



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Microbiologie

Microorganismes : du génome aux interactions avec l'hôte

Présentée et soutenue par :

Laure PLENER

le : 16 Novembre 2010

Titre :

Etude des mécanismes d'activation transcriptionnelle des gènes de virulence
et des fonctions d'adaptation in planta chez la bactérie *Ralstonia*
solanacearum

JURY

Eric CASCALES, Chargé de Recherche, CNRS, Marseille, Rapporteur

Ralf KOEBNIK, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, Rapporteur

Marc VALLS, Professeur de l'Université de Barcelone, Barcelone, Examineur

Matthieu ARLAT, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, Examineur

Stéphane GENIN, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse, Directeur de Thèse

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM) - UMR CNRS-INRA 2594/441

Directeur(s) de Thèse :

Stéphane GENIN

Rapporteurs :

Eric CASCALES et Ralf KOEBNIK

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Et plus particulièrement, je remercie...

...Stéphane, pour m'avoir accueillie dans ton équipe et pour m'avoir encadrée pendant ces 3 années de thèse. J'ai appris énormément pendant ces 3 années aussi bien au niveau scientifique qu'au niveau humain. Même si tu ne m'as pas encore transformée en une optimiste convaincue, tu m'as appris à persévérer et toujours tenter ma chance et surtout : tout donner et ne rien lâcher ! Pour toute la liberté que tu m'as accordée, pour toutes les conversations que nous avons eues, pour les lubies verbales sur lesquelles tu as cédées (je maintiens que les réseaux de régulation (qui ne sont pas des embranchements de cascades) ne seront jamais sophistiqués mais élaborés)... Merci ! Et n'oublions pas : Qui aime bien, charrie bien !

...Patrick, pour toute l'aide apportée et les solutions trouvées. Grâce à toi je sais reconnaître Ralsto à l'odeur. Pour ta bonne humeur, ta patience, les stocks secrets de TTC, les dosages luciférase et les p-----s de mutants apha... Merci !

...Philippe, 3 ans de thèse et un stage de master ensemble...on dépasse les 2 000 cafés partagés. 2 000 cafés à discuter de la pluie et du beau temps, à s'interroger, à râler et aussi à rire. Merci de m'avoir laissée repiquer tes arabettes, même si après elles ne poussaient pas... Je n'oublierai jamais que grâce à toi j'ai appris à jouer aux fléchettes (mais pas à gagner) et surtout, j'ai commencé à rédiger ma thèse !

...Alice, car c'est avec toi que j'ai fait mes premiers trajets en vélo le long du canal du Midi et pour toutes les fois où nous avons affronté le vent d'Autan en chanson (ce qui ne nous aidait pas forcément à avancer...). Pour ta bonne humeur et tes codes couleur ; pour les délires partagés et les soirées karaokés ; pour être aussi mauvaise que moi aux fléchettes mais autant aimer la Leffe ; pour les conseils que tu as pu me donner et l'énergie que tu m'as apportée... Merci !

...Laure (la petite) pour ta très forte motivation, ton envie d'aller de l'avant et toute l'aide apportée, les manips réalisées. Je te souhaite bonne chance pour l'avenir, nous sommes sur la même route maintenant !

...Anne-Claire, pour les prots, le chocolat, les discussions de paillasse, la motivation et tout le reste (notamment les cours de waka-waka).

...Christian, Nemo, Fabienne, David, Adriana, Wei, Suvendra, Marie, Lenaick, Pierre Boistard pour tous les moments partagés qu'ils soient scientifiques mais aussi (et surtout) non scientifiques : comment saigner un cochon, comment s'intégrer dans un café philo, comment faire une terrine de ragondin... Et désolée pour avoir chanté faux !

... la Barcelona team : Marc, Montse et Freddy, pour m'avoir accueillie pendant 6 semaines de ma thèse, m'avoir fait découvrir la joie des gels retards (en fait là je ne suis pas sûre de vous remercier), pour m'avoir fait découvrir la vie à Barcelone (là, oui, je veux bien remercier)... Merci !

...ma famille, pour me laisser partir partout et tout le temps mais, en même temps et surtout, être là quand il faut... Pour essayer de comprendre ce qu'est le monde de la recherche. Et surtout merci à Maud et Aline pour la relecture « naïve » de ma thèse (je confirme que, oui, phosphoryller est un verbe).

...le Noyau Dur et ceux qui gravitent autour, parce qu'on se retrouvera toujours et que tous ces week-ends passés ensemble ont été des énormes bulles d'air dans ma thèse. Merci aussi à la SNCF, la carte 12-25 et les trains de nuit...

...mes amis littéraires parce que même si on ne se voit pas souvent nos petits cœurs artichauts de chou-fleur ont besoin d'iambic pentameters surtout lorsque « Tout est chaos, à côté ». Fait ce que doit et advienne que pourra, je sais que toujours vous serez là pour moi !

...tous les gens croisés qui ont rendu cette thèse encore plus heureuse. Ceux de l'équipe et ceux du couloir : ceux qui lèvent les bras pour dire Bonjour, ceux qui sourient, ceux qui ont une blague à raconter (ça dépend de la blague), ceux qui font du vélo et qui réparent les vélos des autres, ceux qui détiennent des conseils et secrets précieux et tous ceux qui rendent la vie au labo plus facile !

...Avec une pensée émue pour toutes les tomates que j'ai pu tuer, j'aurais aimé aussi avoir un phénotype...

LISTE DES ABREVIATIONS

3 OH-PAME	3-hydroxypalmitic acid methyl ester
ACUR	Alternative codon usage region
ADN	Acide déoxy-ribo-nucléique
AHL	<i>N</i> -acyl homoserine lactone
ARN	Acide ribo-nucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Avr	Avirulence
BDB	Banana blood disease bacterium
CFU	Colony forming unit
cv.	cultivar
Da	Dalton
DF	Diffusible factor
DO	Densité optique
DSF	Diffusible signal factor
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EMSA	Electromobility shift assay
EPS	Exopolysaccharides
GFP	Green fluorescent protein
GMP _c	Guanosine monophosphate cyclique
GST	Glutathion <i>S</i> -transferase
HK	Histidine kinase
HR	Hypersensitive response
Hrc	<i>hrp</i> conserved
Hrp	Hypersensitive response and pathogenicity
HTH	Hélice-tour-hélice
IGC	Internal growth curve
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IT	Infection thread
kb	kilobase
Mb	mégabase
ONPG	Orthonitrophényl- β -galactoside
pb	paires de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

