HAL
open science

Etude structurale de protéines périplasmiques d'Agrobacterium tumefaciens impliquées dans la virulence chez les plantes

Armelle Vigouroux

To cite this version:

Armelle Vigouroux. Etude structurale de protéines périplasmiques d'Agrobacterium tumefaciens impliquées dans la virulence chez les plantes. Biochimie, Biologie Moléculaire. 2013. hal-01375857

HAL Id: hal-01375857

https://ephe.hal.science/hal-01375857v1

Submitted on 3 Oct 2016

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

VIGOUROUX Armelle

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude structurale de protéines périplasmiques d'*Agrobacterium tumefaciens* impliquées dans la virulence chez les plantes

Soutenu le 29 mars 2013 devant le jury suivant :

Mme RENAUD Flore – Présidente

Mme MORERA Solange – Tutrice scientifique

Mme DEMIGNOT Sylvie – Tutrice pédagogique

M VILLERET Vincent – Rapporteur

M GOUET Patrice – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme MORERA Solange *E. mail :* solange.morera@lebs.cnrs-gif.fr

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales Directrice : Mme CHERFILS Jacqueline
UPR3082, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif sur Yvette

et de

Mme DEMIGNOT Sylvie *E. mail :* sylvie.demignot@crc.jussieu.fr
Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire de l'EPHE Directeur : M CHAMBAZ Jean

UMRS 872-Equipe 4 « Différenciation intestinale et métabolisme lipidique », Centre de recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de médecine, 75006, Paris

Résumé

Etude structurale de protéines périplasmiques d'*Agrobacterium tumefaciens* impliquées dans la virulence chez les plantes

Agrobactérium tumefaciens est un pathogène responsable de la maladie de la galle du collet affectant un spectre de plantes d'intérêt agronomique. Son pouvoir pathogène consiste en un processus spécialisé impliquant un transfert horizontal de gènes entre la bactérie et la plante. Ce phénomène est décrit comme une colonisation génétique dans laquelle le transfert et l'expression d'un ensemble de gènes de la bactérie dans la cellule végétale provoquent une prolifération cellulaire incontrôlée et la synthèse de composés habituellement absents chez la plante, nommés opines.

Les opines sont des composés quasi spécifiques d'une tumeur végétale induite par *A. tumefaciens*. Elles sont des médiateurs chimiques clés de l'interaction *Agrobacterium* – planteservant de source de carbone et d'azote spécifiques à la bactérie, et/ou, de signal inducteur du transfert par conjugaison du plasmide Ti d'*A. tumefaciens*, porteur de la plupart des déterminants du pouvoir pathogène. Leur entrée dans le cytoplasme d'*A. tumefaciens* se fait à l'aide d'un transporteur ABC associé à une protéine périplasmique de liaison (Periplasmic Binding Protein ou PBP). Ceci permet à la bactérie de se créer une niche écologique où la présence de ces substrats favorise la croissance et la dissémination d'*A. tumefaciens*.

Dans ce travail, nous avons déterminé les structures des protéines périplasmiques NocT et OccJ de deux modèles d'*A. tumefaciens* C58 et B6 respectivement, en présence et en absence de leur opine associée : la nopaline et l'octopine.

Les études d'interaction par microcalorimétrie ont montré que NocT et OccJ sont spécifiques de leur opine et l'analyse structurale des deux PBPs a permis de définir les résidus clés responsables de la spécificité aux opines. Chez NocT, Met 117, His 170 et Ser 207 sont les résidus signature de la fixation de la nopaline. Le mutant Met117Asn a permis de confirmer que cette méthionine a un rôle crucial pour la spécificité de la nopaline. Chez OccJ, les résidus signature de la fixation de l'octopine sont Asn 117, Thr 169, Asn 208 et l'Asn 208 semble être le résidu clé dans la sélectivité de l'octopine.

L'ensemble de ce travail, contribue à une meilleure compréhension de la capacité d'*A. tumefaciens* à percevoir de manière spécifique les opines.

Mots clés : Agrobacterium tumefaciens, opines, protéine périplasmique de liaison, cristallisation, interaction protéine/ligand

Table des matières

Introduction **2**

1. La galle du collet **2**

2. Agrobacterium tumefaciens **2**

2.1. Le genre Agrobacterium 2

2.1.1. Les caractéristiques cellulaires et métaboliques 3

2.1.2. Données taxonomiques 3

2.2. La structure du génome d'A. tumefaciens C58 3

3. Processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* **4**

3.1. Reconnaissance bactérie / hôte 4

3.1.1. Fixation aux cellules hôtes 4

3.1.2. Activation des gènes de virulence 5

3.2. Transfert T-DNA 5

3.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale 5

3.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte 5

3.2.3.1. Importation du complexe T dans le noyau 6

3.2.3.2. Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal 6

4. Tumorigenèse **6**

4.1. Expression des gènes d'ADN-T associés au développement de la tumeur 6

4.1.1. Synthèse d'hormones 7

4.1.2. Synthèse des opines 7

4.1.2.1. Synthèse 7

4.1.2.2. Rôles des opines 7

4.2. Structure de la tumeur 8

5. Réponse de la plante à l'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* **8**

6. Quorum sensing **9**

6.1. Principe 9

6.2. Mécanisme général chez A. tumefaciens 9

6.2.1. Régulation du quorum sensing 9

6.2.2. Fonctions régulées par le quorum sensing 10

6.2.2.1. Le transfert conjugatif du plasmide Ti 10

6.2.2.2. La réplication du plasmide Ti 10

6.2.2.3. Le niveau d'agressivité de la bactérie 10

6.2.3. Les antagonistes du QS chez *A. tumefaciens* C58 10
6.2.3.1. Un antagoniste de TraR : TraM 11
6.2.3.2. La dégradation des signaux AHL : rôle des lactonases AiiB et BlcC 11
7. Les protéines périplasmiques de liaison **11**
7.1. Les protéines périplasmiques 11
7.1.1. Structures 11
7.1.2. Classification 12
7.1.3. Liaison du PBP à son ligand 13
7.2. Les PBP et le transport de soluté 13
7.2.1. Transporteurs ABC 13
7.2.1.1. Les domaines transmembranaires (TMD) 13
7.2.1.2. Les domaines de liaison des nucléotides (NBD) 14
7.2.2. Mécanisme de transport des solutés 14
7.3. Fonctions associées aux PBP chez A. tumefaciens 14
7.3.1. PBPs impliquées dans la perception des nutriments 14
7.3.2. PBP impliquée dans le transfert conjugatif 15
7.3.3. PBP impliquée dans la régulation des gènes de virulence 15
7.3.4. PBP impliquées dans la réponse au stress oxydatif 15
Références bibliographiques **16**

Liste des Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

C_ : carbone _

DO : densité optique

IPTG : isopropyl _-D-1-thiogalactopyranoside

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

kDa : kilo Dalton

LB : Luria Broth

PBP : Periplasmic Binding Protein ou proteine périplasmique de liaison

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDB : Protein Data Bank

QS : Quorum Sensing

Rmsd : root-mean-square deviation ou écard quadratique moyen

SAD : Single Anomalous Diffusion

SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEC-MALS : Size Eclusion Column Multi Angle Light Scattering

TB : Terrific Broth

Introduction

1. La galle du collet

La galle du collet (crown gall) est une maladie répandue dans le monde entier et causée par une bactérie *Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend, 1907).* Elle touche une large gamme de plantes : environ 640 espèces réparties dans 93 familles *(De Cleene et De Ley, 1976).*

Les symptômes de la galle du collet sont décrit depuis l'antiquité. Ils se manifestent par l'apparition d'excroissances végétales au niveau du collet (zone de transition entre le système racinaire et la tige) ou à la base des racines au niveau d'une blessure. Ces tumeurs de couleur blanchâtre et de consistance molle sont plus ou moins de sphériques avec une surface irrégulière. Leur taille peut atteindre parfois 30 cm de diamètre. En vieillissant, les tumeurs prennent une teinte brun-noirâtre (Figure 1 B), elles durcissent et se craquellent pouvant être la cible de micro-organismes 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 profondément la circulation de la sève.

