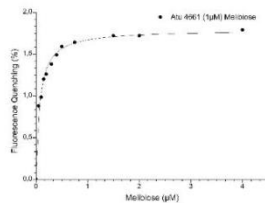
Fig. S2. DSC thermograms of MelB

Figure S1

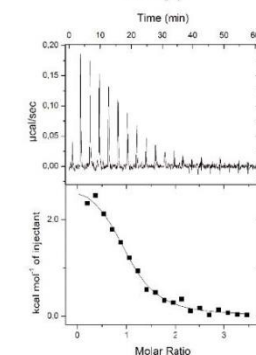
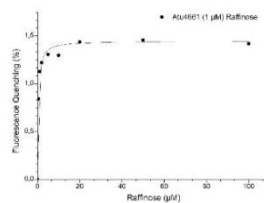
MelB-galactinol



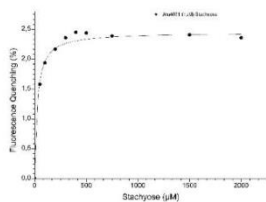
MelB-melibiose



MelB-raffinose



MelB-stachyose



Not
determined
by ITC

MelB-galactose

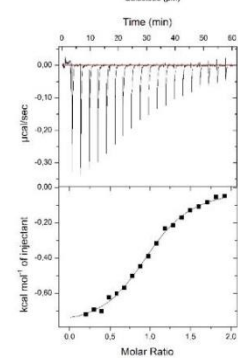
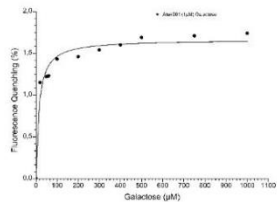
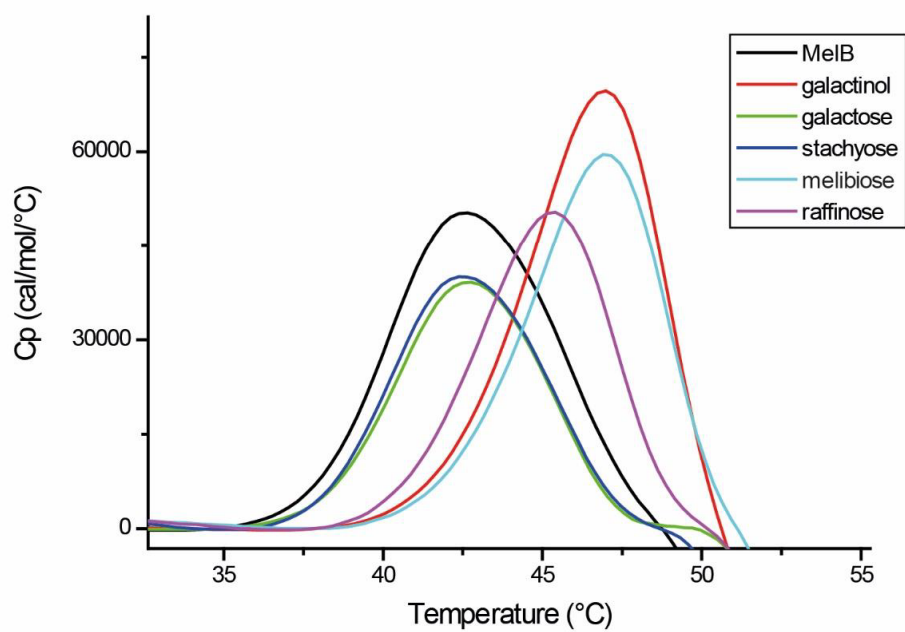


Figure S2



	Tm (°C)	ΔH (Kcal/mol/°C)
MelB	43.5	323
+ galactinol	46.5	362
+ galactose	43.3	225
+ stachyose	43.2	236
+ melibiose	46.6	314
+ raffinose	45.1	265

Table S1. Strains and plasmids used in this study

Strains	Relevant genotype and description	Reference or source
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)</i>	NEB catalog
BL21	$F^- ompT gal dem lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$	NEB catalog
Stellar	<i>F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA - argF) U169, Δ(mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ-</i>	Takara Clontech
<i>Agrobacterium fabrum</i>		
C58	Wild-type	CFBP 1903
C58Δ <i>melB</i> (<i>atu4661</i>)	C58 deleted of <i>melB</i> (<i>atu4661</i>) gene	This study
C58 p <i>Tiatu6148</i> :Km	C58 disrupted for <i>atu6148</i> gene ; Km ^R	1
Plasmids		
pJQ200SK	Suicide vector; P15A sacB; Gm ^R	2
pOT1e	Promoter-probe vector based on pBBR1MCS-5 replicon; contains promoterless eGFP and MCS between two transcriptional terminators; Gm ^R	3
pOT1eM	pOT1e derivative harboring <i>Ptac-m-cherry</i> inserted in ClaI-SalI site	Unpublished result
pET-9(a)	<i>E. coli</i> expression vector (N-term T7-tag fusion), Km ^R	Novagen
P <i>mel</i> -eGFP	Upstream region <i>atu4660-atu4665</i> inserted in ClaI-SalI site in pOT1e; Gm ^R	This study
pOT1eM-P <i>mel</i> -eGFP	Upstream region <i>atu4660-atu4665</i> inserted in SpeI site in pOT1eM; Gm ^R	This study
pET-9(a)- <i>melB</i>	<i>melB</i> inserted in NdeI-BamHI site in pET-29(a) (N-term T7-tag fusion), Km ^R	This study

Table S2. Primers used in this study

Primer				
Target	Primer name	Primer sequence (5'-3')		Reference
<i>Transcriptional fusion</i>				
<i>mel</i> promoter insertion into pOT1e	<i>Pmel</i> F	ATCGATACCACATAATGGCGGTTCTC		This study
	<i>Pmel</i> R	CGAGATTGTGCTGGCTGATA		
<i>mel</i> promoter insertion into pOT1eM	<i>Pmel</i> F'	CGGGGGATCCACTAGACCACATAATGGCGGTTCTC		This study
	<i>Pmel</i> R'	TTCTTCCTCCACTAGCGAGATTGTGCTGGCTGATA		
<i>Deletion of melB</i>				
<i>melB</i> flanking upstream region	<i>Upmel</i> BF	GAATTCCTGCAGCCCCAACCACCAGACATGGTTC		This study
	<i>Upmel</i> BR	GGATATGCTTCAGTTTTCATCGTCATTCCTCCC		
<i>melB</i> flanking downstream region	<i>Dwmel</i> BF	AACTGAAGCATATCCGGGA		This study
	<i>Dwmel</i> BR	ACTAGTGGATCCCCCTCTCGCCACTCAGCATGT		

References

1. Lang, J. *et al.* Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumour. *Mol. Microbiol.* **90**, 1178–1189 (2013).
2. Quandt, J. & Hynes, M. F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15–21 (1993).
3. Allaway, D. *et al.* Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environ. Microbiol.* **3**, 397–406 (2001).

Chapitre 4 : Discussions et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse ont été publiés. Ils ont permis de finaliser la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des PBP impliquées dans le transport des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* B6/R10 (Figure 27) et d'identifier MelB comme la PBP d'*A. fabrum* responsable du transport des RFO, du mélibiose et du galactinol. Ces protéines de transport permettent à *Agrobacterium* d'acquérir un avantage trophique dans la tumeur et/ou dans la rhizosphère lors de la germination.

Pour les deux projets, j'ai combiné des approches *in vitro* (biochimiques, structurales et bioinformatiques) à savoir la mesure des affinités, la résolution des structures de chaque PBP en présence de leur(s) ligand(s) et la phylogénie, et *in vivo* avec les tests de croissance bactérienne.

Les résultats décrits dans les deux chapitres précédents sont synthétisés dans ce chapitre, et des perspectives de recherche à court et plus long terme sont proposées.

1. La perception des mannityl-opines

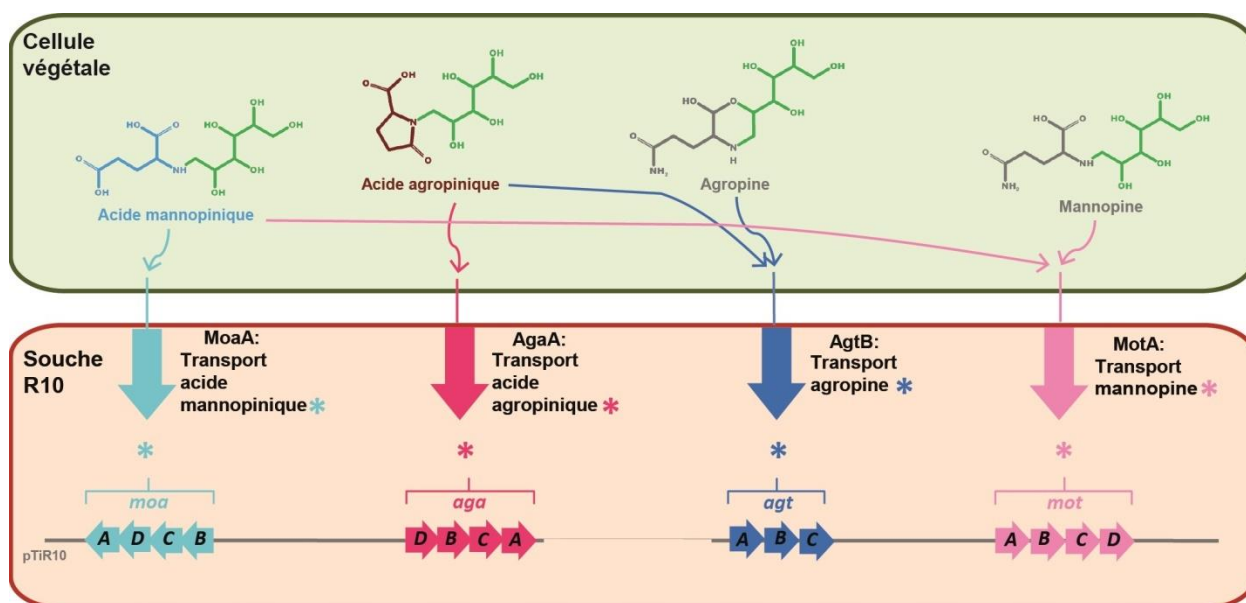


Figure 27 : Synthèse des systèmes de transport des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* R10

1.1. Le transport de l'agropine et de l'acide agropinique

Des travaux de génétique réalisés précédemment (Kim and Farrand 1996; Hong et al. 1993) ont montré que l'agropine et l'acide agropinique pouvaient être importés chez *A. tumefaciens* via les systèmes de transport impliquant les PBP AgtB et AgaA respectivement. Dans l'article 1,

nous avons caractérisé ces deux PBP, dont les gènes sont présents sur deux régions distinctes du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* B6 et R10.