Phc	Phenotypic conversion
PES	polyethersulfone
Prh	Plant regulator of <i>hrp</i> genes
pv.	pathovar
RLU	Relative luciferase unit
RR	Response regulator
sp.	species
SAM	S-adénosylméthionine
TBE	Tris Borate EDTA
T3SS	Type III secretion system
TCSTS	Two-component signal transduction system
UDO	Unité de densité optique
UV	Ultra-violets
VHR	Vascular hypersensitive response

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Symptômes causés par différentes bactéries phytopathogènes	6
Figure 2.	Systèmes de sécrétion de type I, II, III, IV et V	9
Figure 3.	Système de sécrétion de type III	10
Figure 4.	Le quorum sensing	14
Figure 5.	Activation du système GacS/GacA chez <i>P. syringae</i>	19
Figure 6.	Régulation globale de la virulence chez <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	21
Figure 7.	Plantes infectées par <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
Figure 8.	Cycle de vie et d'infection de <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
Figure 9.	Arbre phylogénétique du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	25
Figure 10.	Régulation globale de la virulence chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
Figure 11.	Prototypes d'activation des TCSTS	35
Figure 12.	Séquences de reconnaissance des régulateurs OmpR et PhoB	41
Figure 13.	Interactions des régulateurs OmpR et PhoB avec leurs cibles respectives	42
Figure 14.	Schéma des dialogues possibles entre les TCSTS	44
Figure 15.	Mécanismes de limitations des « cross-talks » par activité phosphatase des histidine kinases	46
Figure 16.	Mécanismes de NarQ/NarP et NarQ/NarL, deux systèmes impliqués dans la régulation de la respiration anaérobie chez <i>E. coli</i>	47
Figure 17.	Représentation du cluster de gènes <i>hrp</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i>	49
Figure 18.	Schéma de la cascade Prh d'activation des gènes <i>hrp</i> chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	49
Figure 19.	PrhA est nécessaire à la perception du signal plante mais pas à l'attachement des bactéries à la cellule hôte	51
Figure 20.	Contexte génomique du gène codant pour le régulateur PrhG (<i>rsp1023</i>)	53
Figure 21.	Coupe transversale d'une racine	66
Figure 22.	Schéma récapitulatif des phénotypes de colonisation de différents mutants de la cascade de régulation du SST3.	66
Figure 23.	Mise en place du processus symbiotique	67
Figure 24.	Validation biochimique de certaines fonctions régulées par HrpG	68

Figure 25.	Le régulon spécifique de HrpG est indispensable au pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>	69
Figure 26.	Schéma des boucles de rétro-contrôle positives et négatives sur la régulation de l'expression de <i>hrpB</i>	72
Figure 27.	Rétro-contrôle négatif de l'expression de <i>hrpB</i> en présence de cellules végétales d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
Figure 28.	Reconstitution de l'interaction entre HrpG et le promoteur <i>hrpB</i> chez <i>Escherichia coli</i>	73
Figure 29.	La séquence du promoteur <i>hrpB</i> est fortement conservée au sein du complexe d'espèces de <i>R. solanacearum</i>	76
Figure 30.	La région nucléotidique du promoteur <i>hrpB</i> reconnue par HrpG est située dans un fragment de 83 pb	77
Figure 31.	L'expression des plasmides rapporteurs chez <i>R. solanacearum</i> montre des résultats identiques à ceux obtenus chez <i>E. coli</i>	78
Figure 32.	La duplication dans le promoteur <i>hrpB</i> de la souche Molk2 comprend des résidus nucléotidiques reconnus par HrpG	79
Figure 33.	HrpG et PrhG se lie à un fragment de 140 pb du promoteur <i>hrpB</i>	81
Figure 34.	Les résultats obtenus en gel retard corrélerent avec les résultats précédemment obtenus en co-expression	83
Figure 35.	Positionnement des éléments impliqués dans la reconnaissance du promoteur <i>hrpB</i> par les régulateurs HrpG et PrhG dans le promoteur de <i>hrpB</i> de la souche GMI1000	83
Figure 36.	Etude du motif TTGTT et de son implication dans la reconnaissance du promoteur <i>hrpB</i> par HrpG et PrhG par co-expression chez <i>E. coli</i>	83
Figure 37.	Etude du motif TTGTT et de son implication dans la reconnaissance du promoteur <i>hrpB</i> par PrhG par gel retard	84
Figure 38.	Formule semi-développée de la méthionine	100
Figure 39	Voie de biosynthèse de la méthionine chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> et <i>Escherichia coli</i>	100
Figure 40.	Cycle de la <u>S</u> -adénosylméthionine (SAM)	101
Figure 41.	Identification des gènes impliqués dans la dernière réaction de la biosynthèse de la méthionine chez la souche GMI1000 de <i>Ralstonia solanacearum</i>	104
Figure 42.	Les gènes <i>metE</i> et <i>metHab</i> sont impliqués dans la biosynthèse de la méthionine chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	104

- Figure 43.** L'expression des gènes *metE* et *metHab* est contrôlée par HrpG via MetR chez *Ralstonia solanacearum* en milieu minimum 105
- Figure 44.** Identification de la séquence promotrice reconnue par MetR dans les promoteurs de *metE* et *metHab* 106
- Figure 45.** MetR constitue un nœud de régulation intégrant les signaux perçus par HrpG mais également d'autres signaux tels que l'homocystéine 106
- Figure 46.** Les gènes de biosynthèse de la méthionine sont impliqués dans la mise en place du processus infectieux de *R. solanacearum* 108
- Figure 47.** Croissance *in planta* des mutants dans les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine 109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Exemples non exhaustifs de déterminants de virulence et de leur rôle dans la pathogénie	7
Tableau 2.	Résultats des analyses transcriptomiques pour les gènes <i>metE</i> , <i>metR</i> , le régulateur <i>rsp0983</i> , <i>katE</i> et <i>efe</i>	74
Tableau 3.	Résultats des co-expressions chez <i>E. coli</i> obtenus pour des gènes contrôlés par HrpG selon les analyses transcriptomiques	75
Tableau 4.	Résultats des co-expressions chez <i>E. coli</i> obtenus avec le régulateur PrhG	81
Tableau 5.	Expression des plasmides portant les fusions rapportrices <i>phrpB ::lacZ</i> dans différentes souches de <i>R. solanacearum</i>	86
Tableau 6.	Souches et plasmides utilisés dans le Chapitre II des Résultats	95
Tableau 7.	Amorces utilisées pour générer les différents fragments des promoteurs <i>hrpB</i> , <i>metR</i> , <i>katE</i> , <i>rsp0983</i> , <i>metE</i> et <i>efe</i>	95
Tableau 8.	Identification des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine chez <i>R. solanacearum</i>	104
Tableau 9.	Résultats des analyses transcriptomiques pour les gènes <i>metR</i> , <i>metE</i> , <i>metHa</i> et <i>metHb</i>	105
Tableau 10.	Souches et plasmides utilisés dans le Chapitre III des Résultats	114