Cette maladie affecte le développement et la productivité de nombreuses plantes dont un certain nombre sont d'intérêt agronomique comme les pommiers, les poiriers, les rosiers, etc … Les dégâts les plus importants sont observés en serre où les conditions environnementales sont très favorables aux agrobactéries ou en pépinières où le greffage des plantes facilite le développement de la maladie *(Pionnat et al, 1999 ; Beneddra et al, 1996).* La conséquence directe est une non commercialisation des plants infectés entrainant un manque à gagner pouvant être considérable pour les pépiniéristes.

2. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie isolée pour la première fois en 1907 dans un fragment de galle par Smith et Townsend sous le nom de *Bacterium tumefaciens (Smith et Townsend, 1907).*

2.1. Le genre Agrobacterium

Les bactéries du genre *Agrobacterium (Conn, 1942)* sont naturellement présentes dans les sols et sont plus particulièrement retrouvées dans les sols rhizosphériques (sol parcouru par des racines de plantes). Elles appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* dans la classe des alpha-protéobactéries. La famille *Rhizobiaceae* est capable d'induire la formation de nodosités sur les plantes légumineuses, permettant la fixation de l'azote atmosphérique chez ces plantes.

Le genre *Agrobacterium* comprend une douzaine d'espèces réparties en différents groupes taxonomiques *(Popoff et al, 1984).* Ces bactéries vivent en mode saprophytes, grâce à la

décomposition de la matière organique. Cependant plusieurs espèces d'*Agrobacterium* sont des phytopathogènes de la plante. En effet, en présence d'éléments génétiques particuliers certaines espèces dont *A. tumefaciens,* peuvent provoquer des maladies néoplastiques. Le caractère pathogène d'*Agrobacterium* dépend de deux éléments : l'insertion de l'ADN Ti (tumour inducing) dans le génome de la plante et la modification du métabolisme cellulaire de celle-ci entrainant une prolifération cellulaire et la synthèse de composés nutritifs pour *Agrobacterium (Van Larebeke et al, 1974)*. Ce mécanisme d'infection par un phénomène de transgénèse naturelle est le seul cas de transfert d'information génétique décrit entre le règne bactérien et les eucaryotes.

2.1.1. Les caractéristiques cellulaires et métaboliques

Les *Agrobacterium* sont des bacilles de coloration Gram négative dont la taille varie entre 0,6 à 1 μm sur 1 à 3 μm. Ces bactéries sont pour la plupart des aérobies strictes. Elles sont chimioorganotrophes, non sporulantes et sont très mobiles grâce à des flagelles péritriches (Figure 1 C). Elles utilisent comme source de carbone une grande variété de composés organiques. Leur température optimale de croissance est située entre 24 et 28 °C. Dans ces conditions et dans un milieu de culture favorable, leur temps de génération avoisine 120 minutes. À l'inverse, dans des milieux pauvres, elles résistent bien aux carences et peuvent croitre et survivre pendant plusieurs semaines. Elles résistent aussi aux sels de tellure, et à de nombreux antibiotiques de type bêta-lactame *(Ogawa et Mii, 2005)*.

2.1.2. Données taxonomiques

Il est difficile de donner une classification taxonomique des agrobactéries car celle-ci reste discutée et évolue très fréquemment.

La première classification du genre *Agrobacterium* a été réalisée en fonction de la pathogénicité des bactéries. Six espèces de ce genre ont été définies en fonction des symptômes causés chez la plante : A. tumefaciens *(Smith et Townsend, 1907),* responsable de la galle du collet ; *A. rhizogenes (Riker et al, 1930)*, responsable de la prolifération incontrôlée des racines au site d'infection nommée « hairy root » ; *A. vitis (Ophel et Kerr, 1990),* agent causal de la galle de la vigne ; *A. rubi (Hildebrand et al, 1940)*, à l'origine de tumeurs sur des tiges des plantes du genre *Rubus ; A. larrymorrei (Bouzar et Jones, 2001),* se développant sur les tiges de *Ficus benjamina L. ;* et la dernière *A. radiobacter (Beijerinck et Delden, 1902), est une* souche non pathogène.

La deuxième classification a été effectuée en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques, les séparant en trois groupes taxonomiques (biovars) *(Kesters et De Ley, 1984)*. Des expériences d'hybridation ADN-ADN ont montrées que le biovar 1 est le groupe le plus hétérogène (10 espèces génomiques) *(Popoff et al, 1984),* groupe dans lequel les souches *A. tumefaciens* C58 et B6 sont répertoriées (*Costechareyre et al, 2010)*.

2.2. La structure du génome d'A. tumefaciens C58

La souche modèle du biovar 1, *Agrobacterium tumefaciens* C58 a été complètement séquencée deux fois *(Wood et al, 2001 ; Goodner et al, 2001).* Elle possède quatre réplicons : un chromosome circulaire (CcC58, 2,8Mb) comportant 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 …), un chromosome linéaire (LcC58, 2Mb), un plasmide cryptique At (pAtC58, 0,55Mb) et un plasmide Ti (« Tumour-inducing », pTiC58, 0,2Mb). Ce dernier plasmide porte le fragment d'ADN qui est transféré dans la cellule végétale, appelé ADN-T (« Tansferred-DNA ») *(Chilton et al, 1977)* et les gènes de virulence *vir* qui régissent l'intégration de l'ADN-T dans la cellule hôte.

Le génome d'*A. tumefaciens* C58 contient 5419 gènes codant pour des protéines dont plus de 60% possèdent une fonction putative attribuée par homologie de séquences. Les familles les plus représentatives sont les adénosines triphosphates (ATPases) et les transporteurs de type ABC (ATP binding cassette).

3. Processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le processus de transgénèse mise en place par *A. tumefaciens* grâce à la présence du plasmide Ti a permis la mise en évidence du lien entre la tumorigenèse induite *par A. tumefaciens* et l'intégration de son ADN-T dans le génome de la cellule végétale infectée *(Chilton et al, 1977).* Ce mécanisme de transgénèse 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 :

- la reconnaissance bactérie / hôte,
- le transfert de l'ADN-T,
- l'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur.

3.1. Reconnaissance bactérie / hôte

3.1.1. Fixation aux cellules hôtes

Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que des sucres et des composés phénoliques attirant ainsi la bactérie qui se déplace vers la blessure à l'aide de ses flagelles en suivant le gradient de concentration *(Ashby et al, 1988).* Pour établir un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnait des protéines localisées sur la paroi végétale et apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales *(Wagner et Matthysse, 1992).* Ces protéines sont reconnues par des polysaccharides acylés de type _-1-2 glucane, synthétisés excrétés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC, chvA* et *chvB (Cangelosi et al, 1987).* L'interaction du polysaccharide avec la protéine de type vitronectine entraîne la synthèse de filaments de type cellulose stabilisant et renforçant ainsi l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte.

3.1.2. Activation des gènes de virulence

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgenèse. Les gènes *vir* présents sur la partie non transférable du plasmide Ti ont besoin d'être induits par l'exsudât des cellules blessées pour être exprimés. Les composés phénoliques synthétisés par la plante sont reconnus par la protéine VirA (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie) *(Toyoda-Yamamoto et al, 2000)*. Après fixation des composés, la protéine VirA s'auto-phosphoryle puis phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique VirG qui se fixe sur la boite *vir* qui active la transcription des promoteurs des gènes *vir*. Cette dernière étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert du T-DNA.