Par microcalorimétrie et fluorescence, j'ai montré qu'AgtB peut fixer l'agropine avec une affinité de l'ordre du micromolaire mais aussi l'acide agropinique avec une affinité de l'ordre de la dizaine de nanomolaire. La PBP AgaA quant à elle fixe l'acide agropinique avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Aucune autre interaction entre AgaA et les autres mannityl-opines n'a été observée. En comparant la croissance de la souche *A. tumefaciens* R10 et de la souche mutante dépourvue d'AgtB, j'ai montré qu'AgtB est le seul transporteur d'agropine chez *A. tumefaciens*, cependant il n'est pas sélectif de cette opine puisqu'il est aussi capable de transporter l'acide agropinique issue de la lactamisation spontanée de l'agropine (Figures 27 et 28).

La comparaison des structures AgaA-acide agropinique (classe C) et AgtB-acide agropinique (classe D) montre qu'*A. tumefaciens* possède deux PBP de classes différentes (donc présentant deux repliements différents) impliquées dans le transport d'acide agropinique. Chacune de ces deux PBP possède une signature moléculaire de liaison caractéristique.

L'absence de données structurales pour le complexe AgtB-agropine, s'explique par l'instabilité de l'agropine, qui se lactamise spontanément et rapidement en acide agropinique, et par une meilleure affinité d'AgtB pour l'acide agropinique. Par conséquent, les 10 à 15 jours nécessaires à l'apparition des cristaux n'ont permis d'obtenir que différentes formes cristallines contenant le complexe AgtB-acide agropinique. L'obtention d'une condition de cristallisation à croissance rapide serait nécessaire pour compléter la caractérisation structurale d'AgtB avec l'agropine. La modélisation de l'agropine dans le site de fixation d'AgtB à partir de la structure AgtB-acide agropinique a été possible puisque les deux mannityl-opines partagent le motif sucre. Cette modélisation montre qu'AgtB peut bien fixer l'agropine.

1.2. Le transport de l'acide mannopinique

Dans l'article 2, les études d'affinité et de caractérisation structurale des PBP MoaA et MotA montrent que MoaA fixe l'acide mannopinique comme unique mannityl-opine avec une très bonne affinité de l'ordre du nanomolaire et que MotA décrite comme fixant la mannopine (*Marty et al. 2016*), est aussi capable de fixer l'acide mannopinique avec une affinité de l'ordre du micromolaire (Figures 27 et 28). Ce travail révèle l'existence chez *A. tumefaciens* de deux modes de fixation pour l'acide mannopinique par des PBP avec des signatures moléculaires de liaison différentes. MoaA est responsable d'un transport sélectif de haute affinité et MotA est responsable d'un transport non sélectif avec des affinités allant du nanomolaire au micromolaire.

En utilisant des simples mutants et un double mutant pour des tests de croissance, nous avons validé les résultats obtenus *in vitro*, confirmant ainsi qu'*A. tumefaciens* B6 et R10

possèdent un deuxième double système d'import pour une mannityl-opine, ici l'acide mannopinique. Tout comme AgaA et AgtB, les gènes de MoaA et MotA sont situés sur deux parties différentes distinctes du pTi, questionnant ainsi l'intérêt de la bactérie à avoir acquis et maintenu ces deux systèmes de transport de mannityl-opines.

1.3. Le double système d'import : avantage écologique dans les tumeurs

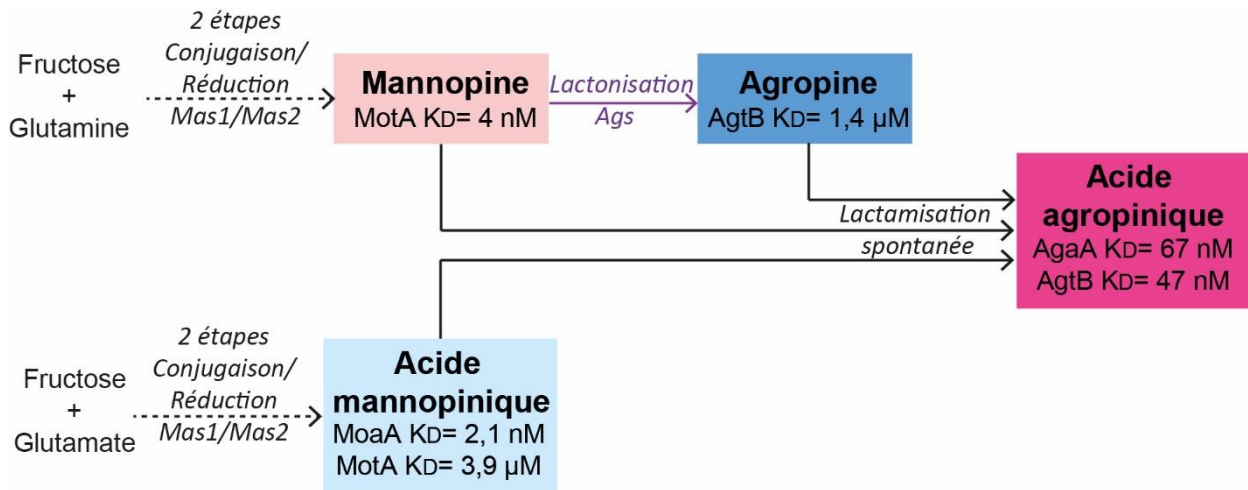


Figure 28 : Schématisation de la synthèse des mannityl-opines et des constantes d'affinités associées chez *A. tumefaciens* R10

La mannopine et l'acide mannopinique proviennent de la conjugaison puis de la réduction du fructose et de la glutamine ou du glutamate par les enzymes Mas1 puis Mas2. La mannopine subit une lactonisation par l'enzyme Ags pour former l'agropine. L'acide agropinique provient de la lactamisation spontanée de la mannopine et de l'agropine qui est rapide mais aussi de l'acide mannopinique moins rapide.

L'hypothèse la plus probable de ces deux doubles systèmes d'import pour l'acide agropinique et l'acide mannopinique semble être l'acquisition d'un avantage trophique immédiat dès l'infection de la plante par la bactérie. En effet, avant même l'apparition d'une excroissance caractéristique de la tumeur, les mannityl-opines sont détectées au niveau du point d'incoluation des bactéries sur la plante, les plus présentes étant l'agropine, l'acide mannopinique et la mannopine, alors que l'acide agropinique n'y est présent qu'à l'état de trace (Scott *et al.* 1979). L'acide mannopinique et la mannopine sont des opines produites en deux étapes, contrairement à l'agropine produite avec une étape supplémentaire à partir de la mannopine. L'acide agropinique, quant à lui résulte de la lactamisation spontanée des trois autres mannityl-opines (Figure 28). L'acide agropinique se retrouve en quantité équivalente aux autres opines dans les tumeurs plus matures (Scott *et al.* 1979)(Dessaux, résultats non publiés). Cette hypothèse est confortée par les résultats des analyses phylogénétiques de conservation des signatures moléculaires de liaison des PBP impliquées dans le transport des mannityl-opines. En effet, la PBP MoaA qui transporte efficacement l'acide mannopinique est présente seulement chez

quelques souches pathogènes d'*Agrobacterium* de type octopine/mannityl-opine ou agrocinopine/mannityl-opine. Il en est presque de même pour les PBP MotA et AgtB qui transportent la mannopine et l'agropine respectivement, contrairement à la PBP AgaA qui est retrouvée chez un certain nombre de *Rhizobiaceae*. Cette capacité d'*A. tumefaciens* B6/R10 à importer avec une haute affinité et à dégrader l'acide mannopinique et la mannopine dès le stade précoce de formation de la tumeur permettrait à la bactérie de s'installer plus efficacement par rapport aux souches compétitrices. L'utilisation d'agropine qui impose de transformer de la mannopine donc de réduire la quantité de mannopine disponible pour une utilisation immédiate dans la bactérie permettrait de moduler la nature de la niche opine au cours du temps (mannopine et acide mannopinique ou mannopine et acide agropinique, ou agropine, agropine et acide mannopinique). Elle permettrait également de limiter la compétition entre *Agrobacterium* et les bactéries associées aux plants, dont certaines sont naturellement capables d'assimiler (transport et dégradation) aussi la mannopine, alors que la dégradation de l'agropine est quasi limitée aux seules agrobactéries. Une opine transportée n'est pas obligatoirement dégradée dans les bactéries compétitrices. Chez les tumeurs vieillissantes, le double système d'import de l'acide mannopinique et surtout de l'acide agropinique serait un moyen d'accéder aux sources nutritives plus facilement que les souches concurrentes capables d'assimiler de l'acide agropinique et permettrait peut-être à *A. tumefaciens* B6/R10 de maintenir sa compétitivité dans ces tumeurs.

1.4. La régulation des mannityl-opines

Il existe deux systèmes de transport pour l'acide agropinique et l'acide mannopinique : un transport spécifique impliquant AgaA et MoaA, et un transport non spécifique avec AgtB et MotA. Les gènes codant pour le transport et la dégradation des quatre mannityl-opines sont situés sur deux parties distinctes du pTi (Figure 29). Leur système de régulation n'a pas encore été clairement établi, même si les régulations croisées semblent exister (*Dessaux et al. 1988*).