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
AVANT-PROPOS	5
INTRODUCTION GENERALE	
CHAPITRE I. LA REGULATION DE LA VIRULENCE CHEZ LES BACTERIES PHYTOPATHOGENES.....	7
1. Les déterminants du pouvoir pathogène bactérien.....	7
1.1 <i>Motilité et attachement.....</i>	7
1.2 <i>Sécrétion d'enzymes, de toxines et d'exopolysaccharides</i>	8
1.3 <i>Injection de protéines effectrices.....</i>	10
1.4 <i>Métabolisme in planta et acquisition du fer.....</i>	11
2. Les différents éléments et mécanismes de régulation de la pathogénie.....	13
2.1 <i>La nécessité d'une régulation coordonnée.....</i>	13
2.2 <i>La communication bactérienne, cœur de la régulation globale de la pathogénie ?</i>	13
2.3 <i>La régulation des gènes du système de sécrétion de type III</i>	15
2.4 <i>Les TCSTS régulateurs de fonctions auxiliaires à la virulence ?</i>	16
3. La régulation chez <i>Pseudomonas syringae</i> : le système à deux composants GacS/GacA.....	18
3.1 <i>Conservation du système GacS/GacA</i>	18
3.2 <i>Mécanismes du système GacS/GacA</i>	19
3.3 <i>Les cibles du système GacS/GacA chez <i>P. syringae</i></i>	19
3.4 <i>Un système conservé avec des rôles différents selon la souche étudiée</i>	21
CHAPITRE II. NOTRE MODELE D'ETUDE : LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	23
1. <i>Ralstonia solanacearum</i> est l'agent causal du flétrissement bactérien.....	23
1.1 <i>Spectre d'hôtes et répartition géographique de <i>Ralstonia solanacearum</i></i>	23

1.2	<i>Cycles de vie de Ralstonia solanacearum</i>	24
1.3	<i>Classification des différentes souches de Ralstonia solanacearum</i>	25
1.4	<i>Caractéristiques génomiques du complexe d'espèces de Ralstonia solanacearum</i>	26
1.5	<i>Conservation génomique des déterminants de virulence chez Ralstonia solanacearum</i>	27
2.	La régulation de la virulence chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
2.1	<i>Le système Phc au cœur de la régulation de l'expression génique de Ralstonia solanacearum</i>	29
2.2	<i>La régulation de la biosynthèse d'exopolysaccharides</i>	31
2.3	<i>La régulation de la biosynthèse d'enzymes pectinolytiques et de la motilité</i>	32
2.4	<i>La régulation de facteurs de colonisation</i>	33
2.5	<i>La régulation du système de sécrétion de type III</i>	34
CHAPITRE III. LES TCSTS : SYSTEMES DE TRANSDUCTION A DEUX COMPOSANTS		35
1.	Structure et fonction des systèmes à deux composants	35
1.1	<i>Mécanismes des systèmes à deux composants : le transfert de groupements phosphoryls</i>	35
1.2	<i>Conservation et distribution génomique des systèmes à deux composants</i>	36
1.3	<i>Structure et fonction des histidine kinases</i>	37
1.4	<i>Structure et fonction des régulateurs RRs</i>	39
1.5	<i>Phosphorylation, dimérisation, oligomérisation et liaison à l'ADN : le cas des régulateurs OmpR et PhoB</i>	41
1.6	<i>Le cas particulier des régulateurs orphelins</i>	42
2.	Les dialogues entre systèmes à deux composants	44
2.1	<i>Les différents types de dialogues impliquant le transfert du groupement phosphoryl</i>	44
2.2	<i>Les mécanismes de limitations des « cross-talks »</i>	45
2.3	<i>Les autres types de dialogues, n'impliquant pas le transfert du groupement phosphoryl</i>	47
 RESULTATS ET DISCUSSION		
CHAPITRE I. CARACTERISATION D'UN NOUVEL ACTIVATEUR TRANSCRIPTIONNEL POSITIF DES GENES DE LA PATHOGENIE CHEZ RALSTONIA SOLANACEARUM		49

1. La régulation transcriptionnelle des gènes associés à la pathogénie.....	49
1.1 <i>La cascade de régulation Prh des gènes de régulation du système de sécrétion de type III.....</i>	49
1.2 <i>Les signaux inducteurs du système de sécrétion de type III et leur intégration dans la cascade Prh</i>	50
2. RESULTATS ET DISCUSSION : Identification d'un nouvel activateur transcriptionnel positif de <i>hrpB</i>	53
3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Vers une approche mécanistique pour comprendre le rôle de PrhG dans la régulation de <i>hrpB</i> chez <i>R. solanacearum</i>.....	63
CHAPITRE II. DETERMINATION DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CIS-REGULATRICE RECONNUE PAR HRPG.....	65
1. HrpG, régulateur central du pouvoir pathogène	65
1.1 <i>Un mutant hrpG est diminué dans sa capacité de colonisation de la plante</i>	65
1.2 <i>HrpG régule des fonctions impliquées dans l'interaction entre la cellule végétale et la bactérie, indépendamment du T3SS.....</i>	66
1.3 <i>HrpG régule des cibles spécifiques impliquées dans la virulence de la bactérie.....</i>	68
2. RESULTATS ET DISCUSSION : Mise en place d'un système d'expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	71
2.1 <i>Nécessité de la mise en place d'un système d'expression hétérologue.....</i>	71
2.2 <i>Mise en place d'un système d'expression hétérologue chez E. coli.....</i>	73
2.3 <i>Utilisation du système d'expression hétérologue pour identifier des cibles directes de HrpG</i>	74
3. Détermination de la région nucléotidique du promoteur de <i>hrpB</i> reconnue par HrpG et PrhG.....	76
3.1 <i>La structure du promoteur hrpB est très conservée au sein du complexe d'espèces R. solanacearum.....</i>	76
3.2 <i>Détermination de la zone du promoteur hrpB impliquée dans l'interaction avec le régulateur HrpG.....</i>	77
3.3 <i>Le régulateur PrhG reconnaît la même région nucléotidique que celle reconnue par HrpG, en co-expression chez E. coli.....</i>	80
3.4 <i>Expériences in vitro et corrélation entre les deux méthodes.....</i>	81
4. Expression des plasmides rapporteurs <i>phrpB::lacZ</i> chez <i>R. solanacearum</i>.....	86