3.2. Transfert T-DNA

3.2.1. Production du brin T

L'expression des gènes *vir* conduit à la production d'un brin d'ADN-T. Pour cela, les endonucléases VirD1 et VirD2 vont agir spécifiquement pour couper un fragment de plasmide Ti *(Filichkin et Gelvin, 1993)*. Grace à son activité hélicase, la protéine VirD1 sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine VirD2 quand à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. VirD2 se fixe covalemment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T *(Gelvin, 2003)*. Le complexe VirD2/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et ainsi le brin T est formé et il va pouvoir s'orienter afin d'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.

3.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale

Le complexe brin T/ VirD2 ainsi que quatre autres protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférés dans la cellule végétale. Ce transfert requiert une machinerie protéique particulière qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte *(Vergunst et al, 2000)*. Cette structure est un système de sécrétion de type IV *(Christie et Cascales, 2005)* composé d'un assemblage de 12 protéines : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4 *(Hwang et al, 2004)* .

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 groupe. 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 et Meyer, 2006)*.

3.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte

A son entrée dans 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. On le nomme complexe T. Pour le moment, les données expérimentales présents dans la littérature ne permettent pas de déterminer précisément où se forme le complexe T mais la possibilité que le complexe se forme avant ou lors du passage dans le canal de translocation est l'hypothèse la plus récente *(Pitzchke et Hirt, 2010)*.

3.2.3.1. Importation du complexe T dans le noyau

Dans le cytoplasme de la cellule végétale, le complexe T est dirigé vers le noyau de la cellule à l'aide de protéines cargos telles que la dynéine *(Salman et al, 2005)*. De plus, il a été démontré que des protéines de la cellule hôte de la famille des importines se fixent sur les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) de VirD2 et VirE2, facilitant ainsi l'entrée du complexe T dans le noyau *(Ballas et Citovsky, 1997)*. La protéine VirE2 interagit avec la protéine de plante VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1). En réponse au stress induit par l'entrée de protéines dans la cellule de plante, VIP1 est activé par phosphorylation par la protéine MPK3. Dans de telles conditions, VIP1 est recrutée dans le noyau où elle y co-transporte VirE2 et donc l'ADN-T *(Djamei et al, 2007)*.

3.2.3.2. 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 ; Szabados et al, 2002 ; Li et al, 2006)*. Actuellement, deux modèles sont proposés *(Tzfira et al, 2004)*.

Le premier se base sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin T et la séquence d'ADN de la plante dans des régions 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 et Hohn, 1995)*.

Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologue (NHEJ : non homologous end-joining) suite à des cassures de l'ADN végétal *(Chilton et 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. Cette réplication non homologue explique plus facilement la présence de copies répétées d'ADN-T et la présence fréquente de plusieurs ADN-T d'*Agrobacterium* de souches différentes dans un même génome de cellule végétale *(De Buck et al, 1999 ; De Neve et al, 1997 ; Krizkova et Hrouda, 1998)*.

4. Tumorigenèse

4.1. Expression des gènes d'ADN-T associés au développement de la tumeur

Les gènes portés par l'ADN-T sont transcrits et traduits grâce à la machinerie cellulaire de la plante et leur régulation se fait via leurs propres promoteurs, car les promoteurs bactériens ressemblent aux promoteurs eucaryotes *(Slightom et al, 1986)*.

4.1.1. Synthèse d'hormones

Certains gènes codés par l'ADN-T d'*Agrobacterium* permettent la synthèse dans la cellule de plante d'hormones végétales. Parmi ces gènes, *iaaM, iaaH* et *ipt* participent à la synthèse des hormones végétales de la famille des auxines ou cytokinine (le 3-indole-acétamide (IAM), le 3-indole-acétate (AIA), l'isopentényladénosine 5'-monophosphate), connues pour réguler la prolifération, l'élongation et la différenciation des cellules végétales *(Zambryski et al, 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 de tumeurs *(Veselov et al, 2003)*.

4.1.2. Synthèse des opines

4.1.2.1. Synthèse

Les opines sont des petites molécules dont la synthèse est réalisée dans la cellule tumorale en réponse à un stimulus de la bactérie *(Petit et Tempe, 1984)*.

Dans la nature, il existe une vingtaine d'opines résultant de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un acide _-cétonique. Elles sont séparées en deux classes, les opines qui proviennent de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre comme l'agropine, et celles qui sont dérivées de la condensation d'un acide aminé et d'un acide comme nos deux opines d'intérêt, l'octopine et la nopaline, qui résultent respectivement de la condensation d'une arginine avec un pyruvate ou un _-kétoglutarate. Les protéines nécessaires à leur biosynthèse sont codées sur la partie non transférable du plasmide Ti. Les bactéries utilisent les métabolites présents dans la cellule hôte pour générer les opines. Les gènes de dégradation des opines sont portés par les plasmides Ti, et seul *Agrobacterium* est capable de métaboliser ces molécules. Ainsi pour produire les opines, les agrobactéries détournent l'activité métabolique de la plante à son profit.

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 correspondant sur le plasmide Ti *(Montoya et al, 1977 ; Dessaux et al, 1988)*. Par exemple, la souche d'*A. tumefaciens* B6 contenant le plasmide Ti B6 est une souche spécifique de l'octopine (produit du gène *occ* : octopine synthase) et de la mannopine (produit du gène *mas* : mannopine synthase) et celle contenant le plasmide Ti C58 une souche à nopaline (produit du gène *noc* : nopaline synthase) et agrocinopine A et B (produits du gène *acs* : agrocinopine synthase). Cette caractéristique a été utilisée pour le classement des souches d'*Agrobacterium (Petit et al, 1970 et 1983)*.

4.1.2.2. Rôles des opines

Le premier rôle des opines est de servir de source de carbone et d'azote aux bactéries capables de les cataboliser. Le fait qu'*Agrobacterium* ne puisse utiliser que les opines dont il a le gène sur le plasmide Ti, lui confère une spécificité de substrat par rapport aux autres bactéries présentes dans la tumeur, et favorise sa propagation *(Tempe et al, 1979)*. En plus du rôle de nutriment, certaines opines comme l'agrocinopine et l'octopine peuvent induire de façon indirecte le transfert conjugatif du plasmide Ti en stimulant l'induction des gènes *vir (Veluthambi et al, 1989)*. Ce phénomène est appelé le « concept d'opine » *(Guyon et al, 1980)*. Ainsi les opines, jouent un rôle majeur dans la propagation et la dissémination d'*Agrobacterium tumefaciens* et créent un environnement écologique favorable à la croissance et au développement du pouvoir pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* (riche en métabolites et opine).

4.2. Structure de la tumeur

Le développement des tumeurs végétales induites par *A. tumefaciens* est associé à la néo-vascularisation des tissus. Le réseau vasculaire des tumeurs est connecté au système circulatoire de la plante, permettant ainsi l'apport d'eau et de nutriments nécessaires à la multiplication des bactéries et donc à la prolifération des cellules tumorales *(Ullrich et al, 2000)*. La mise en place du réseau vasculaire et la prolifération des cellules tumorales sont liés à une concentration élevée en auxine et à un déficit en oxygène dans la tumeur. Ces deux phénomènes favorisent la stimulation de l'activité de l'acide 1-aminocyclopropane-1 carboxilique (ACC) qui joue un rôle important dans la synthèse de l'éthylène, hormone de plante. Cette hormone participe à la vascularisation par la restructuration du xylème *(Wachter et al, 2003)* et stimule la synthèse de l'acide abscissique (ABA), la phytohormone ABA ayant un rôle dans la protection de la tumeur contre la déshydratation *(Efetova et al, 2007)*.