Seule la régulation de la transcription des opérons *agaABCD* et *moaABCD* a été décrite (*Lyi, Jafri, and Winans 1999*). Elle est assurée par le régulateur transcriptionnel MoaR qui réprime l'expression d'*agaABCD* et qui est inhibé par l'acide agropinique. Lyi et collaborateurs ont aussi proposé que MoaR soit le répresseur de l'opéron *moa* qui contient les gènes *moaABCD* codant pour le transport de l'acide mannopinique et *agaEFG* qui codent pour les enzymes dégradant les opines (AgaE, AgaF, AgaG). MoaR appartient à la famille des régulateurs de type DeoR. Cette famille est composée de régulateurs impliqués dans les voies métaboliques des sucres et MoaR possède 38% d'identité de séquence avec le répresseur AccR de la souche *A. fabrum* C58 qui a été identifié comme le répresseur de plusieurs gènes du pTi de C58, dont les gènes *acc*, permettant l'assimilation des agrocinopines, *nocR*, *arc* et *traR* (régulateur du *quorum-sensing* et du transfert conjugatif du pTi) (*Lang et al. 2013*). La caractérisation structurale de MoaR serait

intéressante pour apporter de nouvelles informations sur la famille des DeoR qui est mal définie jusqu'à présent.

Les répresseurs MocR et MocS, présents parmi les gènes impliqués dans le transport et la dégradation de l'agropine et de la mannopine et identifiés comme répresseurs de *mocC* et *mocDE* (Jung, Baek, and Lee 1999), font partie de la famille des régulateurs de type Lacl. La caractérisation structurale de ces deux protéines renforcerait les informations sur la famille Lacl. L'identification des effecteurs impliqués dans la levée de la répression et la caractérisation des séquences nucléotides interagissant avec ces trois répresseurs transcriptionnels permettraient de comprendre au niveau moléculaire le mode de régulation et la spécificité de ces systèmes de transport des mannityl-opines. Pour cela, en plus d'une caractérisation structurale de MoaR, MocR et MocS, il serait intéressant de réaliser des constructions en couplant un gène rapporteur codant une protéine fluorescente derrière les promoteurs contrôlés par ces répresseurs transcriptionnels régulant l'expression des différents clusters de gènes, afin d'analyser leur niveau d'expression en présence ou en absence des différentes mannityl-opines. De plus, une étude par gel-shift des régions inter génomiques des différents opérons permettrait d'identifier les régions promotrices impliquées dans la régulation du transport des mannityl-opines.

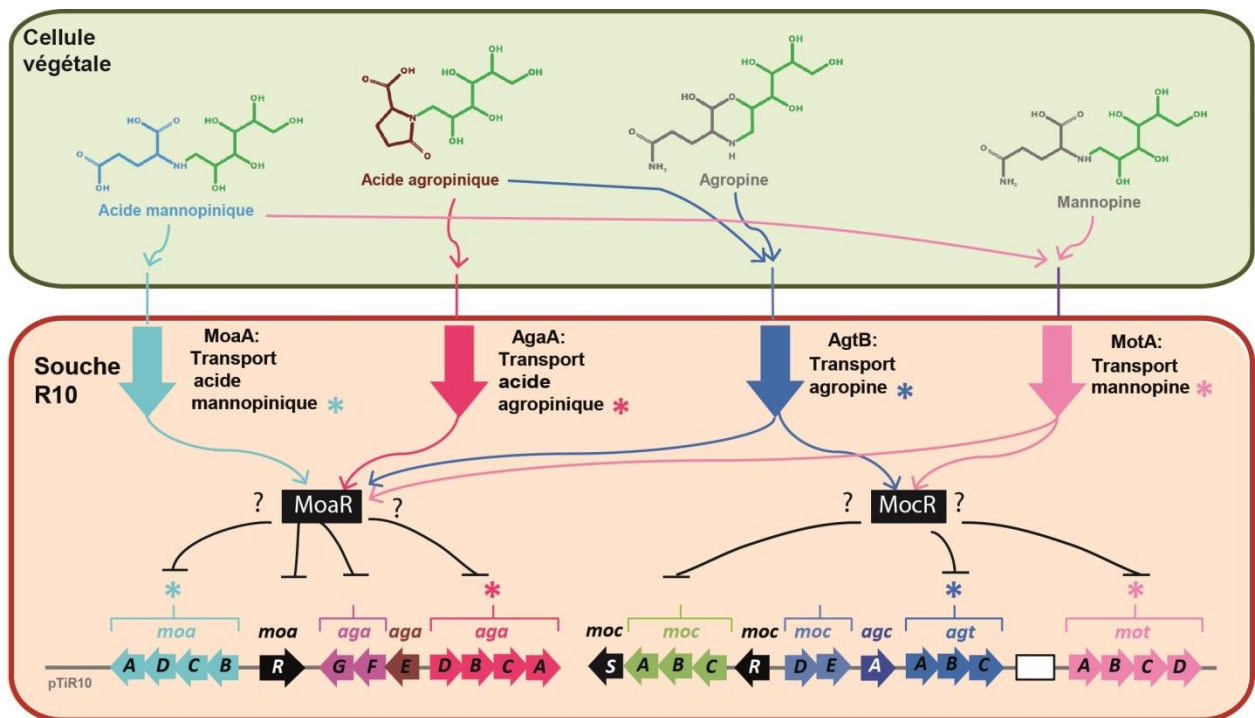


Figure 29 : Schéma des systèmes de transport, de dégradation et de régulation des mannityl-opines chez *A. tumefaciens* R10

2. La perception des RFO

Le travail sur la PBP MelB d'*A. fabrum* de l'opéron *mel* présenté dans l'article 3 provenait de l'hypothèse qu'elle possède une forte homologie de séquence avec la PBP AgpA d'*E. meliloti* dont

l'opéron *agp* est décrit comme impliqué dans le transport et la dégradation du raffinose et du verbascope (*Gage and Long 1998*).

2.1. La sélectivité de la PBP MelB pour les RFO

Dans le cadre de cette étude, nous avons défini par des expériences de croissance d'une souche d'*A. fabrum* C58 WT et d'une souche mutante affectée dans le gène *melB* que la PBP MelB est impliquée dans le transport des RFO (raffinose et stacchiose), du mélibiose et du galactinol.

L'analyse des structures de MelB en complexe avec les RFO (raffinose et stacchiose) et d'autres composés des voies de biosynthèse et du catabolisme des RFO (galactinol, mélibiose et galactose) indique que MelB fixe de façon identique pour tous ces ligands le premier sucre galactose. L'ensemble des données structurales et d'affinité de MelB montrent que l'affinité de MelB est liée à la taille des molécules fixées. En effet, MelB a une préférence pour les sucres à deux unités comme le mélibiose et le galactinol avec des affinités de la dizaine de nanomolaire, fixe le raffinose (sucre à trois unités) avec une affinité de l'ordre de la centaine de nanomolaire et le stacchiose (sucre quatre unités) avec un Kd de l'ordre du micromolaire. Structuralement, la différence d'affinité entre les ligands peut être expliquée par le petit volume de la poche de fixation à l'interface des deux domaines de MelB qui contraint les sucres comme le stacchiose à un réarrangement structural important. Cette affinité plus forte pour le mélibiose et le galactinol est en accord avec les résultats d'expression des gènes *mel* en présence des sucres.

Les expériences *in planta* menées sur la souche WT et un mutant affecté dans le gène *melB* montrent que la capacité d'*A. fabrum* à utiliser le mélibiose, le galactinol et les RFO, comme sources nutritives donne un avantage trophique à la bactérie pour la colonisation de la rhizosphère. Cette observation suggère que dans un environnement riche en RFO comme lors de la germination des graines, où le mélibiose et le raffinose sont relargués en quantité importante, MelB conférerait à *A. fabrum* la capacité de bénéficier du « priority effect ». En d'autres termes, dans ces conditions, MelB aiderait *A. fabrum* à s'installer en premier dans une rhizosphère. De plus, le fait qu'*A. fabrum* catabolise le galactinol, molécule connue pour être une molécule signal impliquée dans la protection de la plante contre les pathogènes (*Cho et al. 2010; Kim et al. 2008*), serait peut-être un moyen mis en place par la bactérie pour affaiblir et résister ou contourner les systèmes de défense de la plante. Ainsi, en utilisant le galactinol, *Agrobacterium* pourrait interférer dans la reconnaissance par la plante de la bactérie.

En plus des RFO, MelB est capable de fixer et de transporter le galactose avec une affinité de l'ordre du micromolaire. Ce résultat permet d'identifier MelB comme un deuxième transporteur du galactose chez *A. fabrum* et de valider l'hypothèse selon laquelle il existe un système complémentaire à ChvE pour le transport du galactose (*Cornish, Greenwood, and Jones 1989; Kemner, Liang, and Nester 1997*).

2.2. Atu4640 et Atu4665 : rôle et spécificité des deux α -galactosidases

L'analyse phylogénétique de conservation de la signature moléculaire de liaison de MelB a montré que la PBP est conservée chez les *Rhizobiaceae*. De plus, de façon surprenante l'opéron

mel contient deux α -galactosidases de la famille des glycosyl-hydrolases 4 (GH4) qui n'ont pas été caractérisées jusqu'à présent (Figure 30).



Figure 30 : Opéron *mel*

Le promoteur P_{mel} indique le sens de transcription des gènes. Les gènes *atu4660* et *4665* sont annotés comme étant deux α -galactosidases, *atu4661* est la PBP *MelB* et les gènes *atu4662* à *atu4664* sont les gènes du transporteur ABC. Extrait de Meyer et al 2018

Des études structurales et fonctionnelles des deux enzymes *in vitro* mais aussi *in cellulo* visant à comparer la souche sauvage, les simples mutants des α -galactosidases et les doubles mutants seraient intéressantes pour mieux comprendre le catabolisme des RFO chez *A. fabrum*. Ces deux enzymes agissent-elles à des pH différents, ont-elles des substrats différents et/ou sont-elles régulées différemment ? La comparaison phénotypique de la souche sauvage et des mutants simples ou double permettrait de connaître le rôle et la spécificité de chacune des α -galactosidases. La comparaison des signatures de liaison des deux enzymes avec les séquences homologues chez les *Rhizobiaceae* permettrait peut-être de vérifier les hypothèses relatives à l'avantage trophique conféré par l'opéron *mel* chez *A. fabrum*. Cette étude pourrait aussi fournir des pistes sur le rôle de l'utilisation des RFO et du galactinol par *A. fabrum*. En effet, une étude récente démontre que l' α -galactosidase *Atu4665* et les gènes d'import de *mel* sont exprimés dans la tumeur (Gonzalez-Mula et al. 2018). Ceci sous-entend que les RFO et/ou le galactinol sont présents et dégradés *in tumora* et donc que l'utilisation de ces composés n'est pas restreinte à la rhizosphère. Cette utilisation pourrait jouer un rôle dans le maintien d'*A. fabrum* dans la tumeur.