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Compréhension des mécanismes d'activation transcriptionnelle impliquant le régulateur HrpG.....	91
6. MATERIELS ET METHODES	95
6.1 <i>Matériels</i>	95
6.2 <i>Constructions génétiques.....</i>	95
6.3 <i>Mesures d'activité luciférase et β-galactosidase.....</i>	97
6.4 <i>Co-expression chez Escherichia coli</i>	97
6.5 <i>Purification des protéines HrpG et PrhG</i>	98
6.6 <i>Gel retard.....</i>	99
CHAPITRE III. VERS UNE VISION INTEGRATIVE DU CONTROLE DES FONCTIONS DE VIRULENCE ET D'ADAPTATION IN PLANTA.....	100
1. Biosynthèse et rôle de la méthionine	100
1.1 <i>La biosynthèse de la méthionine chez les bactéries.....</i>	100
1.2 <i>La méthionine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires.....</i>	101
2. RESULTATS ET DISCUSSION : La biosynthèse de la méthionine chez <i>Ralstonia solanacearum</i> : une fonction associée au pouvoir pathogène.....	104
2.1 <i>Identification des gènes impliqués dans la biosynthèse de la méthionine chez Ralstonia solanacearum</i>	104
2.2 <i>Les gènes metE et metH sont régulés par HrpG via MetR.....</i>	105
2.3 <i>Implication des gènes metE et metH dans le pouvoir pathogène</i>	108
3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Vers la détermination fonctionnelle du rôle de la méthionine dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>.....	111
4. MATERIELS ET METHODES	114
4.1 <i>Matériels</i>	114
4.2 <i>Constructions génétiques.....</i>	114
4.3 <i>Tests sur plantes.....</i>	115
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	117
BIBLIOGRAPHIE	121

AVANT-PROPOS

Les bactéries sont les êtres vivants les plus simples : des organismes unicellulaires sans noyau, ni organite. Pourtant les bactéries sont les organismes les plus anciens connus à ce jour, prouvant qu'elles ont des capacités inégalables à s'adapter à de nombreux environnements pour survivre et se multiplier. Une bactérie demeurée endormie depuis 250 millions d'années a été découverte par Russell Vreeland de l'Université de West Chester en Pennsylvanie dans un lit de sel à environ 600 mètres sous terre, près de Carlsbad au Nouveau-Mexique. Cette bactérie existait donc au temps des dinosaures (Vreeland *et al.*, 2000)...

Sans le savoir les premières civilisations ont utilisé les bactéries pour produire des boissons alcoolisées, du fromage ou du pain. Aujourd'hui lorsqu'on recherche des traces de vie sur la planète Mars, on recherche la présence de bactéries !

Les bactéries, ainsi que les autres microorganismes, participent à l'équilibre biologique terrestre en colonisant les différents écosystèmes et en y réalisant des réactions chimiques fondamentales impliquées dans les différents cycles des éléments chimiques sur Terre.

Les bactéries sont ubiquitaires et présentes dans tous les biotopes rencontrés sur Terre. Elles peuvent être retrouvées dans le sol, l'air, les eaux douces, salées ou saumâtres, elles sont aussi présentes chez l'homme, les animaux ou les plantes. Certaines bactéries ont développé la capacité de vivre dans des environnements extrêmes : températures très hautes ou très basses, milieux très acides, profondeurs océaniques ou même dans des milieux radioactifs (Fredrickson *et al.*, 2004). Les bactéries constituent la majorité « non visible » de la vie sur terre (Whitman *et al.*, 1998). Il y a environ 40 millions de cellules bactériennes dans un gramme de sol et 1 million de cellules bactériennes dans un millilitre d'eau douce. On estime qu'il y aurait quatre à six quintillions (4×10^{30} à 6×10^{30}) de bactéries vivantes dans le monde, à un instant donné. Les bactéries représentent ainsi une grande partie de la biomasse présente sur terre.

Les bactéries sont donc des organismes omniprésents et extrêmement simples. Malgré cette apparente simplicité les bactéries sont capables d'interagir avec des organismes plus

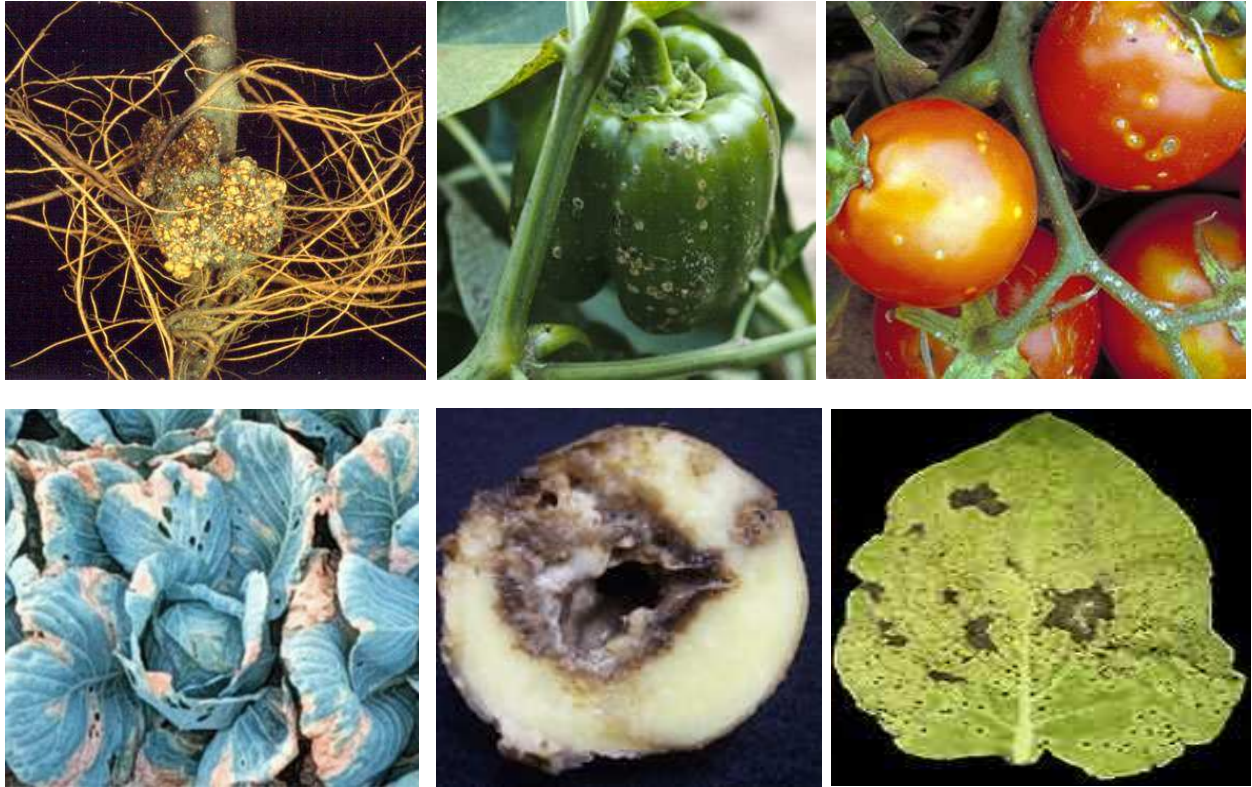


Figure 1. Symptômes causés par différentes bactéries phytopathogènes
(de gauche à droite et de haut en bas)