5. Réponse de la plante à l'infection d'*Agrobacterium tumefaciens*

La plante a mis en place un système de défense « immunitaire » qui agit aux différentes étapes de l'infection par *A.tumefaciens*. Le mécanisme le plus étudié est basé sur l'induction d'une cascade de signalisation de type MAP kinase (Mitogen- Activated Protein kinase) lorsque la plante perçoit des signaux du pathogène au niveau de certains récepteurs membranaires. Ces signaux sont appelés PAMPs (Pathogen- Associated Molecular Patterns ou molécules associées aux pathogènes). Ils peuvent être aussi bien des éléments du pathogène que des composés produits par la plante en réponse à la présence du pathogène *(Pitzschke et al, 2009)*. Cette réponse entraine une défense locale comme la réponse hypersensitive et/ou la réponse systématique acquise.

Lors d'une étude sur l'infection d'Arabidopsis thaliana par *A. tumefaciens* une catégorie de PAMPs a été caractérisée *(Zipfel et al, 2006)*. Dans ce travail, Zipfel et al ont montrés que les récepteurs EFR et FLS2 d'Arabidopsis, récepteurs de type PRR (Pattern Recognition Receptor) détectaient des PAMPs possédant tous des domaines conservés de flagelline bactérienne et du facteur d'élongation EF-Tu bactérien. La fixation de ces deux PAMPs aux PRR activent un ensemble d'évènements de signalisation et de réponse de défense de la plante dont une cascade de signalisation MAP kinase aboutissant à la production d'espèces réactives de l'oxygène constituant la réponse hypersensitive et à l'origine de la mort cellulaire au niveau des tissus infectés.

Lors de l'infection, la concentration en acide salicylique augmente dans les tissus végétaux. Ce composé induit la synthèse de protéines de résistance qui ont une activité antimicrobienne. Ce système correspond à la réponse systématique acquise.

6. Quorum sensing

6.1. Principe

Le quorum sensing (QS) est un système communication basé sur la régulation génétique en réponse aux fluctuations de la densité de la population cellulaire *(Fuqua et al, 1994)*. Les bactéries utilisent le système de communication QS pour organiser un large éventail d'activités physiologiques dont la symbiose, la virulence, la conjugaison, la motilité, la sporulation... Ce mode de communication permet d'adopter un comportement groupé essentiel à la survie et à la virulence *(Waters et Bassler, 2005)*.

Ce mécanisme au travers du système LuxI/LuxR a été décrit pour la 1ère fois chez la bactérie *Vibrio fisheri (Nealson et al, 1970)*. Il repose sur la synthèse, la diffusion et la perception de signaux chimiques appelés auto-inducteurs libérés dans le milieu extracellulaire. A une faible densité cellulaire, la quantité d'auto-inducteurs libérés n'est pas suffisante pour être perçue par les membres de la population bactérienne. Lorsque la densité de la population augmente, la concentration extracellulaire des phéromones s'accroit *(Nealson et Hastings, 1979 ; Fuqua et al, 1994) et o*n dit que le quorum est atteint lorsque la détection d'un seuil minimal de l'auto-inducteur par des récepteurs intracellulaires spécifiques des bactéries va induire la régulation transcriptionnelle synchronisée des gènes cibles au sein de toute la communauté bactérienne.

Le QS est un système de communication répandu chez les bactéries, mais on peut observer des variations suivant les souches *(Waters et Bassler, 2005),* notamment sur la nature des auto-inducteurs perçus répartis en trois classes : AHL (Acyle Homosérine Lactone), spécifique des bactéries à Gram-négatifs, AI-2 (Auto-Inducteur-2), que l'on retrouve chez les deux types bactériens et AIP (Peptide Auto-Inducteur), spécifique des bactéries à Gram-positif.

6.2. Mécanisme général chez A. tumefaciens

6.2.1. Régulation du quorum sensing

Chez *A. tumefaciens*, la régulation du QS se fait par le système TraI/TraR (système homologue de LuxI/LuxR) *(Piper et al, 1993)* dont les gènes sont localisés sur la partie transmissible du plasmide Ti *(Zhang et al, 1993)*. Dans ce système, TraI est la protéine responsable de la synthèse de l'auto-inducteur et TraR assure la perception des signaux de l'auto-inducteur et la régulation transcriptionnelle qui permet l'expression des gènes cibles du QS *(Hwang et al, 1994 ; White et Winans, 2007)*. La conjugaison entre cellules d'*A. tumefaciens* nécessite deux signaux sensor : un signal d'une opine hôte produite au niveau du site d'infection et un signal auto –inducteur AHL, la N-(3-oxoctanoyl)-homoserine lactone (notée OC8HSL) *(Dessaux et al, 1992 ; Zhang et al, 1993)*.

Les opines utilisées principalement comme source de nutriments pour les bactéries peuvent aussi initier indirectement la cascade du QS. En effet, les opines induisent indirectement l'expression de TraR par un régulateur spécifique des opines. Il existe deux classes de régulateurs d'opines : octopine-type et nopaline- type. Dans l'octopine-type, l'octopine agit pour induire l'expression de TraR par l'activation d'OccR *(Fuqua et Winans, 1996)*. Pour le nopaline-type, les opines agrocinopine A et B

induisent l'expression de TraR au travers de l'inactivation du répresseur AccR *(Beck von Bodman et al, 1992)*.

6.2.2. Fonctions régulées par le quorum sensing

Les fonctions et le mécanisme du QS chez *A. tumefaciens* sont les même que celles de V. fischeri. Chez *A. tumefaciens*, le QS contrôle le transfert conjugatif du plasmide Ti *(Piper et al, 1993)*, l'amplification du nombre de copie du plasmide et le niveau d'agressivité de la bactérie sur la plante. Les gènes ciblés par le QS, operons *tra, trb, rep* et le gène *TraM*, sont présents sur le plasmide Ti et sont régulés par le complexe auto-inducteur/TraR *(Fuqua et al, 1995 ; White et Winans, 2007)*.

Ainsi, en présence d'un faible niveau d'expression de TraI, peu d'auto-inducteurs sont produits. Puis lorsque la densité bactérienne augmente, l'expression du gène *TraR* est activé. La protéine TraR est produite et se fixe à OC8HSL. Le complexe formé induit l'expression de TraI pour établir une boucle d'auto-induction positive du QS.

6.2.2.1. Le transfert conjugatif du plasmide Ti

Les gènes des opérons *tra* et *trb* sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide Ti d'une souche donatrice vers une souche réceptrice. L'operon *tra* est nécessaire pour la mobilisation du plasmide Ti *(Fuqua et Winans, 1996)*. L'operon *trb* code pour les gènes impliqués dans la production du pore SST4 essentiel pour le transfert horizontal du plasmide Ti *(Li et al, 1998)*. Ce mécanisme de transfert du plasmide Ti est essentiel à la dissémination du pouvoir pathogène au sein de la communauté bactérienne.

6.2.2.2. La réplication du plasmide Ti

Les gènes de l'opéron *rep* sont engagés dans la réplication du plasmide Ti *(Pappas et Winans, 2003)*. Comme le plasmide Ti est maintenu en une seule copie dans les bactéries, les gènes *rep A* et *rep B* codent pour des protéines impliquées dans le système de partition. Ces gènes sont requis pour la transmission du plasmide de la cellule mère à la cellule fille. Le produit du gène *rep C*, une réplicase est requise pour le processus de réplication du plasmide Ti *(Pappas, 2008)*.