2.3. Régulation de l'expression de l'opéron *mel* : *Atu4659* et influence des HCA sur le transport et la dégradation des RFO

L'opéron *mel* est fortement exprimé en présence de mélibiose et de galactinol *in cellulo* et *in planta*. Cet opéron serait sous le contrôle de l'activateur transcriptionnel *Atu4659*. Il appartient à la famille des AraC, mais ne possède pas d'homologues dans la PDB. Ces protéines à deux domaines présentent des similarités au niveau de leur domaine HTH, mais sont variables pour leur partie C-terminale impliquée dans la fixation des ligands. Le régulateur *Atu4659* n'est pas caractérisé structurellement et fonctionnellement, son étude permettrait de mieux comprendre le mode de régulation de l'opéron *mel*.

Des résultats récents de nos collaborateurs indiquent (*résultats non publiés*) que la présence d'acide férulique influencerait le métabolisme des RFO. En effet en présence d'acide férulique, celui-ci module négativement la croissance d'*A. fabrum* sur raffinose et mélibiose.

Les HCA (Acides Hydroxycinnamiques) dont l'acide férulique sont des molécules phénoliques chimio-attractantes exsudées par la plante lorsqu'elle est blessée (Ashby et al. 1988; Guo, Huang, and Yang 2017). Ces composés ont la capacité d'induire l'activation des gènes de virulence *vir* d'*Agrobacterium*, gènes responsables du transfert de l'ADN-T dans le génome de la plante et peuvent être utilisés par certaines souches comme *Agrobacterium* comme ressource trophique (Campillo et al. 2014; Karishma et al. 2015; Lowe, Ailloud, and Allen 2014; Overhage, Priefert, and Steinbuchel 1999).

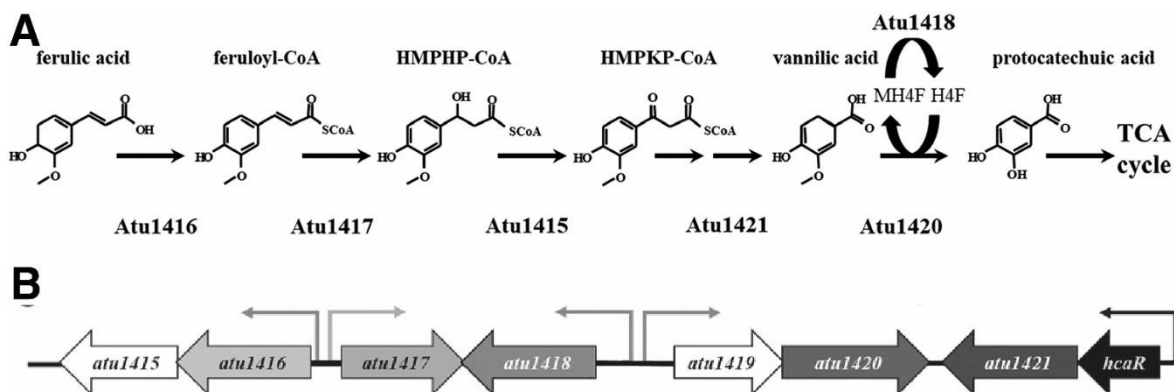


Figure 31 : Voie de dégradation de l'acide férulique et organisation de la région SpG8-1b d'*A. fabrum*

(A) La voie de dégradation de l'acide férulique : un coenzyme A est additionné à l'acide férulique par Atu1416, une feruloyl-CoA synthase. Le feruloyl-CoA est converti par Atu1417 en HMPHP-CoA (4-hydroxy-3-methoxyphenyl- β -hydroxypropionyl-CoA), qui à son tour est transformé en HMPKP-CoA (4-hydroxy-3-methoxyphenyl- β -ketopropionyl-CoA) par Atu 1415 pour être transformé en acide vanillique par Atu1421. Les enzymes Atu1418 et Atu1420 dégradent l'acide vanillique en acide protocatéchique.

(B) Organisation de la région SpG8-1b : les gènes *atu1415-atu1416*, *atu1419-atu1420*, et *hcaR-atu1421* sont dans la même unité de transcription. Les promoteurs et la direction du sens de transcription sont indiqués par les flèches. Adapté de Meyer et al, 2018.

La dégradation de l'acide férulique chez *A. fabrum* implique quatre enzymes qui sont sous le contrôle d'un répresseur transcriptionnel HcaR (Atu1422) de la famille MarR, conduisant à la formation de l'acide vanillique (Campillo et al. 2014). Ce dernier est ensuite transformé en acide protocatéchique par deux autres enzymes dont l'expression des déterminants est sous le contrôle d'un second régulateur de la famille FadR (Atu1419) (Figure 31).

La diminution de la croissance bactérienne sur mélibiose et raffinose en présence d'acide férulique pose la question de la régulation de l'opéron *mel*. L'opéron *mel* est-il soumis à une double régulation : répression avec Atu1419 et/ou HcaR et activation avec Atu4659 ou bien est-il sous l'influence de deux régulateurs différents suivant le mode de vie de la bactérie (rhizosphérique non pathogène et *tumora* pathogène) ?

Pour confirmer que l'acide férulique agit sur le métabolisme des RFO, il serait intéressant d'étudier la modulation de l'expression des gènes sous l'influence de l'acide férulique. Pour cela, il serait possible de comparer le transcriptome ou l'expression des gènes cibles fusionnés avec un gène codant une protéine fluorescente, tout en suivant la croissance d'*A. fabrum* WT et de mutants *atu1416* et/ou *atu1417* en présence des RFO et du mélibiiose avec ou sans acide férulique.

Pour mieux caractériser les systèmes de régulation des HCA et des RFO, une étude structurale et fonctionnelle des régulateurs *Atu4659*, *Atu1419* et *HcaR* permettrait de comprendre leur mécanisme d'action (définition des régions promotrices et des effecteurs) et compléterait l'étude fonctionnelle de *HcaR* (*Meyer et al. 2018*). Cette étude pourrait permettre d'identifier le rôle écologique de ces deux systèmes et surtout l'intérêt d'*A. fabrum* C58 à dégrader les RFO (décrits comme pouvant être osmoprotectants chez la plante) et le galactinol (décrit comme molécule signal de la plante et participant à la résistance au stress chez la plante).

Références bibliographiques

- Ampomah, O. Y., A. Avetisyan, E. Hansen, J. Svenson, T. Huser, J. B. Jensen, and T. V. Bhuvaneshwari. 2013. 'The thuEFGKAB operon of rhizobia and agrobacterium tumefaciens codes for transport of trehalose, maltitol, and isomers of sucrose and their assimilation through the formation of their 3-keto derivatives', *J Bacteriol*, 195: 3797-807.
- Andersen, K. E., C. Bjerregaard, P. Moller, J. C. Sorensen, and H. Sorensen. 2005. 'Compositional variations for alpha-galactosides in different species of leguminosae, brassicaceae, and barley: a chemotaxonomic study based on chemometrics and high-performance capillary electrophoresis', *J Agric Food Chem*, 53: 5809-17.
- Ankenbauer, R. G., and E. W. Nester. 1990. 'Sugar-mediated induction of Agrobacterium tumefaciens virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides', *J Bacteriol*, 172: 6442-6.
- Arruda, P., E. L. Kemper, F. Papes, and A. Leite. 2000. 'Regulation of lysine catabolism in higher plants', *Trends Plant Sci*, 5: 324-30.
- Ashby, A. M., M. D. Watson, G. J. Loake, and C. H. Shaw. 1988. 'Ti plasmid-specified chemotaxis of Agrobacterium tumefaciens C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants', *J Bacteriol*, 170: 4181-7.
- Bachmann, M., P. Matile, and F. Keller. 1994. 'Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of Ajuga reptans L. (Cold Acclimation, Translocation, and Sink to Source Transition: Discovery of Chain Elongation Enzyme)', *Plant Physiol*, 105: 1335-45.
- Backert, S., and T. F. Meyer. 2006. 'Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis', *Curr Opin Microbiol*, 9: 207-17.
- Baetz, U., and E. Martinoia. 2014. 'Root exudates: the hidden part of plant defense', *Trends Plant Sci*, 19: 90-8.
- Bais, H. P., S. W. Park, T. L. Weir, R. M. Callaway, and J. M. Vivanco. 2004. 'How plants communicate using the underground information superhighway', *Trends Plant Sci*, 9: 26-32.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco. 2006. 'The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms', *Annu Rev Plant Biol*, 57: 233-66.
- Ballas, N., and V. Citovsky. 1997. 'Nuclear localization signal binding protein from Arabidopsis mediates nuclear import of Agrobacterium VirD2 protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 10723-8.
- Baude, J., L. Vial, C. Villard, T. Campillo, C. Lavire, X. Nesme, and F. Hommais. 2016. 'Coordinated Regulation of Species-Specific Hydroxycinnamic Acid Degradation and Siderophore Biosynthesis Pathways in Agrobacterium fabrum', *Appl Environ Microbiol*, 82: 3515-24.
- Beijerinck, M.W., and V. Delden. 1902. *Abteilung II*. 9: 3-43.
- Bermejo, G. A., M. P. Strub, C. Ho, and N. Tjandra. 2010. 'Ligand-free open-closed transitions of periplasmic binding proteins: the case of glutamine-binding protein', *Biochemistry*, 49: 1893-902.
- Berntsson, R. P., S. H. Smits, L. Schmitt, D. J. Slotboom, and B. Poolman. 2010. 'A structural classification of substrate-binding proteins', *FEBS Lett*, 584: 2606-17.
- Bhattacharya, A., P. Sood, and V. Citovsky. 2010. 'The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection', *Mol Plant Pathol*, 11: 705-19.
- Biemann, K., C. Lioret, J. Asselineau, E. Lederer, and J. Polonsky. 1960. 'On the structure of lysopine, a new amino acid isolated from crown gall tissue', *Biochim Biophys Acta*, 40: 369-70.
- Bierne, H., and P. Cossart. 2012. 'When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins', *Cell Microbiol*, 14: 622-33.
- Bouzar, H., W. S. Chilton, X. Nesme, Y. Dessaux, V. Vaudequin, A. Petit, J. B. Jones, and N. C. Hodge. 1995. 'A new Agrobacterium strain isolated from aerial tumors on Ficus benjamina L', *Appl Environ Microbiol*, 61: 65-73.