Symptômes de galle du collet sur pommier provoquée par *Agrobacterium tumefaciens*

Symptômes de tâches bactériennes sur poivron provoquées par *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

Symptômes de chancre bactérien sur tomate provoqué par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Symptômes de pourriture noire sur chou provoquée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Symptômes de pourriture molle sur pomme de terre provoquée par *Pectobacterium carotovora*

Symptômes de moucheture bactérienne sur tabac provoquée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

complexes tels que les animaux ou les plantes. On peut alors distinguer trois grands types d'interaction : le commensalisme, le mutualisme et le parasitisme. Le commensalisme est un type d'interaction fréquent entre deux êtres vivants dans laquelle l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal sans que l'hôte ne bénéficie de cette interaction. Le mutualisme est une interaction entre deux organismes, dans laquelle les deux protagonistes tirent profit de cette relation. Le parasitisme est un mode de vie basé sur l'exploitation du vivant par le vivant. Ce type d'interaction est uniquement profitable au parasite.

Malgré la très grande diversité bactérienne présente sur Terre, environ 100 espèces bactériennes sont des bactéries pathogènes des plantes. Mais les bactérioses dont elles sont responsables sont à l'origine de pertes agronomiques et économiques importantes. Parmi les bactérioses les plus connues et les plus importantes, on trouve : la galle du collet provoquée par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, la tâche bactérienne provoquée par *Xanthomonas axonodopodis* pv. *vesicatoria* (également appelé *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), le chancre bactérien provoqué par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la pourriture noire des crucifères provoquée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, la pourriture molle provoquée par *Dickeya dadantii* (anciennement *Erwinia chrysanthemi*) ou *Pectobacterium carotovora*, la moucheture bactérienne sur la tomate provoquée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ou encore le flétrissement bactérien provoqué par *Ralstonia solanacearum* (Figure 1).

Les bactéries phytopathogènes ont donc des gammes d'hôtes très différentes, certaines bactéries ont une gamme d'hôtes restreinte alors que d'autres ont une gamme d'hôtes très large, c'est le cas de la bactérie *Ralstonia solanacearum* qui peut infecter plus de 200 espèces végétales réparties parmi plus de 50 familles botaniques différentes (Hayward, 1991 ; Hayward, 2000).

En plus d'avoir des hôtes distincts les bactéries ont des modes de vie différents en dehors de leurs cycles infectieux : elles peuvent survivre dans le sol, dans l'eau, à la surface des feuilles ou être transportées par des insectes. Pour répondre à chacune de ces situations les bactéries ont donc développé des mécanismes de perception de leur environnement ainsi que des mécanismes de réponse aux stimuli perçus. C'est ce que nous allons essayer d'explorer dans cette thèse en s'attardant plus particulièrement sur la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* à travers l'étude de la perception de son environnement et de la mise en place du processus infectieux.

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I.

La régulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes peuvent avoir des cycles de vie et des modes infectieux très différents ; cependant elles disposent d'un arsenal commun de déterminants de virulence. Avant d'étudier précisément les mécanismes de régulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes, il est important de déterminer quels sont les déterminants de virulence utilisés par les agents pathogènes et avant tout de définir ce qui est entendu par « déterminants de virulence ». Il est possible de considérer que tous les facteurs non indispensables à la croissance de la bactérie *in vitro* mais nécessaires au pouvoir pathogène ou à la colonisation de la plante et à la croissance *in planta* sont des déterminants de virulence. Les principaux déterminants de virulence identifiés et étudiés sont décrits dans la première partie de ce chapitre et des exemples choisis parmi les mieux caractérisés mais non exhaustifs sont donnés dans le Tableau 1.

1. Les déterminants du pouvoir pathogène bactérien

1.1 *Motilité et attachement*

Avant d'envahir son hôte l'agent pathogène doit se fixer aux cellules végétales de celui-ci, cette première étape du processus infectieux nécessite le déplacement de la bactérie vers un potentiel point d'infection (stomates, blessures, apex racinaires...) puis l'attachement de la bactérie à la cellule végétale. Les déplacements bactériens sont dirigés par chimiotaxie, c'est-à-dire que les bactéries sont attirées par des substances nutritives (sucres, acides aminés, oxygène) et repoussées par des substances nuisibles. La mobilité bactérienne peut faire appel à deux mécanismes distincts : le premier est réalisé par le flagelle, appendice protéique flexible et motorisé (Chevance and Hughes, 2008), c'est la mobilité par

Tableau 1. Exemples non exhaustifs de déterminants de virulence et de leur rôle dans la pathogénie