6.2.2.3. Le niveau d'agressivité de la bactérie

Le niveau d'agressivité d'*A. tumefaciens* dépends de sa capacité à former des tumeurs chez la plante. Son agressivité est lié au nombre de copie du plasmide Ti, car le gène de virulence *vir* est porté sur le plasmide Ti. Ainsi l'induction des gènes *rep* par le QS entraîne l'augmentation du nombre de copie de plasmide Ti, donc une élévation du nombre de gènes *vir* impliquant un accroissement du transfert d'ADN-T dans les cellules végétales. L'agressivité de la bactérie est ainsi amplifiée par le QS et il en résulte une aggravation des symptômes chez la plante.

6.2.3. Les antagonistes du QS chez *A. tumefaciens* C58

6.2.3.1. Un antagoniste de TraR : TraM

Pour réguler négativement le QS, le gène TraM code pour un antagoniste de TraR *(Fuqua et al, 1995)*. Son expression est induite par le complexe auto-inducteur/ TraR à partir d'une certaine concentration. Il agit comme anti-activateur des gènes régulés par le QS *(Hwang et al, 1995)*. Pour cela TraM a deux stratégies, soit il inhibe directement TraR en empêchant de se lier aux boites tra, soit TraM perturbe les complexes TraR/ADN déjà formés *(Luo et al, 2000)*. TraM semble être la principale différence entre les mécanismes de régulation du QS chez *A. tumefaciens* par rapport à *V. fischeri*.

6.2.3.2. La dégradation des signaux AHL : rôle des lactonases AiiB et BlcC

Les lactonases sont des enzymes capables d'hydrolyser la liaison ester du noyau lactone des AHL, provoquant la perte de la fonction de signalisation de ces molécules.

A.tumefaciens C58 dispose de deux AHL lactonases, AiiB et BlcC portées par les gènes *AiiB* présent sur le plasmide Ti et *BlcC* présent sur le plasmide At. Le rôle de ces lactonases est de dégrader les signaux d'OC8HSL pour moduler les fonctions de régulation par le QS.

7. Les protéines périplasmiques de liaison

Chez les bactéries, le transport sélectif de signaux moléculaires environnementaux est une étape clé de processus biologiques tels que la nutrition, la communication intracellulaire, la virulence, … Ce mécanisme fait intervenir des complexes protéiques transmembranaires, dont les plus représentatifs sont les transporteurs ABC (ATP binding cassette). Chez les bactéries, ces transporteurs sont associés à des protéines périplasmiques de liaison appelées PBPs (Periplasmic Binding Protein) qui assurent la spécificité et le transport unidirectionnel des molécules vers le cytoplasme.

7.1. Les protéines périplasmiques

Les protéines périplasmiques de liaison (PBP) forment une grande famille de protéines allant de 25 à 70 kDa. Elles servent de récepteurs pour divers ligands solubles : oligosaccharides, acides aminés, peptides, anions, complexes ferreux organiques … *(Tam et Saier, 1993)* et interviennent dans le processus de reconnaissance et de capture de solutés dans la région extra cytoplasmique des bactéries.

7.1.1. Structures

La protéine ABP *(L-arabinose-Binding Protein)* a été la première structure cristalline résolue *(Quiocho et al, 1974)*. Depuis, un peu plus de 120 structures de PBPs ont été résolues et déposées dans la PDB. L'analyse de ces PBPs montre qu'entre elles, elles présentent une faible homologie de séquence, mais que leurs structures 3D sont généralement bien conservées. Les caractéristiques structurales communes à toutes les PBP sont :

- Elles sont constituées de deux domaines globulaires (lobes) de type feuillets _ central entourés par des hélices _,
- La fixation du soluté se fait dans le sillon situé entre les deux lobes,
- La fixation du ligand permet un mouvement des deux lobes au niveau de la région charnière permettant aux PBPs d'adopter deux conformations différentes : ouvertes ou fermées *(Quiocho et al, 1991 ; Quiocho et Ledvina, 1996).*

Bien que la structure ternaire soit globalement conservée, il subsiste des différences au niveau de la taille et du réarrangement des structures secondaires de leurs domaines.

7.1.2. Classification

Plusieurs classifications de PBPs existent suivant leurs structures tridimensionnelles ou leurs ligands.

La première classification des PBPs a été réalisée par Tam et Saier en 1993. Dans le cadre de leurs travaux, ils ont classé la majorité des PBPs en 8 sous-groupes en fonction des solutés fixés *(Tam et Saier, 1993).* Les sous-groupes sont les suivants, PBPs fixant :

1- Oligosaccharides, glycérol-3-phosphate, fer ;
2- Pentose, hexoses ;
3- Acides aminés polaires, opines ;
4- Acides aminés aliphatiques et hydrophobes ;
5- Peptides et nickel ;
6- Anions inorganiques multivalents ;
7- Anions organiques multivalents ;
8- Complexes ferreux organiques, vitamine B12.

Cette étude montre aussi qu'il existe une plus grande homologie de séquence entre deux protéines fixant le même soluté mais provenant de bactéries différentes qu'entre deux PBPs provenant du même organisme mais fixant des ligands différents.

La deuxième classification se fonde sur le principe que toutes les PBPs ont un ancêtre commun. Elle est basée sur la relation phylogénétique et la comparaison des arrangements topologiques des structures 3D. De cette façon, Fukami-Kobayashi a proposé deux classes différentes par le nombre et l'ordre des feuillets _ et par le nombre de segments reliant les deux lobes (classes I : trois courts segments, classe II : deux segments) *(Fukami-Kobayashi et al, 1999).* Puis Karpowich a ajouté une 3ème classe regroupant les PBPs dont la région charnière est formée par une longue hélice _ *(Karpowich et al, 2003).*

Enfin depuis 2010, grâce à la multiplication des données structurales déposées dans la PDB, Berntsson a défini une nouvelle classification plus précise basée sur un alignement de structures tridimensionnelles *(Berntsson et al, 2010).* Elle est composée des six groupes présentés dans la figure 12. La grande différence avec la classification proposée par Tam est que dans celle-ci, nous observons que les protéines ayant une forte homologie de structure ne se lient pas forcement avec des solutés de même nature.

7.1.3. Liaison du PBP à son ligand

De nombreuses structures de PBPs sont disponibles soit sous forme vide, soit complexée au soluté. Dans la majorité des cas, en absence de ligand, les PBPs se trouvent sous forme ouverte permettant ainsi la reconnaissance et la fixation du ligand au niveau du sillon. La fixation du soluté induit un mouvement de charnière qui rapproche les deux domaines globulaires se refermant sur le ligand. Cette conformation est nommée forme fermée. Ce mécanisme appelé « Venus Flytrap » (Felder *et al*, 1999) chez les PBPs fait référence aux Dionées (plantes carnivores attrape-mouche) décrites par Carl von Linne en 1770.

Selon l'état de liaison les PBPs peuvent adopter des conformations intermédiaires *(Newcomer et al, 1981)*, comme des protéines ligandées ouvertes ou des PBPs vides sous forme fermées.

7.2. Les PBP et le transport de soluté

Chez les bactéries, les PBPs impliquées dans le transport de molécules peuvent être associées à trois types de transporteurs : ABC (ATP Binding Cassette), TRAP (Tripartite ATP Independent Periplasmic) et TTT (Tripartite Tricarboxylate Transporteur). Ces transporteurs actifs lient et transportent leur substrat à travers la membrane en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP contre le gradient de concentration du substrat. Chez les bactéries, les transporteurs les plus représentatifs sont les transporteurs de type ABC.

7.2.1. Transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) appartiennent à l'une des plus larges familles de protéines ubiquitaires chez toutes les espèces. On en dénombre une cinquantaine de gènes codant pour des transporteurs ABC chez l'homme *(Dean et al, 2001)*. Chez *A. tumefaciens* C58, 15 % du génome code pour des transporteurs dont 60 % sont des transporteurs ABC *(Wood et al, 2001)*.