- Bouzar, H., and J. B. Jones. 2001. 'Agrobacterium larrymoorei sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*', *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1023-6.
- Bradi, D.V., and J.M. Vivanco. 2009. 'Regulation and function of root exudates.', *Plant Cell Environ*, 32: 666–81.
- Brencic, A., A. Eberhard, and S. C. Winans. 2004. 'Signal quenching, detoxification and mineralization of vir gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*', *Mol Microbiol*, 51: 1103-15.
- Brencic, A., and S. C. Winans. 2005. 'Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria', *Microbiol Mol Biol Rev*, 69: 155-94.
- Bringhurst, R. M., Z. G. Cardon, and D. J. Gage. 2001. 'Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4540-5.
- Brunaud, V., S. Balzergue, B. Dubreucq, S. Aubourg, F. Samson, S. Chauvin, N. Bechtold, C. Cruaud, R. DeRose, G. Pelletier, L. Lepiniec, M. Caboche, and A. Lechary. 2002. 'T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites', *EMBO Rep*, 3: 1152-7.
- Campillo, T., S. Renoud, I. Kerzaon, L. Vial, J. Baude, V. Gaillard, F. Bellvert, C. Chamignon, G. Comte, X. Nesme, C. Lavire, and F. Hommais. 2014. 'Analysis of hydroxycinnamic acid degradation in *Agrobacterium fabrum* reveals a coenzyme A-dependent, beta-oxidative deacetylation pathway', *Appl Environ Microbiol*, 80: 3341-9.
- Cangelosi, G. A., L. Hung, V. Puvanesarajah, G. Stacey, D. A. Ozga, J. A. Leigh, and E. W. Nester. 1987. 'Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions', *J Bacteriol*, 169: 2086-91.
- Caretto, S., V. Linsalata, G. Colella, G. Mita, and V. Lattanzio. 2015. 'Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress', *Int J Mol Sci*, 16: 26378-94.
- Charles, T. C., and E. W. Nester. 1993. 'A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*', *J Bacteriol*, 175: 6614-25.
- Chase, J. M. 2003. 'Community assembly: when should history matter?', *Oecologia*, 136: 489-98.
- Chen, K., F. Dorlhac de Borne, E. Szegedi, and L. Otten. 2014. 'Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*', *Plant J*, 80: 669-82.
- Chen, L., Y. Chen, D. W. Wood, and E. W. Nester. 2002. 'A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*', *J Bacteriol*, 184: 4838-45.
- Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merio, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1977. 'Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis', *Cell*, 11: 263-71.
- Chilton, M. D., and Q. Que. 2003. 'Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration', *Plant Physiol*, 133: 956-65.
- Chilton, W. S., J. Tempe, M. Matzke, and M. D. Chilton. 1984. 'Succinamopine: a new crown gall opine', *J Bacteriol*, 157: 357-62.
- Chilton, W.S., A-M. Stomp, and V. et al. Beringue. 1995. 'The chrysopine family of amadori-type crown gall opines.', *Phytochemistry*, 40: 619-28.
- Cho, S.M., E.Y. Kang, M.S. Kim, S.J. Yoo, Y.J. Im, Y.C. Kim, K.Y. Yang, K.Y. Kim, K.S. Kim, Y.S. Choi, and B. H. Cho. 2010. 'Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*.', *Botany*, 88: 452–61.
- Christie, P. J., and E. Cascales. 2005. 'Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review)', *Mol Membr Biol*, 22: 51-61.
- Conn, H. J. 1942. 'Validity of the Genus *Alcaligenes*', *J Bacteriol*, 44: 353-60.
- Cornish, A., J. A. Greenwood, and C. W. Jones. 1989. 'Binding-protein-dependent sugar transport by *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens* grown in continuous culture', *J Gen Microbiol*, 135: 3001-13.

- Costechareyre, D., A. Rhouma, C. Lavire, P. Portier, D. Chapulliot, F. Bertolla, A. Boubaker, Y. Dessaux, and X. Nesme. 2010. 'Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by recA allele analysis: *Agrobacterium* recA diversity', *Microb Ecol*, 60: 862-72.
- Coxon, D.T., A.M.C. Davies, and G.R. et al. Fenwick. 1980. 'Agropine, a new amino acid derivative present in crown gall tumor tissue.'
- Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. W. Scannell. 2002. 'Estimating prokaryotic diversity and its limits', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10494-9.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle, and J. Chen. 2008. 'Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems', *Microbiol Mol Biol Rev*, 72: 317-64, table of contents.
- de Boer, M., G. Gouridis, R. Vietrov, S. L. Begg, G. K. Schuurman-Wolters, F. Husada, N. Eleftheriadis, B. Poolman, C. A. McDevitt, and T. Cordes. 2019. 'Conformational and dynamic plasticity in substrate-binding proteins underlies selective transport in ABC importers', *Elife*, 8.
- De Cleene, M., and J. De Ley. 1976. 'The host range of crown gall.', *Botanical Review*, 42: 390-466.
- Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets. 2001. 'The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily', *Genome Res*, 11: 1156-66.
- Dessaux, Y., and D. Faure. 2018. 'Niche Construction and Exploitation by *Agrobacterium*: How to Survive and Face Competition in Soil and Plant Habitats.', *Curr Top Microbiol Immunol.*: 55-86.
- Dessaux, Y., P. Guyon, and A. et al. Petit. 1988. 'Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation.', *J Bacteriol*, 1988: 2939-46.
- Dessaux, Y., P. Guyon, A. Petit, J. Tempe, M. Demarez, C. Legrain, M. E. Tate, and S. K. Farrand. 1988. 'Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation', *J Bacteriol*, 170: 2939-46.
- Dessaux, Y., A. Petit, and S.K. et al. Farrand. 1998. 'Opines and opine-like molecules involved in plant-Rhizobiaceae interactions.', *In: Spink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.). The Rhizobiaceae.: 173-97.*
- Dessaux, Y., J. Tempe, and S. K. Farrand. 1987. 'Genetic analysis of mannityl opine catabolism in octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* strain 15955', *Mol Gen Genet*, 208: 301-8.
- Dey, P.M. 1985. 'D-Galactose-containing oligosaccharides', *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*: 53-129.
- Dickie, I. A., T. Fukami, J. P. Wilkie, R. B. Allen, and P. K. Buchanan. 2012. 'Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi', *Ecol Lett*, 15: 133-41.
- Djamei, A., A. Pitzschke, H. Nakagami, I. Rajh, and H. Hirt. 2007. 'Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling', *Science*, 318: 453-6.
- dos Santos, T.B., I.G. Budzinski, C.J. Marur, C.L. Petkowicz, L.F. Pereira, and L.G. Vieira. 2011. 'Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. And accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses.', *Plant Physiol. Biochem.*, 49: 441-48.
- Drake, J.A. 1991. 'Community assembly mechanics and the structure of an experimental species ensemble.', *The American Naturalist*: 1-26.
- Duarte, R. T., C. C. Staats, M. H. Fungaro, A. Schrank, M. H. Vainsten, L. Furlaneto-Maia, C. V. Nakamura, W. de Souza, and M. C. Furlaneto. 2007. 'Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*', *Lett Appl Microbiol*, 44: 248-54.
- El Sahili, A., S. Z. Li, J. Lang, C. Virus, S. Planamente, M. Ahmar, B. G. Guimaraes, M. Aumont-Nicaise, A. Vigouroux, L. Soulere, J. Reader, Y. Queneau, D. Faure, and S. Morera. 2015. 'A Pyranose-2-Phosphate Motif Is Responsible for Both Antibiotic Import and Quorum-Sensing Regulation in *Agrobacterium tumefaciens*', *PLoS Pathog*, 11: e1005071.
- Elasri, M., S. Delorme, P. Lemanceau, G. Stewart, B. Laue, E. Glickmann, P. M. Oger, and Y. Dessaux. 2001. 'Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp', *Appl Environ Microbiol*, 67: 1198-209.