Déterminant de virulence	Mécanisme	Organisme	Gène / molécule	Rôle / Fonction	Référence
Adhésion Chimiotaxie	Adhésion	<i>Dickeya datantii</i>	<i>hecA</i>	Aggrégation des bactéries Attachement sur feuilles de <i>Nicotiana clevelandii</i> Virulence sur plantule de <i>Nicotiana clevelandii</i>	Rojas <i>et al.</i> , 2002
		<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>XacFhaB</i>	Formation de biofilm Adhésion et attachement à la surface des feuilles	Gottig <i>et al.</i> , 2009
	Type IV	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>pilA, pilD</i>	Pas d'effet sur l'apparition de la maladie Survie et colonisation foliaire en champs	Roine <i>et al.</i> , 1998
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>fimA</i>	Résistance aux UV Aggrégation des bactéries	Ojanen-Reuhs <i>et al.</i> , 1997
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>pilA</i>	Apparition de la maladie Aggrégation des bactéries Transformation naturelle	Kang <i>et al.</i> , 2002
	Aérotaxie	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>aer1, aer2</i>	Localisation des racines de tomate	Yao and Allen, 2007
Enzymes de dégradation de la paroi végétale	Enzymes cellulolytiques	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>egl</i>	Apparition de la maladie sur tomate	Liu <i>et al.</i> , 2005
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>pehA, pehB</i>	Apparition de la maladie sur aubergine	Huang and Allen, 1997
	Enzymes pectinolytiques	<i>Dickeya datantii</i>	<i>peIABCDE</i>	Macération des tissus végétaux Apparition des symptômes de pourriture molle	Hugouvieux-Cotte-Pattat <i>et al.</i> , 1996
Phytotoxines		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>coronatine</i> <i>syringomycine</i> <i>syringopeptine</i>	Formation de pores dans la membrane plasmique des cellules végétales Ouverture des stomates	Bender <i>et al.</i> , 1999
Hormones végétales	éthylène	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	<i>efe</i>	Pas d'effet sur l'apparition de la maladie Multiplication bactérienne chez le soja	Weingart <i>et al.</i> , 2001
Exopolysaccharides		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	xanthane	Virulence et formation de dépôt de callose	Yun <i>et al.</i> , 2006
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	EPSI	Colonisation de la plante Virulence et occlusion des vaisseaux du xylèmes	Schell, 2000
T3SS	Protéines "helper"	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseicola</i>	<i>hrpZ</i>	Formation de pores dans la membrane plasmique des cellules végétales	Lee <i>et al.</i> , 2001
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>popA</i>		Racapé <i>et al.</i> , 2005
	Protéines effectrices		<i>avrBs3</i>	Transcription des gènes de plante Induction de l'hypertrophie des cellules de poivron	Kay <i>et al.</i> , 2007
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>xopD</i>	Répression de l'expression de gènes de plantes impliqués dans la défense et la senescence Sumoylation de protéines de plantes Multiplication bactérienne <i>in planta</i>	Kim <i>et al.</i> , 2008
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>avrPto</i>	Suppression de la défense basale des plantes	Xiang <i>et al.</i> , 2008
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>gala7</i>	Avirulence sur <i>Medicago truncatula</i> Invasion des cellules corticales	Angot <i>et al.</i> , 2006 Turner <i>et al.</i> , 2009
			<i>popP2</i>	Avirulence sur <i>Arabidopsis thaliana</i>	Deslandes <i>et al.</i> , 2003
		Acquisition du fer et métabolisme	Sidérophores	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabacci</i> 6605	<i>pyoverdine</i>
Transporteurs TonB-dépendants	<i>Dickeya datantii</i>		<i>tonB_{ECH}</i>	Apparition et développement des symptômes sur <i>Saintpaulia ionantha</i>	Enard and Expert, 2000
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		TBDR	Transport du fer Transport de carbohydrates végétaux	Blanvillain <i>et al.</i> , 2007
Quorum sensing		<i>Pectobacterium carotovora</i>	OHL	Production d'antibiotiques Régulation de la production d'exoenzymes	Bainton <i>et al.</i> , 1992
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	3 OH PAME		Flavier <i>et al.</i> , 1997
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	DSF DF	Régulation de la production d'exopolysaccharides et d'exoenzymes	He and Zhang, 2008 Poplawsky and Chun, 1997	

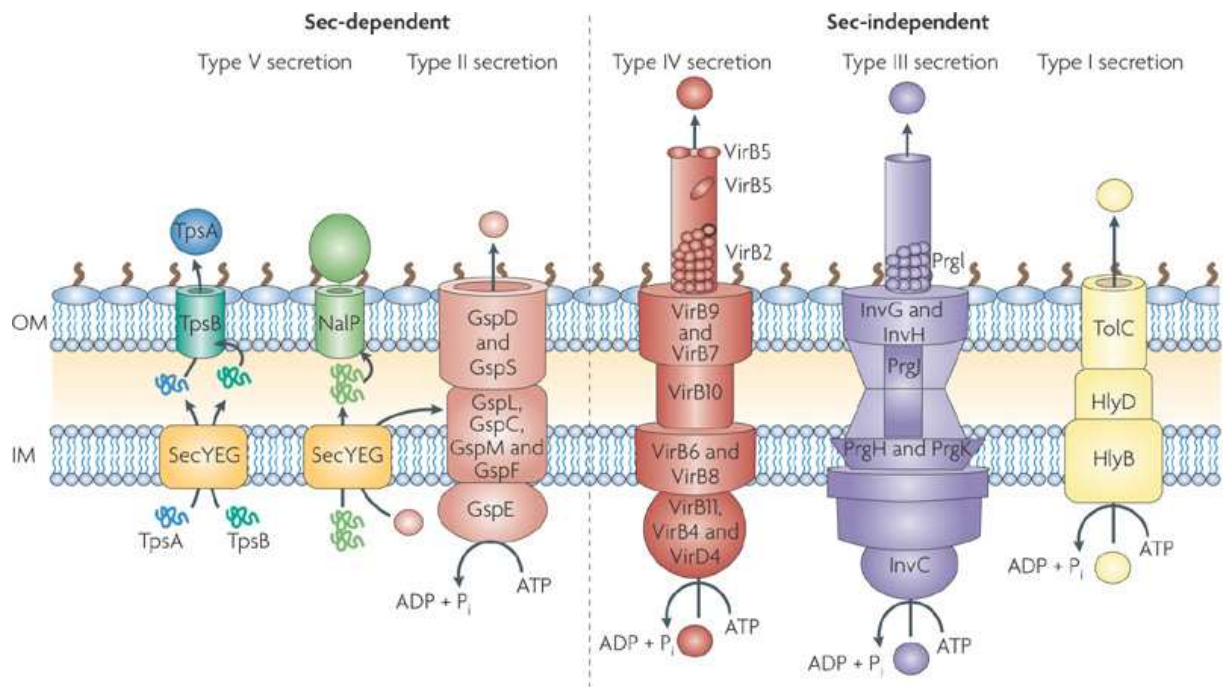
« swarming » ou par « swimming », le second est réalisé par les pili de type IV (Craig and Li, 2008), c'est la mobilité par « twitching ».

Le pilus de type IV est également impliqué dans l'attachement bactérien. Son rôle dans l'attachement a été démontré chez les bactéries pathogènes des animaux telles que chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisserai gonorrhoeae*, *Moraxella bovis*, *Dichelobacter nodosus* ou *Vibrio cholerae* (Strom and Lory, 1993). Concernant les bactéries phytopathogènes, le rôle du pilus de type IV a notamment été étudié chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. Chez *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* le pilus de type IV est impliqué dans l'attachement aux stomates des feuilles de jacinthes (van Doorn et al., 1994). En revanche dans le cas de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, le pilus de type IV ne semble pas être impliqué dans l'attachement aux stomates des feuilles de la tomate mais plutôt dans l'attachement entre bactéries, résultant en la formation d'agrégats qui contribuent à la résistance aux UV (Ojanen-Reuhs et al., 1997).