Ces protéines sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions…) mais également de substances toxiques (métaux lourds, drogues…). Elles se caractérisent par la diversité de fonction de cette famille de protéines.

Les transporteurs ABC sont constitués de quatre domaines principaux, deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaison des nucléotides (NBD).

7.2.1.1. Les domaines transmembranaires (TMD)

Les deux TMD s'associent pour former le pore de translocation du soluté au travers de la membrane interne de la bactérie. Typiquement, leur structure est constituée de quatre à six hélices _ qui traversent la membrane, soit un total de huit à douze hélices par dimère de TMD. Ces hélices sont reliées entre elles par des boucles intra et extra cytoplasmiques *(Quentin et al, 1999)*. Au niveau des hélices transmembranaires, les TMDs possèdent des résidus impliqués dans la fixation et le transport des solutés.

7.2.1.2. Les domaines de liaison des nucléotides (NBD)

Les domaines NBDs sont très conservés comme a pu le montrer la résolution de plusieurs structures cristallines de ces NBDs. De façon générale, ils présentent tous un repliement similaire : un sous domaine _/_ (deux feuillets _ et six hélices _), un sous domaine _ reliés par deux boucles flexibles dont l'une contient le motif « Q-loop » impliqué dans la transmission des changements de conformation des domaines TMDs et NBDs.

Les NBDs sont caractérisés par des séquences consensus comme la signature ABC qui permet de les identifier mais aussi les motifs Walker A (« P-loop ») et Walker B. Le motif Walker A est impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Le motif Walker B contient le site de l'ion Mg^{2+} utilisé lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Enfin les NBDs interagissent avec le motif conservé EAA des boucles intracellulaires des TMDs.

7.2.2. Mécanisme de transport des solutés

Le transport du soluté par le transporteur ABC implique d'importants changements conformationnels et l'hydrolyse de l'ATP. Le mécanisme est le suivant :

Le ligand traverse la membrane externe de la bactérie à l'aide des porines. Dans le périplasme, il est pris en charge par une PBP. La fixation du soluté à la PBP entraine un changement conformationnel de la PBP sous une forme fermée. Le cycle du transport par l'ABC transporteur est initié lors de l'interaction de la PBP avec le site de liaison de l'ABC transporteur situé au niveau des TMD qui prend en charge le soluté. Cette liaison avec le ligand induit un changement conformationnel des TMD, qui est transmis aux NBDs pour qu'ils lient l'ATP. La liaison de l'ATP qui induit d'importants changements conformationnels responsables du changement d'orientation du site de liaison du substrat de telle sorte que le substrat soit libéré dans le cytoplasme *(Ames, 1986)*. L'hydrolyse de l'ATP et le relarguage de l'ADP et du Pi permettent de restaurer le transporteur dans sa conformation initiale pour initier un nouveau cycle .

7.3. Fonctions associées aux PBP chez A. tumefaciens

La séquence d'*A. tumefaciens* C58 a permis d'identifier plus de 150 gènes codant pour des PBPs associées à des transporteurs ABC *(Wood et al, 2001 ; Goodner et al, 2001)* et possédant différentes fonctions biologiques comme la perception de nutriments, le transfert conjugatif, la régulation des gènes de virulence et la réponse au stress oxydatif.

7.3.1. PBPs impliquées dans la perception des nutriments

La croissance et la survie d'*A. tumefaciens* dépend de sa capacité à transporter les sources nutritives disponibles dans son environnement : les sucres, les opines. Les sucres (glucose, galactose, saccharose) sont trouvés par la bactérie dans les exsudats des tissus végétaux blessés et dans les tumeurs. Le transport des ces sucres se fait par des PBPs comme ChvE et les Glucose Binding Protein (GBP 1 et 2),…, qui sont des protéines très affines aux sucres. Les opines, comme indiqué précédemment sont des composés carbonés utilisés comme source nutritive par les agrobactéries qui

les synthétisent. Dans le cadre de ce projet, les PBPs responsables du transport de la nopaline chez *A. tumefaciens* C58 et de l'octopine chez *A. tumefaciens* A6, sont respectivement NocT et OccJ. Les gènes *noc* et *occ,* portés par le plasmide Ti dans une région proche de l'ADN-T, codent pour ces PBPs *(Zanker et al, 1992).*

7.3.2. PBP impliquée dans le transfert conjugatif

La protéine AccA joue un rôle dans le QS et plus particulièrement dans la perception et le transport des agrocinopines A et B. Ces deux composés produits dans les tumeurs par *A. tumefaciens* C58 par le gène *acs* sont responsables du transfert horizontal du plasmide Ti *(Ellis et al, 1982).* En plus de son rôle dans la dissémination du pouvoir pathogène d'*A.tumefaciens* C58, AccA est aussi responsable de la perception d'un antibiotique produit par la souche *Agrobacterium radiobacter* K84, l'agrocine 84.

Dans le système octopine-type, la protéine OccJ a un rôle similaire à celui d'AccA. En effet, OccJ participe à la perception de l'octopine qui est aussi impliqué dans le transfert conjugatif du plasmide Ti des souches d'*A. tumefaciens* à octopine.

7.3.3. PBP impliquée dans la régulation des gènes de virulence

Le pouvoir pathogène d'*A. tumefaciens* est lié à l'expression des gènes de virulence *vir*. Dès le début de l'infection de la plante une PBP, la protéine ChvE intervient pour la reconnaissance des signaux végétaux. Cette PBP est spécifique des sucres et collabore avec le sensor VirA et le régulateur VirG pour activer la transcription des gènes *vir (Stachel et Zambryski, 1986).* Ensuite pour la régulation des gènes *vir*, la protéine ChvE est de nouveau sollicitée pour la régulation indirecte de *vir* via le domaine périplasmique VirA *(Shimoda et al, 1993).* En effet lorsque ChvE est en complexe avec un sucre, il interagit avec VirA. Cette interaction augmente la sensibilté de VirA aux composés phénoliques, facilitant ainsi l'activation de VirA qui va à son tour activer VirG. Permettant ainsi à VirG de se fixer sur les séquences promotrices des gènes *vir* et d'activer leur transcription *(Jin et al, 1990 ; Brencic et Winans, 2005).*

7.3.4. PBP impliquées dans la réponse au stress oxydatif

En réponse à l'infection de la plante par les bactéries, la plante génère et accumule des espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène, ion superoxyde) *(Wojtaszek, 1997).* Pour pouvoir survivre *A. tumefaciens* a mis en place un système de défense antioxydant dans lequel interviennent plusieurs PBPs : Atu0202, Atu4022 et Atu3391. Ces PBPs participent au transport et à la régulation de l'homéostasie du fer chez *A. tumefaciens (Ngok-Ngam et al, 2009).*

Références bibliographiques

Ames GF. (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. Annu Rev Biochem. 55, 397-425.

Ashby AM., Watson MD., Loake GJ., and Shaw CH. (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, 4181–4187.

Backert S., and Meyer TF. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 9, 207-217.

Ballas N., and Citovsky V. (1997) Nuclear localization signal binding protein from Arabidopsis mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 20, 10723-10728.

Beck von Bodman S., Hayman GT., and Farrand SK. (1992). Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 643–647.

Beijerinck MW., and Delden V. (1902) Abteilung II. 9, 3-43.

Beneddra T., Picard C., Petit A., and Nesme X. (1996) Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. Phythopathology 86, 225-231.

Berntsson RP., Smits SH., Schmitt L., Slotboom DJ., and Poolman B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. FEBS Lett., 12, 2606-2617.

Blanc E., Roversi P., Vonrhein C., Flensburg C., Lea SM., Bricogne G. (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 2210-2221.