- Felder, C. B., R. C. Graul, A. Y. Lee, H. P. Merkle, and W. Sadee. 1999. 'The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors', *AAPS PharmSci*, 1: E2.
- Filichkin, S. A., and S. B. Gelvin. 1993. 'Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1,D2 endonuclease', *Mol Microbiol*, 8: 915-26.
- Firmin, J.L., and G.R. Fenwick. 1978. 'chem_agropine-charact_firmin1978.pdf': 842-44.
- Flores-Mireles, A. L., A. Eberhard, and S. C. Winans. 2012. '*Agrobacterium tumefaciens* can obtain sulphur from an opine that is synthesized by octopine synthase using S-methylmethionine as a substrate', *Mol Microbiol*, 84: 845-56.
- Fukami-Kobayashi, K., Y. Tateno, and K. Nishikawa. 1999. 'Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history', *J Mol Biol*, 286: 279-90.
- Fukami, T. 2015. 'Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*: 1-23.
- Fukami, T., M.T. Bezemer, S.R. Mortimer, and W.H. van der Putten. 2005. 'Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly', *Ecology Letters*: 1283–90.
- Fukamizo, T., Y. Kitaoku, and W. Suginta. 2019. 'Periplasmic solute-binding proteins: Structure classification and chitooligosaccharide recognition', *Int J Biol Macromol*, 128: 985-93.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1994. 'Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators', *J Bacteriol*, 176: 269-75.
- Fushiya, S., M. Matsuda, and S. et al. Yamada. 1996. 'New opine type amino acids from a poisonous mushroom, *Clitocybe acromelalga*. ', *Tetrahedron*, 52.
- Gage, D. J., and S. R. Long. 1998. 'alpha-Galactoside uptake in *Rhizobium meliloti*: isolation and characterization of *agpA*, a gene encoding a periplasmic binding protein required for melibiose and raffinose utilization', *J Bacteriol*, 180: 5739-48.
- Gelvin, S. B. 1998. '*Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm', *J Bacteriol*, 180: 4300-2.
- . 2003. '*Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool', *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 16-37, table of contents.
- Goldman, A., D.W. Thomas, and G. Morel. 1969. 'Sur La Structure de La Nopaline, Metabolite Anormale de Certaines Tumeurs de Crown Gall.'
- Gonzalez-Mula, A., J. Lang, C. Grandclement, D. Naquin, M. Ahmar, L. Soulere, Y. Queneau, Y. Dessaux, and D. Faure. 2018. 'Lifestyle of the biotroph *Agrobacterium tumefaciens* in the ecological niche constructed on its host plant', *New Phytol*, 219: 350-62.
- Goodner, B., G. Hinkle, S. Gattung, N. Miller, M. Blanchard, B. Quorollo, B. S. Goldman, Y. Cao, M. Askenazi, C. Halling, L. Mullin, K. Houmiel, J. Gordon, M. Vaudin, O. Iartchouk, A. Epp, F. Liu, C. Wollam, M. Allinger, D. Doughty, C. Scott, C. Lappas, B. Markelz, C. Flanagan, C. Crowell, J. Gurson, C. Lomo, C. Sear, G. Strub, C. Cielo, and S. Slater. 2001. 'Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58', *Science*, 294: 2323-8.
- Guo, M., Z. Huang, and J. Yang. 2017. 'Is there any crosstalk between the chemotaxis and virulence induction signaling in *Agrobacterium tumefaciens*?', *Biotechnol. Adv.*
- Hack, E., and J. D. Kemp. 1977. 'Comparison of octopine, histopine, lysopine, and octopinic acid synthesizing activities in sunflower crown gall tissues', *Biochem Biophys Res Commun*, 78: 785-91.
- Hall, L. M., J. L. Schrimsher, and K. B. Taylor. 1983. 'A new opine derived from nopaline', *J Biol Chem*, 258: 7276-9.
- Harcet, M., D. Perina, and B. Plese. 2013. 'Opine dehydrogenases in marine invertebrates', *Biochem Genet*, 51: 666-76.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. van Tuinen, and G. Berg. 2008. 'Plant-driven selection of microbes', *Plant and Soil*, 321: 235-57.

- Haudecoeur, E., S. Planamente, A. Cirou, M. Tannieres, B. J. Shelp, S. Morera, and D. Faure. 2009. 'Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 14587-92.
- Hawes, M. C., and S. G. Pueppke. 1987. 'Correlation between binding of *Agrobacterium tumefaciens* by root cap cells and susceptibility of plants to crown gall', *Plant Cell Rep*, 6: 287-90.
- Hawes, M. C., and L. Y. Smith. 1989. 'Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants', *J Bacteriol*, 171: 5668-71.
- Hentzer, M., and M. Givskov. 2003. 'Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections', *J Clin Invest*, 112: 1300-7.
- Hildebrand, E.M. 1940. 'Cane gall of brambles caused by *Phytoplasma* sp.', *J. Agric. Res*, 61: 685-96.
- Hiltner. 1904. 'Über neue Erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache', *Arb. Deut. Landwirsch Ges.*: 59–78.
- Hinsinger, P., A.G. Bengough, D. Vetterlein, and I. Young. 2009. 'Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance', *Plant and Soil*: 117-52.
- Holland, I. B., and M. A. Blight. 1999. 'ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans', *J Mol Biol*, 293: 381-99.
- Hong, S. B., Y. Dessaux, W. S. Chilton, and S. K. Farrand. 1993. 'Organization and regulation of the mannopine cyclase-associated opine catabolism genes in *Agrobacterium tumefaciens* 15955', *J Bacteriol*, 175: 401-10.
- Hong, S. B., I. Hwang, Y. Dessaux, P. Guyon, K. S. Kim, and S. K. Farrand. 1997. 'A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by *Agrobacterium* strains', *J Bacteriol*, 179: 4831-40.
- Horbowicz, M., and R.L. Obendorf. 1994. 'Seed desiccation tolerance and storability: dependance on flatulence producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey', *Seed Sci. Res.*, 4: 385–405.
- Horner-Devine, M.C., M.A. Leibold, V.H. Smith, and B.J.M. Bohannan. 2003. 'Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity', *Ecol Lett*, 6: 613-22.
- Howard, E. A., J. R. Zupan, V. Citovsky, and P. C. Zambryski. 1992. 'The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells', *Cell*, 68: 109-18.
- Hütsch, B.W., J. Augustin, and W. Merbach. 2002. 'Plant rhizodeposition - An important source for carbon turnover in soils', *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165: 397 - 407.
- Iacobellis, N. S., and J. E. Devay. 1986. 'Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water', *Appl Environ Microbiol*, 52: 388-9.
- Jing, Y., S. Lang, D. Wang, H. Xue, and X. F. Wang. 2018. 'Functional characterization of galactinol synthase and raffinose synthase in desiccation tolerance acquisition in developing *Arabidopsis* seeds', *J Plant Physiol*, 230: 109-21.
- Jung, W-H., C-H. Baek, and J.K. et al. Lee. 1999. 'Analysis of trans-acting elements for regulation of moc operons of pTi15955 in *Agrobacterium tumefaciens*.', *J Microbiol Biotechnol*: 637-45.
- Kandler, O., and H. Hopf. 1984. 'Biosynthesis of oligosaccharides in vascular plants', *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*: 115–32.
- Kanemoto, R. H., A. T. Powell, D. E. Akiyoshi, D. A. Regier, R. A. Kerstetter, E. W. Nester, M. C. Hawes, and M. P. Gordon. 1989. 'Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*', *J Bacteriol*, 171: 2506-12.
- Karishma, M., V. D. Trivedi, A. Choudhary, A. Mhatre, P. Kambli, J. Desai, and P. S. Phale. 2015. 'Analysis of preference for carbon source utilization among three strains of aromatic compounds degrading *Pseudomonas*', *FEMS Microbiol Lett*, 362.

- Karpowich, N. K., H. H. Huang, P. C. Smith, and J. F. Hunt. 2003. 'Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding', *J Biol Chem*, 278: 8429-34.
- Keller, F., and D.M. Pharr. 1996. 'Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides', *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source–Sink Relationships*: 157–83.
- Keller, R., C.A. Brearley, R.N. Trethewey, and B. Muller-Rober. 1998. 'Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants'.
- Kemner, J. M., X. Liang, and E. W. Nester. 1997. 'The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon', *J Bacteriol*, 179: 2452-8.
- Kemp, J. D. 1977. 'A new amino acid derivative present in crown gall tumor tissue', *Biochem Biophys Res Commun*, 74: 862-8.
- Kesters, K., and J. de Ley. 1984. *Genus III. Agrobacterium. Conn. 1942. Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 1: 244-54.
- Kim, K. S., W. S. Chilton, and S. K. Farrand. 1996. 'A Ti plasmid-encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region-encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors', *J Bacteriol*, 178: 3285-92.
- Kim, K. S., and S. K. Farrand. 1996. 'Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor', *J Bacteriol*, 178: 3275-84.
- Kim, M. S., S. M. Cho, E. Y. Kang, Y. J. Im, H. Hwangbo, Y. C. Kim, C. M. Ryu, K. Y. Yang, G. C. Chung, and B. H. Cho. 2008. 'Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization', *Mol Plant Microbe Interact*, 21: 1643-53.
- Krimi, Z., A. Petit, C. Mougél, Y. Dessaux, and X. Nesme. 2002. 'Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils', *Appl Environ Microbiol*, 68: 3358-65.
- Lang, J., S. Planamente, S. Mondy, Y. Dessaux, S. Morera, and D. Faure. 2013. 'Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumour', *Mol Microbiol*, 90: 1178-89.
- Lang, J., A. Vigouroux, S. Planamente, A. El Sahili, P. Blin, M. Aumont-Nicaise, Y. Dessaux, S. Morera, and D. Faure. 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.
- Lanoue, A., V. Burlat, G. J. Henkes, I. Koch, U. Schurr, and U. S. Rose. 2010. 'De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley', *New Phytol*, 185: 577-88.
- Lassalle, F., T. Campillo, L. Vial, J. Baude, D. Costechareyre, D. Chapulliot, M. Shams, D. Abrouk, C. Lavire, C. Oger-Desfeux, F. Hommais, L. Gueguen, V. Daubin, D. Muller, and X. Nesme. 2011. 'Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*', *Genome Biol Evol*, 3: 762-81.
- Lee, Y. W., S. Jin, W. S. Sim, and E. W. Nester. 1995. 'Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 12245-9.
- Lehle, L., and W. Tanner. 1973. 'The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose. Purification and characterization of galactinol:sucrose 6-galactosyltransferase from *Vicia faba* seeds', *Eur J Biochem*, 38: 103-10.
- Li, Y., M. G. Rosso, B. Ulker, and B. Weisshaar. 2006. 'Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in *Arabidopsis thaliana* reveals special features of genes without insertions', *Genomics*, 87: 645-52.
- Linton, K. J., and C. F. Higgins. 1998. 'The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins', *Mol Microbiol*, 28: 5-13.