L'implication du pilus de type IV dans la virulence est donc certain, que ce soit par son rôle de motilité, son rôle d'attachement aux cellules plantes ou son rôle pour l'attachement entre bactéries, provoquant ainsi la formation de microcolonies ou de biofilms. Dans le cas de l'attachement de la bactérie à la cellule plante d'autres molécules sont également impliquées, telles que les adhésines ou les hémagglutinines (Tableau 1). Ces molécules semblent aussi être impliquées dans l'agrégation bactérienne et donc dans l'attachement entre bactéries (Das et al., 2009 ; Gottig et al., 2009).

1.2 Sécrétion d'enzymes, de toxines et d'exopolysaccharides

Lorsque la bactérie a pénétré les tissus de la plante, l'agent pathogène dégrade la paroi des cellules végétales. Cette dégradation va non seulement permettre de libérer des nutriments essentiels à la croissance des bactéries mais aussi permettre une dissémination des agents pathogènes dans les tissus de l'hôte. Cette étape de dégradation de la paroi des cellules végétales a été particulièrement étudiée chez les différentes espèces du genre *Pectobacterium*. Ces bactéries, agents responsables de la pourriture molle, engendrent des symptômes de macération chez leurs plantes hôtes, pour cela elles disposent de tout un arsenal d'enzymes extracellulaires indispensables à la dégradation des sucres et des composants de la paroi des cellules végétales. Ces enzymes (pectine méthylesterases, pectine lyases, polygalacturonases, cellulases et protéases) jouent un rôle collectif et la disruption d'un seul gène codant pour une de ces enzymes a généralement peu ou pas



Nature Reviews | Microbiology

Figure 2. Les différents systèmes impliqués dans la sécrétion de déterminants de la virulence

Le système de sécrétion de type I est un système tripartite impliqué dans le passage de protéines de différentes tailles à travers l'enveloppe des cellules Gram négatives. Il est impliqué dans la sécrétion de protéines de surface, de protéases, de lipases et de toxines.

Le système de sécrétion de type II est une machine à plusieurs composants, utilisant deux étapes pour les mécanismes de translocation. La première étape de la translocation (à travers la membrane interne) se fait par le translocon Sec ou par le système Tat. La deuxième étape (à travers la membrane externe) implique le système de sécrétion de type II. Ce système de sécrétion a pour substrat de nombreuses enzymes extracellulaires de dégradation de la paroi végétale et des toxines.

Le système de sécrétion de type III est également appelé injectisome, il utilise un mécanisme de sécrétion en une seule étape. Il est très conservé chez de nombreuses bactéries pathogènes. Il est composé de plus de 20 protéines différentes.

Le système de sécrétion de type IV sécrète une grande variété de substrats, de simples protéines mais aussi des complexes ADN-protéines. Il est impliqué dans les phénomènes de conjugaison.

Le système de sécrétion de type V fonctionne en deux étapes, la première étape implique le système Sec. Il a pour substrat des protéines d'adhérence, d'auto-aggrégation, d'invasion et de toxicité.

(D'après Fronzes et al, 2009)

d'effet sur le pouvoir pathogène de la bactérie et dépend de la plante hôte étudiée (Tableau 1).

La sécrétion d'enzymes extracellulaires dépend principalement du système de sécrétion de type II mais aussi pour certaines protéases du système de sécrétion de type I (Omori and Idei, 2003 ; Büttner and Bonas, 2010) (Figure 2). Chez *Ralstonia solanacearum*, une étude a montré que la délétion de toutes les enzymes de dégradation de la paroi de la cellule végétale a moins d'effet sur la virulence que la délétion du système de sécrétion de type II (Liu *et al.*, 2005). D'autres enzymes sécrétées par le système de sécrétion de type II et non impliquées dans la dégradation de la paroi de la cellule végétale semblent donc importantes pour la virulence de la bactérie.

Les agents pathogènes sont également capables de produire des toxines nocives pour leurs hôtes. Dans le cas de la phytopathogénie, les phytotoxines les plus étudiées sont celles produites par *Pseudomonas syringae* telles que la coronatine empêchant la fermeture des stomates, points d'infection de la bactérie, ou la syringomycine et la syringopeptine qui forment des pores dans la membrane plasmique des cellules végétales (Bender *et al.*, 1999). Selon la définition des phytotoxines donnée par Durbin en 1991 les hormones végétales produites par les procaryotes pathogènes peuvent également être considérées comme des phytotoxines car elles sont produites par un agent pathogène au cours du processus infectieux et qu'elles ont un effet délétère sur la plante (Durbin, 1991). Ceci est bien établi pour des bactéries tumorigènes et productrices d'auxine telles qu'*Agrobacterium* sp. ou *Pseudomonas savastanoi*. Par ailleurs, plusieurs bactéries telles que *R. solanacearum* ou *P. syringae* produisent de l'éthylène. Cet éthylène bactérien est perçu par la plante et peut moduler l'expression des gènes de l'hôte de la même manière que l'éthylène endogène (Valls *et al.*, 2006).

De nombreuses bactéries phytopathogènes sont capables de sécréter des exopolysaccharides (EPS). Ces EPS jouent un rôle dans la phase de vie saprophyte des bactéries pour les protéger de leur environnement mais ils sont également impliqués dans la virulence de certaines bactéries telles que *R. solanacearum*, *Pantoea stewartii* et *Xanthomonas campestris*. Le rôle des EPS dans la virulence ne réside pas uniquement en l'obstruction des vaisseaux du xylème de la plante, les EPS jouent également un rôle dans la colonisation, l'adhésion et la survie des plantes, notamment en pouvant masquer les bactéries pour empêcher leur reconnaissance par les systèmes de défense de la plante (Saile *et al.*, 1997).