Bouzar H., and Jones JB. (2001) *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of Ficus benjamina. Int J Syst Evol Microbiol. 51, 1023-1026.

Brencic A., and Winans SC. (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 69, 155-194.

Brunaud V ., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., and Lecharny A. (2002) T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. EMBO Rep. 3, 1152-1157.

Cangelosi GA., Hung L., Puvanesarajah V., Stacey G., Ozga DA., Leigh JA., and Nester EW. (1987) Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. J Bacteriol. 169, 2086-2091.

Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson TJ., Higgins DG., and Thompson JD. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 31, 3497-3500.

Chilton MD., Drummond MH., Merio DJ., Sciaky D., Montoya AL., Gordon MP., and Nester EW. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell. 11, 263-271.

Chilton MD., and Que Q. (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, 956-965.

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

Conn H.J. (1942) Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bact. 44, 353-360.

Costechareyre D ., Rhouma A., Lavire C., Portier P., Chapulliot D., Bertolla F., Boubaker A., Dessaux Y., and Nesme X. (2010) Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by recA allele analysis: *Agrobacterium* recA diversity. Microb Ecol. 60, 862-872.

Cowtan K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 62, 1002-1011.

Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. and McPherson, A. (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. Acta Cryst.D. 50, 414-423.

Dean M., Rzhetsky A., and Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res. 11, 1156-1166.

De Buck S., Jacobs A., Van Montagu M., and Depicker A. (1999) TheDNAsequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. Plant J. 20, 295-304.

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

De Neve M., De Buck S., Jacobs A., Van Montagu M., and Depicker A. (1997) T-DNA integration patterns in cotransformed plant cells suggest thatT-DNA repeats originate from cointegration of separate T-DNAs. Plant J. 11, 15-29.

Dessaux Y., Guyon P., Petit A., Tempé J., Demarez M., Legrain C., Tate ME., and Farrand SK. (1988) Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation. J Bacteriol. 170, 2939-2946.

Dessaux Y., Petit A., and Tempe J. (1992) Opines in *Agrobacterium* biology. Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions, 109–136.

Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., and Hirt H. (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. Science. 318, 453–456.

Dong J.,Yang G., and McHaourab HS. (2005) Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. Science. 308, 1023-1028.

Doublie S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. Methods Enzymol. 276, 523-530.

Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee CW., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., and Deeken R. (2007) A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on Arabidopsis. Plant Physiol. 145, 853-862.

Ellis JG., Kerr A., Tempé J., and Petit A. (1979) Arginine catabolism: a new function of both octopine and nopaline Ti-plasmids of *Agrobacterium*. Mol Gen Genet. 173, 263-269.

Emsley P., Lohkamp B., and Scott WG., and Cowtan K. (2010) Features and Development of Coot. Acta Cryst D. 66, 486-501.

Felder CB., Graul RC., Lee AY., Merkle HP., and Sadee W. (1999) The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. AAPS PharmSci. 2, 7-26.

Filichkin SA., and Gelvin SB. (1993) Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. Mol Microbiol. 8, 915-926.

Fuqua WC., Winans SC., and Greenberg EP. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol. 176, 269-275.

Fuqua C., Burbea M., and Winans SC. (1995) Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J.Bacteriol*. 177, 1367-1373.

Fuqua C., and Winans SC. (1996) Localization of OccR-activated andTraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10. Mol. Microbiol. 20, 1199-1210.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel RD., and Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607.

Gelvin SB. (1998) *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. J Bacteriol. 180, 4300-4302.

Gelvin SB. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiol Mol Biol Rev. 67, 16-37.

Gill SC., and von Hippel PH. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem. 182, 319-326.

Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N., Blanchard M., Qurollo B., Goldman BS., Cao Y., Askenazi M., Halling C., Mullin L., Houmiel K., Gordon J., Vaudin M., Iartchouk O., Epp A., Liu F., Wollam C., Allinger M., Doughty D., Scott C., Lappas C., Markelz B., Flanagan C., Crowell C., Gurson J., Lomo C., Sear C., Strub G., Cielo C., and Slater S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. 294, 2323-2328.

Gouet P., Robert X., and Courcelle E. (2003). ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. Nucleic Acids Res. 31, 3320-3323.

Guyon P., Chilton MD., Petit A., and Tempe J. (1980) Agropine in "nulltype" crown gall tumors : evidence for generality of the opine concept. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 2693–2697.

Haudecoeur E., Planamente S., Cirou A., Tannières M., Shelp BJ., Moréra S., and Faure D. (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 14587-14592.

Hwang I., Li PL., Zhang L., Piper KR., and Cook DM. (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165-199.

Hwang I., Cook DM ., and Farrand SK. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. J Bacteriol. 177, 449-458.

Hwang HH., and Gelvin SB. (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. Plant Cell. 16, 3148-3167.

Hildebrand EM. (1940) Cane gall of brambles caused by *Phytomonas n. sp*. J. Agric. Res. 61, 685-696.

Jancarik J., and Kim SH. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. Journal of Applied Crystallography. 24, 409-411.

Jin SG., Prusti RK., Roitsch T., Ankenbauer RG., and Nester EW. (1990) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. J Bacteriol. 172, 4945-4950.

Jones DT. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J Mol Biol. 292, 195-202.

Kabsch W. (2010). "Xds." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 66, 125-132.

Karpowich NK., Huang HH., Smith PC., and Hunt JF. (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, 8429-8434.

Krizkova L., and Hrouda M. (1998) Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J*. 16, 673-80.

Kersters K., and De Ley J. (1984) Genus III. *Agrobacterium.* Conn. 1942. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 1, 244-254.

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

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lever JE. (1972) Quantitative assay of the binding of small molecules to protein: comparison of dialysis and membrane filter assays. Anal Biochem. 50, 73-83.

Li PL., Everhart DM., and Farrand SK. (1998) Genetic and sequence analysis of the pTiC58 trb locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. J Bacteriol. 180, 6164-6172.

Li Y., Rosso MG., Ulker B., and Weisshaar B. (2006) Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in Arabidopsis thaliana reveals special features of genes without insertions. Genomics. 87, 645-652.

Luo ZQ., Qin Y., and Farrand SK. (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. J Biol Chem. 275, 7713-7722.

Matthews BW. (1968) Solvent content of protein crystals. J Mol Biol. 33, 491-497.

McCoy AJ., Grosse-Kunstleve RW., Adams PD., Winn MD., Storoni LC., and Read RJ. (2007) *Phaser* crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658-674.

Mc Pherson A. (1989) Preparation and analysis of protein crystals. 2nd ed. Krieger, Malabar, Fla.

McPherson A. (1992) Two approaches to the rapid screening of crystallization conditions. J Cryst Growth. 122, 161-167.

Montoya AL., Chilton MD., Gordon MP., Sciaky D., and Nester EW. (1977) Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells : role of plasmid genes. J. Bacteriol. **129**, 101–107.

Murshudov GN., Vagin AA., and Dodson, EJ. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. Acta Cryst D. 53, 240-253.

Nealson KH., Platt T., and Hastings JW. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J Bacteriol. 104, 313-322.

Nealson KH., and Hastings JW. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol Rev. 43, 496-518.

Newcomer ME., Lewis BA., and Quiocho FA. (1981) The radius of gyration of L-arabinose-binding protein decreases upon binding of ligand. J Biol Chem. 256, 13218-13222.

Ngok-Ngam P., Ruangkiattikul N., Mahavihakanont A., Virgem SS., Sukchawalit R., and Mongkolsuk S. (2009) Roles of *Agrobacterium tumefaciens* RirA in iron regulation, oxidative stress response, and virulence. J Bacteriol. 191, 2083-2090.

Nikaido K.**, and Ames** GF.(1992) Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem. 267, 20706-20712.