- Lowe, T. M., F. Ailloud, and C. Allen. 2014. 'Hydroxycinnamic acid degradation, a broadly conserved trait, protects *Ralstonia solanacearum* from chemical plant defenses and contributes to root colonization and virulence.', *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 28: 286-97.
- Lyj, S. M., S. Jafri, and S. C. Winans. 1999. 'Mannopinic acid and agropinic acid catabolism region of the octopine-type Ti plasmid pTi15955', *Mol Microbiol*, 31: 339-47.
- Lynch, J.M., and J.M. Whipps. 1990. 'Substrate flow in the rhizosphere', *Plant and Soil*, 129: 1-10.
- Ma, L. S., A. Hachani, J. S. Lin, A. Filloux, and E. M. Lai. 2014. 'Agrobacterium tumefaciens deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta', *Cell Host Microbe*, 16: 94-104.
- Marasco, R., C. T. Lago, and M. De Felice. 1995. 'Utilization of cellobiose and other beta-D-glucosides in *Agrobacterium tumefaciens*', *Res Microbiol*, 146: 485-92.
- Marty, L., A. Vigouroux, M. Aumont-Nicaise, Y. Dessaux, D. Faure, and S. Morera. 2016. 'Structural Basis for High Specificity of Amadori Compound and Mannopine Opine Binding in Bacterial Pathogens', *J Biol Chem*, 291: 22638-49.
- Marty, L., A. Vigouroux, M. Aumont-Nicaise, F. Pelissier, T. Meyer, C. Lavire, Y. Dessaux, and S. Morera. 2019. 'Structural basis for two efficient modes of agropinic acid opine import into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*', *Biochem J*, 476: 165-78.
- Matthysse, A. G., P. Jaeckel, and C. Jeter. 2008. 'attG and attC mutations of *Agrobacterium tumefaciens* are dominant negative mutations that block attachment and virulence', *Can J Microbiol*, 54: 241-7.
- Ménagé, A. , and G. Morel. 1965. 'Sur La Presence D'un Acide Amine Nouveau Dans Les Tissus de Crown-Gall.'.
- Menage, A., and G. Morel. 1964. '[on the Presence of Octine in Crown-Gall]', *C R Hebd Seances Acad Sci*, 259: 4795-6.
- Meyer, T., A. Vigouroux, M. Aumont-Nicaise, G. Comte, L. Vial, C. Lavire, and S. Morera. 2018. 'The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*', *J Biol Chem*, 293: 7930-41.
- Momma, K., Y. Mishima, W. Hashimoto, B. Mikami, and K. Murata. 2005. 'Direct evidence for *Sphingomonas* sp. A1 periplasmic proteins as macromolecule-binding proteins associated with the ABC transporter: molecular insights into alginate transport in the periplasm', *Biochemistry*, 44: 5053-64.
- Montoya, A. L., M. D. Chilton, M. P. Gordon, D. Sciaky, and E. W. Nester. 1977. 'Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes', *J Bacteriol*, 129: 101-7.
- Morizawa, K. 1927. 'The extractive substances in *Octopus octopodia*', *Acta Sch Med Univ Imp Kyoto*, 9: 285-98.
- Morton, E. R., P. M. Merritt, J. D. Bever, and C. Fuqua. 2013. 'Large deletions in the pAtC58 megaplasmid of *Agrobacterium tumefaciens* can confer reduced carriage cost and increased expression of virulence genes', *Genome Biol Evol*, 5: 1353-64.
- Mougel, C., J. Thioulouse, G. Perriere, and X. Nesme. 2002. 'A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 573-86.
- Mourez, M., M. Hofnung, and E. Dassa. 1997. 'Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits', *EMBO J*, 16: 3066-77.
- Muller, A., E. Severi, C. Mulligan, A. G. Watts, D. J. Kelly, K. S. Wilson, A. J. Wilkinson, and G. H. Thomas. 2006. 'Conservation of structure and mechanism in primary and secondary transporters exemplified by SiaP, a sialic acid binding virulence factor from *Haemophilus influenzae*', *J Biol Chem*, 281: 22212-22.
- Nair, G. R., Z. Liu, and A. N. Binns. 2003. 'Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58', *Plant Physiol*, 133: 989-99.
- Neal, A. L., S. Ahmad, R. Gordon-Weeks, and J. Ton. 2012. 'Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere', *PLoS One*, 7: e35498.

- Nealson, K. H., and J. W. Hastings. 1979. 'Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance', *Microbiol Rev*, 43: 496-518.
- Nelson, E. B. 2004. 'Microbial dynamics and interactions in the spermosphere', *Annu Rev Phytopathol*, 42: 271-309.
- Newcomer, M. E., B. A. Lewis, and F. A. Quioco. 1981. 'The radius of gyration of L-arabinose-binding protein decreases upon binding of ligand', *J Biol Chem*, 256: 13218-22.
- Nguyen, C. 2003. 'Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls.', *Agronomie*, 23: 375-96.
- Nishizawa, A., Y. Yabuta, and S. Shigeoka. 2008. 'Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage', *Plant Physiol*, 147: 1251-63.
- Oldham, M. L., A. L. Davidson, and J. Chen. 2008. 'Structural insights into ABC transporter mechanism', *Curr Opin Struct Biol*, 18: 726-33.
- Ong, S. A., T. Peterson, and J. B. Neilands. 1979. 'Agrobactin, a siderophore from *Agrobacterium tumefaciens*', *J Biol Chem*, 254: 1860-5.
- Ophel, K., and A. Kerr. 1990. '*Agrobacterium vitis* sp. no. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines.', *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 236-41.
- Overhage, J., H. Priefert, and A. Steinbuchel. 1999. 'Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199', *Appl Environ Microbiol*, 65: 4837-47.
- Penyalver, R., P. Oger, M. M. Lopez, and S. K. Farrand. 2001. 'Iron-binding compounds from *Agrobacterium* spp.: biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore', *Appl Environ Microbiol*, 67: 654-64.
- Peterbauer, T., L. B. Lahuta, A. Blochl, J. Mucha, D. A. Jones, C. L. Hedley, R. J. Gorecki, and A. Richter. 2001. 'Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition', *Plant Physiol*, 127: 1764-72.
- Peterbauer, T., and A. Richter. 1998. 'Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase', *Plant Physiol*, 117: 165-72.
- Petit, A., C. David, and G. et al. Dahl. 1983. 'Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. ', *Mol Gen Genet*, 190: 204-14.
- Planamente, S., S. Mondy, F. Hommais, A. Vigouroux, S. Morera, and D. Faure. 2012. 'Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens', *Mol Microbiol*, 86: 1085-99.
- Planamente, S., A. Vigouroux, S. Mondy, M. Nicaise, D. Faure, and S. Morera. 2010. 'A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by structure-function analysis of the periplasmic binding protein Atu2422 in *Agrobacterium tumefaciens*', *J Biol Chem*, 285: 30294-303.
- Platt, T. G., E. R. Morton, I. S. Barton, J. D. Bever, and C. Fuqua. 2014. 'Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids', *Front Plant Sci*, 5: 635.
- Popoff, M. Y., K. Kersters, M. Kiredjian, I. Miras, and C. Coynault. 1984. '[Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin]', *Ann Microbiol (Paris)*, 135A: 427-42.
- Quentin, Y., G. Fichant, and F. Denizot. 1999. 'Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems', *J Mol Biol*, 287: 467-84.
- Quioco, F. A., and P. S. Ledvina. 1996. 'Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes', *Mol Microbiol*, 20: 17-25.
- Quioco, F. A., G. N. Phillips, Jr., R. G. Parsons, and R. W. Hogg. 1974. 'Letter: Crystallographic data of an L-arabinose-binding protein from *Escherichia coli*', *J Mol Biol*, 86: 491-3.
- Richter, A., G. Hoch, M. Puschenreiter, U. Mayer, and T. Peterbauer. 2000. 'The role of stachyose synthase in the oligosaccharide metabolism of legume seeds', *Seed Biology: Advances and Applications*: 75-84.
- Riker, A.J., W. Banfield, W. Wright, G. Keitt, and K. Sagen. 1930. *J. Agric. Res*, 41: 887.
- Riley, P. S., and R. E. Weaver. 1977. 'Comparison of thirty-seven strains of Vd-3 bacteria with *Agrobacterium radiobacter*: morphological and physiological observations', *J Clin Microbiol*, 5: 172-7.

- Rondon, M. R., K. S. Ballering, and M. G. Thomas. 2004. 'Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58', *Microbiology*, 150: 3857-66.
- Ryu, C. M. 2015. 'Against friend and foe: type 6 effectors in plant-associated bacteria', *J Microbiol*, 53: 201-8.
- Salman, H., A. Abu-Arish, S. Oliel, A. Loyter, J. Klafner, R. Granek, and M. Elbaum. 2005. 'Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules', *Biophys J*, 89: 2134-45.
- Savka, M. A., and S. K. Farrand. 1997. 'Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource', *Nat Biotechnol*, 15: 363-8.
- Scheepers, G. H., A. Nijeholt J. A. Lycklama, and B. Poolman. 2016. 'An updated structural classification of substrate-binding proteins', *FEBS Lett*, 590: 4393-401.
- Schrammeijer, B., E. Risseuw, W. Pansegrau, T. J. Regensburg-Tuink, W. L. Crosby, and P. J. Hooykaas. 2001. 'Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein', *Curr Biol*, 11: 258-62.
- Scott, I.M., J.L. Firmin, D.N. Butcher, L.M. Searle, A.K. Sogek, and J. et al. Eagles. 1979. 'Analysis of a range of crown gall and normal plant tissues for Ti plasmid-determined compounds.', *Mol Gen Genet*, 176: 57-65.
- Sengupta, S., S. Mukherjee, P. Basak, and A. L. Majumder. 2015. 'Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants', *Front Plant Sci*, 6: 656.
- Shaw, C. H. 1991. 'Swimming against the tide: chemotaxis in *Agrobacterium*', *Bioessays*, 13: 25-9.
- Shilton, B. H. 2008. 'The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 1772-80.
- Shimoda, N., A. Toyoda-Yamamoto, S. Aoki, and Y. Machida. 1993. 'Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*', *J Biol Chem*, 268: 26552-8.
- Smith, E. F., and C. O. Townsend. 1907. 'A Plant-Tumor of Bacterial Origin', *Science*, 25: 671-3.
- Stachel, S. E., and P. C. Zambryski. 1986. 'virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*', *Cell*, 46: 325-33.
- Stoyanova, S., J. Geuns, E. Hideg, and W. Van den Ende. 2011. 'The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress', *Int J Food Sci Nutr*, 62: 207-14.
- Sutcliffe, I. C., and R. R. Russell. 1995. 'Lipoproteins of gram-positive bacteria', *J Bacteriol*, 177: 1123-8.
- Szabados, L., I. Kovacs, A. Oberschall, E. Abraham, I. Kerekes, L. Zsigmond, R. Nagy, M. Alvarado, I. Krasovskaja, M. Gal, A. Berente, G. P. Redei, A. B. Haim, and C. Koncz. 2002. 'Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome', *Plant J*, 32: 233-42.
- Tam, R., and M. H. Saier, Jr. 1993. 'Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria', *Microbiol Rev*, 57: 320-46.
- Tanner, W., and O. Kandler. 1968. 'Myo-inositol, a cofactor in the biosynthesis of stachyose', *Eur J Biochem*, 4: 233-9.
- Tate, M.E., J.G. Ellis, and A. et al. Kerr. 1982. 'Agropine: a revised structure.', *Carbohydr. Res.*, 104: 105-20.
- Tennigkeit, J., and H. Matzura. 1991. 'Nucleotide sequence analysis of a chloramphenicol-resistance determinant from *Agrobacterium tumefaciens* and identification of its gene product', *Gene*, 98: 113-6.
- Tinland, B., and B. Hohn. 1995. 'Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome', *Genet Eng (N Y)*, 17: 209-29.
- Tzfira, T., and V. Citovsky. 2006. 'Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology', *Curr Opin Biotechnol*, 17: 147-54.
- Tzfira, T., J. Li, B. Lacroix, and V. Citovsky. 2004. 'Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models', *Trends Genet*, 20: 375-83.
- van Dam, N. M., and H. J. Bouwmeester. 2016. 'Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication', *Trends Plant Sci*, 21: 256-65.