Ogawa Y., and Mii M. (2005) Evaluation of 12 beta-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. Plant Cell Rep. 23, 736-743.

Oh BH., Pandit J., Kang CH., Nikaido K., Gokcen S., Ames GF., and Kim SH. (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. J.Biol.Chem. 268, 11348-11355.

Oh B.H., Ames G.F., and Kim S.H. (1994) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. J.Biol.Chem. 269, 26323-26330.

Ophel K. , and Kerr A. (1990) *Agrobacterium vitis sp.* no. For strain of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. Int. J. Syst. Bacteriol . 40, 236-241.

Pappas KM., and Winans SC. (2003) The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid repABC operon. Mol Microbiol. 49, 441-455.

Pappas KM. (2008) Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. Plasmid. 60, 89-107.

Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J., and Morel, G. (1970). Recherche sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol. Vég.* 8, 205.

Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., and Tempé, J. (1983). Further
extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol.Gen. Genet.* 190, 204-214.

Petit A., and Tempe J. (1984) The function of T-DNA in nature. *In* L. van Floten-Doting, G. P. S. Groot, and T. C. Hall (ed.), Molecular form and function of the plant genome. Plenum Press, New York, N.Y. p. 625–636

Pionnat S., Keller H., Hériche D., Bettachini A., Dessaux Y., Nesme X., and Poncet C. (1999) Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated an outspread of crown gall disease in Mediterranean countries. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4197-4206.

Piper KR., Beck von Bodman S., and Farrand SK. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature. 362, 448-450.

Pitzschke A., Schikora A., and Hirt H. (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. Curr Opin Plant Biol. 4, 421-426.

Pitzschke A., and Hirt H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. EMBO J. 6, 1021-1032.

Popoff M.Y., Kersters K., Kiredjian M., Miras I., and Coynault C. (1984) Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin. Ann. Microbiol. 135a, 427-442.

Prilusky J., Felder CE., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg EH., Man O., Beckmann JS., Silman I., and Sussman JL. (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. Bioinformatics. 21, 3435-3438.

Quiocho FA., Phillips GN Jr., Parsons RG., and Hogg RW. (1974) Crystallographic data of an L-arabinose-binding protein from Escherichia coli. J Mol Biol. 86, 491-493.

Quiocho FA. (1991). Atomic structures and function of periplasmic receptors for active transport and chemotaxis. Curr. Opin. Struct. Biol. 1, 922-933.

Quiocho FA., and Ledvina PS. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. Mol. Microbiol. 20, 17-25.

Ramakrishnan C., and Ramachandran GN. (1965) Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformation. Biophys. J., 5, 909-933.

Riker A.J., Banfield W., Wright W., Keitt G., and Sagen K. (1930) J. Agric. Res. 41, 887.

Salman H., Abu-Arish A., Oliel S., Loyter A., Klafter J., Granel R., and Elbaum M. (2005) Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules. Biophys J. 89, 2134-2145.

Sheldrick GM. (2008). A short history of SHELX. Acta Crystallogr A. 64, 112-122.

Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Aoki S., and Machida Y. (1993) Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. J Biol Chem. 268, 26552-26558.

Slightom JL ., Durand-Tardif M., Jouanin L., and Tepfer D. (1986) Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium* rhizogenes agropine type plasmid. Identification of open reading frames. J Biol Chem. 261, 108-121.

Smith EF., and Townsend CO. (1907) A plant-tumor of bacterial origin. Science. 25, 671-673.

Stachel SE, and Zambryski PC. (1986) virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell. 46, 325-333.

Szabados L ., Kovács I., Oberschall A., Abrahám E., Kerekes I., Zsigmond L., Nagy R., Alvarado M., Krasovskaja I., Gál M., Berente A., Rédei GP., Haim AB., and Koncz C. (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. Plant J. 32, 233-242.

Tam R., and Saier MH. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. Microbiol. Rev. 57, 320-346.

Tempe J., Guyon P., Tepfer D., and Petit A. (1979) The role of opines in the ecology of the Ti-plasmids of *Agrobacterium. In* K. N. Timmis and A. Puhler (ed.), Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York. p. 353–363.

Terwilliger TC. (2000). Maximum-likelihood density modification. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 56, 965-972.

Tinland B., and Hohn B. (1995) Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet. Eng.* 17, 209-229.

Thompson JD., Higgins DG., and Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680.

Toyoda-Yamamoto A.., Shimoda N, and Machida Y. (2000) Genetic analysis of the signal-sensing region of the histidine protein kinase VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet. 263, 939-947.

Tzfira T., Li J., Lacroix B., and Citovsky V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet*. 20, 375-383.

Tzfira T., and Citovsky V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 17, 147-154.

Ullrich CI., and Aloni R. (2000)Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. J Exp Bot. 51, 1951-1960.

Uversky VN., Gillespie JR., and Fink AL. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? Proteins. 41, 415-427.

Valdivia RH., Wang L., and Winans SC. (1991) Characterization of a putative periplasmic transport system for octopine accumulation encoded by *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6. J. Bacteriol. 173, 6398-6405.

Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort RA., and Schell J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature. 252, 169-170.

Veluthambi K.,Krishnan M., Gould JH., Smith RH., and Gelvin SB. (1989) Opines stimulate induction of the vir genes of the *Agrobacterium* tumefaciens Ti plasmid. J Bacteriol. 171, 3696–3703.

Vergunst AC., Schrammeijer B., den Dulk-Ras A., de Vlaam CMT., Regensburg-Tuink TJ., and Hooykaas PJJ. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. Science. 290, 979-982.

Veselov D., Langhans M., Hartung W., Aloni R., Feussner I., Götz C., Veselova S., Schlomski S., Dickler C., Bächmann K., and Ullrich CI.(2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. Planta. 216, 512-522.

Wächter R., Langhans M., Aloni R., Götz S., Weilmünster A., Koops A., Temguia L., Mistrik I., Pavlovkin J., Rascher U., Schwalm K., Koch KE., and Ullrich CI. (2003) Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 133, 1024-1037.

Wagner VT. , and Matthysse AG. (1992) Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. J Bacteriol. 174, 5999-6003.

Ward JJ., Sodhi JS., McGuffin LJ., Buxton BF., and Jones DT. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. Journal of Molecular Biology. 337, 635-645.

Waters CM., and Bassler BL. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 21, 319-346.

White CE ., and Winans SC. (2007) The quorum-sensing transcription factor TraR decodes its DNA binding site by direct contacts with DNA bases and by detection of DNA flexibility. Mol Microbiol. 64, 245-256.

Wiseman T., Williston S., Brandts JF., and Lin LN. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. Anal Biochem. 179, 131-137.

Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J. 322, 681-692.

Wood DW., Setubal JC., Kaul R., Monks DE., Kitajima JP., Okura VK., Zhou Y., Chen L., Wood GE., Almeida NF Jr., Woo L., Chen Y., Paulsen IT., Eisen JA., Karp PD., Bovee D Sr., Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Kutyavin T., Levy R., Li MJ., McClelland E., Palmieri A, Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao ZY., Dolan M., Chumley F., Tingey SV., Tomb JF., Gordon MP., Olson MV., and Nester EW. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. 294, 2317-2323.

Yao N., Trakhanov S., and Quiocho FA. (1994) Refined 1.89-A structure of the histidine-binding protein complexed with histidine and its relationship with many other active transport/chemosensory proteins. Biochemistry. 33, 4769-4779.

Zanker H., von Lintig J., and Schröder J. (1992) Opine transport genes in the octopine (occ) and nopaline (noc) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 174, 841-849.

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

Zhang L., Murphy PJ., Kerr A., and Tate ME. (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 362, 446–448.

Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones JD., Boller T., and Felix G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. Cell. 125, 749-760.