- Van den Ende, W. 2013. 'Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides', *Front Plant Sci*, 4: 247.
- van der Heijden, M. G., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. 'The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems', *Ecol Lett*, 11: 296-310.
- Vergunst, A. C., M. C. van Lier, A. den Dulk-Ras, T. A. Stuve, A. Ouwehand, and P. J. Hooykaas. 2005. 'Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 832-7.
- Veselov, D., M. Langhans, W. Hartung, R. Aloni, I. Feussner, C. Gotz, S. Veselova, S. Schlomski, C. Dickler, K. Bachmann, and C. I. Ullrich. 2003. 'Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid', *Planta*, 216: 512-22.
- Vigouroux, A., M. Aumont-Nicaise, A. Bousac, L. Marty, L. Lo Bello, P. Legrand, K. Brillat, I. J. Schalk, and S. Morera. 2019. 'A unique ferrous iron binding mode is associated with large conformational changes for the transport protein FpVC of *Pseudomonas aeruginosa*', *FEBS J*.
- Vigouroux A, Doré J, Marty L, Aumont-Nicaise M, Legrand P, Dessaux Y, Vial L, Moréra S. 2020. 'Import pathways of the mannitol-opines into the bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens*: structural, affinity and in vivo approaches.' *Biochem J*. 477(3):615-628.
- Vives-Peris, V., C. de Ollas, A. Gomez-Cadenas, and R. M. Perez-Clemente. 2019. 'Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond', *Plant Cell Rep*.
- von Lintig, J., H. Zanker, and J. Schroder. 1991. 'Positive regulators of opine-inducible promoters in the nopaline and octopine catabolism regions of Ti plasmids', *Mol Plant Microbe Interact*, 4: 370-8.
- Wagner, V. T., and A. G. Matthysse. 1992. 'Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells', *J Bacteriol*, 174: 5999-6003.
- Wang, L., J. D. Helmann, and S. C. Winans. 1992. 'The A. tumefaciens transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite', *Cell*, 69: 659-67.
- Waters, C. M., and B. L. Bassler. 2005. 'Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 319-46.
- Wetzel, M. E., K. S. Kim, M. Miller, G. J. Olsen, and S. K. Farrand. 2014. 'Quorum-dependent mannopine-inducible conjugative transfer of an *Agrobacterium* opine-catabolic plasmid', *J Bacteriol*, 196: 1031-44.
- Wichelecki, D. J., M. W. Vetting, L. Chou, N. Al-Obaidi, J. T. Bouvier, S. C. Almo, and J. A. Gerlt. 2015. 'ATP-binding Cassette (ABC) Transport System Solute-binding Protein-guided Identification of Novel d-Altritol and Galactitol Catabolic Pathways in *Agrobacterium tumefaciens* C58', *J Biol Chem*, 290: 28963-76.
- Wood, D. W., J. C. Setubal, R. Kaul, D. E. Monks, J. P. Kitajima, V. K. Okura, Y. Zhou, L. Chen, G. E. Wood, N. F. Almeida, Jr., L. Woo, Y. Chen, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, P. D. Karp, D. Bovee, Sr., P. Chapman, J. Clendenning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, T. Kutayavin, R. Levy, M. J. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, P. Romero, D. Gordon, S. Zhang, H. Yoo, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z. Y. Zhao, M. Dolan, F. Chumley, S. V. Tingey, J. F. Tomb, M. P. Gordon, M. V. Olson, and E. W. Nester. 2001. 'The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58', *Science*, 294: 2317-23.
- Zambryski, P., J. Tempe, and J. Schell. 1989. 'Transfer and function of T-DNA genes from *agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants', *Cell*, 56: 193-201.
- Zhang, N., D. Wang, Y. Liu, S. Li, Q. Shen, and R. Zhang. 2014. 'Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains', *Plant Soil*, 374: 689-700.
- Zhou, M. L., Q. Zhang, M. Zhou, Z. M. Sun, X. M. Zhu, J. R. Shao, Y. X. Tang, and Y. M. Wu. 2012. 'Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize', *Glycobiology*, 22: 1775-85.

Title : Structures and specificity of Periplasmic Binding Proteins (PBPs) toward mannityl-opines and RFO (Raffinose Family Oligosaccharides) in *Agrobacterium tumefaciens*.

Keywords : Periplasmic Binding Protein, Opine, *Agrobacterium tumefaciens*, Mannityl-opines, Raffinose Family of Oligosaccharides

Abstract : *Agrobacterium tumefaciens* bacterium establishes a long-term relationship with plants. It can have two lifestyles: (1) pathogenic when it harbors the virulence plasmid Ti (Tumor inducing) causing the crown gall disease characterized by tumor formation in plant, (2) non-pathogenic living in the rhizosphere. In these two lifestyles, *Agrobacterium* uses PBP (periplasmic binding proteins) associated with ABC transporters to import molecules from plants as nutrients. PBP selects and binds the ligand that it brings to the ABC transporter, which allows its passage into the cytoplasm by the hydrolysis of two ATP molecules. The specificity of the entire transporter depends on PBP. The molecules transported and degraded by the bacteria appear as a trophic advantage for the colonization of the environment.

When *A. tumefaciens* is pathogenic, the bacterium transfers part of its Ti plasmid into the genome of plant cells, inducing the production and secretion by the plant of specific compounds for the bacterium, called opines. Twenty opines are known to date, and each of them can be metabolized by *A. tumefaciens* strains. The strain B6 possesses an octopine-type pTi, which harbors metabolism genes of the mannityl-opines family, composed of agropinic acid, agropine, mannopinic acid and mannopine. According to genetic studies in octopine type strains, the associated PBP-transporter ABC systems are AgaABCD, AgtABCD, MoaABCD and MotABCD, respectively.

In the rhizosphere, germinating seeds influence the composition of the rhizosphere and promote the growth of microorganisms by releasing molecules such as Raffinose Family of Oligosaccharides (RFO). *In silico* analyzes of *Agrobacterium fabrum* C58 indicate that the strain possesses an operon we called *mel*, similar to the *agp* operon in *Ensifer meliloti* 1021 described as responsible for the transport and degradation of RFOs that appears to influence the survival of the bacterium in the rhizosphere. We hypothesized that the PBP MelB of the *mel* operon in *A. fabrum* C58 is responsible for the transport of the RFOs.

My thesis work allowed to finalize the structural and biochemical characterization of mannityl-opines transporters and allowed the identification and characterization of MelB as responsible for the import of RFO and galactinol (precursor of the RFO). The transport and degradation of the molecules transported by these PBPs are important for the colonization of their environment.

Titre : Structures et spécificités de protéines périplasmiques de liaison (PBP) des sucres de la famille du raffinose (RFO) et des mannityl-opines chez *Agrobacterium tumefaciens*

Mots clés : Protéines périplasmiques de liaison, Opines, *Agrobacterium tumefaciens*, Mannityl-opines, Sucres de la famille du raffinose

Résumé : La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* établit une relation à long terme avec les plantes. Elle peut avoir deux modes de vie : (1) pathogène lorsqu'elle possède le plasmide de virulence Ti (Tumor inducing) provoquant la maladie de la galle du collet caractérisée par la formation de tumeur chez la plante, (2) non pathogène vivant dans la rhizosphère. Dans ces deux modes de vie, *Agrobacterium* utilise les PBP (protéines périplasmiques de liaison) associées à des transporteurs ABC pour importer des molécules issues de plante servant de nutriments. La PBP sélectionne et fixe le ligand qu'elle apporte au transporteur ABC, qui permet son passage dans le cytoplasme grâce à l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. La spécificité du transporteur entier dépend de la PBP. Les molécules transportées et dégradées par la bactérie apparaissent comme un avantage trophique pour la colonisation de l'environnement.

Lorsqu'*A. tumefaciens* est pathogène, la bactérie transfère une partie de son plasmide Ti dans le génome des cellules végétales, induisant la production et sécrétion par la plante de composés spécifiques pour la bactérie, appelés opines. Une vingtaine d'opines sont connues à ce jour, et chacune d'elles peut être métabolisée par des souches d'*A. tumefaciens*. La souche B6 possède un pTi de type octopine, qui porte les gènes de métabolisme de la famille des mannityl-opines, composée de l'acide agropinique, l'agropine, l'acide mannopinique et la mannopine. D'après des études génétiques chez des souches de type octopine, les systèmes PBP-transporteur ABC associés sont respectivement AgaABCD, AgtABCD, MoaABCD et MotABCD.

Dans la rhizosphère, les graines en germination influencent la composition de la rhizosphère et favorisent la croissance de microorganismes en libérant des molécules telles que les sucres de la famille du raffinose (RFO, Raffinose Family of Oligosaccharides). Des analyses *in silico* d'*Agrobacterium fabrum* C58 indiquent que la souche posséderait un opéron que nous avons appelé *mel*, proche de l'opéron *agp* chez *Ensifer meliloti* 1021 décrit comme responsable du transport et de la dégradation des RFO qui semble influencer sur la survie de la bactérie dans la rhizosphère. Nous avons fait l'hypothèse que la PBP MelB de l'opéron *mel* chez *A. fabrum* C58 est responsable du transport des RFO.

Mon travail de thèse a permis de finaliser la caractérisation structurale et biochimique des transporteurs des mannityl-opines et a permis l'identification et la caractérisation de MelB comme responsable de l'import des RFO et du galactinol (précurseur des RFO). Le transport et la dégradation des molécules transportées par ces PBP sont importants pour la colonisation de leur environnement.