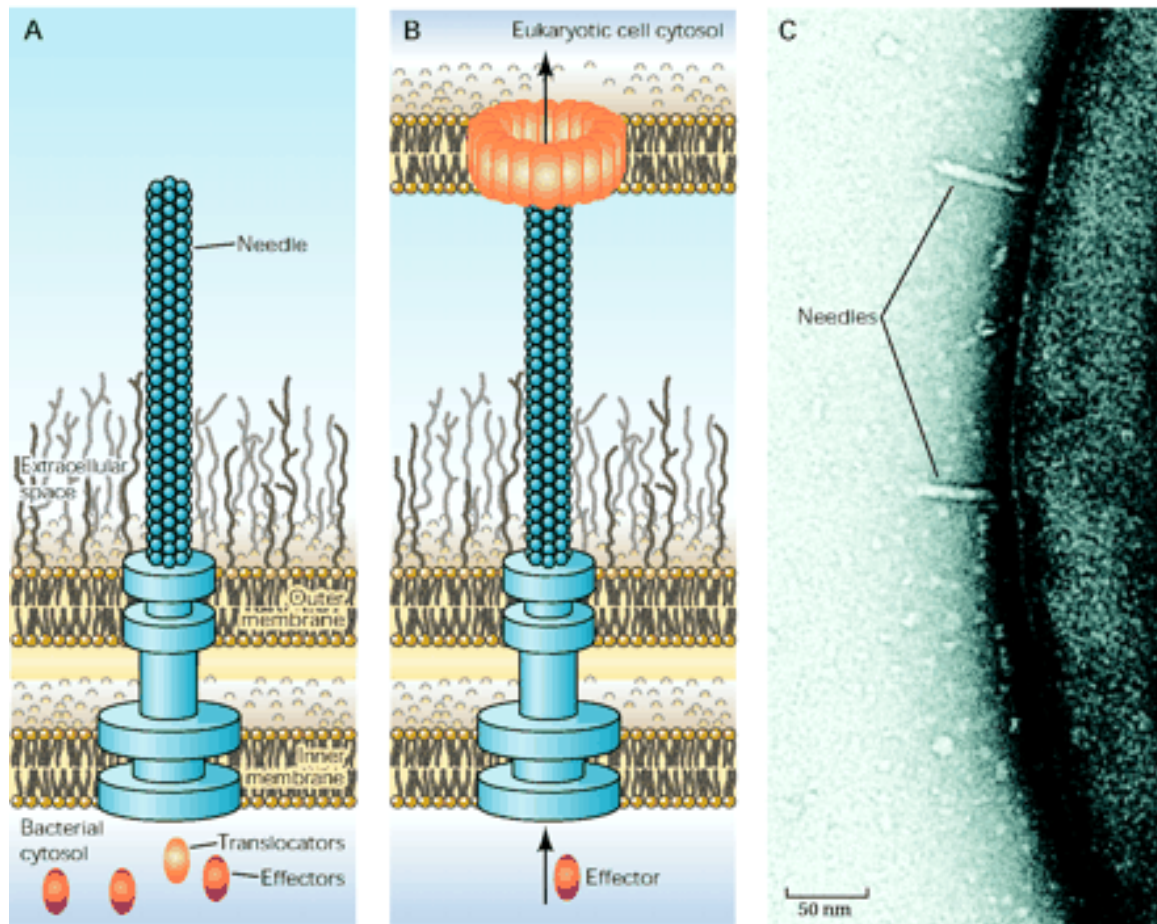


Figure 3. Le système de sécrétion de type III ou injectisome

A : Système de sécrétion de type III au repos avec deux anneaux traversant les membranes bactériennes et la seringue émergeant de la bactérie. Les effecteurs et les protéines du translocon sont conservés dans la cellule. **B** : Système de sécrétion de type III en action. Les protéines de translocation forment un pore dans la membrane cellulaire de l'hôte ; les effecteurs sont transloqués dans le cytosol de la cellule cible. **C** : Surface de *Yersinia enterocolitica* observée en microscopie électronique avec les seringues du système de sécrétion de type III.

(D'après Troisfontaines and Cornelis, 2005)

1.3 Injection de protéines effectrices

Le système de sécrétion de type III ou T3SS (Type Three Secretion System) est un déterminant majeur de la pathogénie (Figure 3). Il est présent chez de nombreux pathogènes animaux tels que *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* et chez les bactéries phytopathogènes telles que les *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* ou *Pantoea* (Cornelis, 2006). Ce système de sécrétion très conservé est codé par les gènes *hrp* pour « hypersensitive response and pathogenicity » chez les bactéries phytopathogènes. En effet une bactérie mutante pour un de ces gènes est incapable de synthétiser le système de sécrétion de type III et ne provoque plus de réponse hypersensible HR sur une plante non hôte, ni la maladie sur une plante hôte.

Deux grands groupes de protéines transitent par le T3SS : les protéines « helper » et les protéines effectrices. Les protéines « helper » ont pour rôle de faciliter la translocation des effecteurs en dégradant de manière localisée la paroi végétale permettant au T3SS d'accéder à la membrane plasmique. Les harpines, des protéines riches en glycine et pauvres en cystéine, inductrices de nécroses de type HR, sont une classe majeure des protéines « helper » (Alfano and Colmer, 2004).

Les protéines effectrices ou effecteurs vont interférer avec certaines fonctions de la cellule eucaryote telles que la réponse basale de l'hôte, les voies de signalisation hormonale de la plante, la résistance non hôte ou la réponse hypersensible (pour revue : Grant *et al.*, 2006 ; Zhou and Chai, 2008). Pour interférer avec ces fonctions certains effecteurs possèdent des domaines ayant des caractéristiques eucaryotes. C'est le cas par exemple de la protéine effectrice AvrPtoB de *Pseudomonas syringae*. Cet effecteur possède des domaines présentant une forte homologie avec des composants des E3 ubiquitines ligases. L'ubiquitination est un processus eucaryote très conservé contrôlant la dégradation des protéines. AvrPtoB présente une activité d'ubiquitine ligase lui permettant d'inhiber la mort cellulaire programmée de la cellule hôte (Janjusevic *et al.*, 2006).

Les répertoires d'effecteurs sont variables d'une espèce bactérienne à une autre, une trentaine d'effecteurs ont par exemple été identifiés chez les bactéries du genre *Xanthomonas* (Kay and Bonas, 2009) alors que la bactérie *Ralstonia solanacearum* en possède 70 à 80 (Poueymiro and Genin, 2009). Généralement la disruption d'un gène d'effecteur n'a que peu ou pas d'effet sur le pouvoir pathogène de la bactérie soulignant la redondance fonctionnelle des effecteurs. Finalement la contribution d'un effecteur dans le pouvoir pathogène bactérien peut varier selon l'hôte étudié, la présence d'un effecteur peut

donc engendrer l'élargissement de la gamme d'hôte d'un pathogène. C'est le cas de la protéine effectrice Gala7 de *R. solanacearum* ; cette protéine fait partie d'une famille de sept effecteurs, les GALA, la mutation de la protéine Gala7 entraîne l'avirulence de la bactérie sur la légumineuse *Medicago truncatula*, alors qu'elle reste pathogène sur d'autres familles botaniques (tomate et *Arabidopsis thaliana*). Le rôle de la protéine Gala7 varie donc selon l'hôte étudié et sa présence est nécessaire à la virulence sur *Medicago truncatula* (Angot *et al.*, 2006).

1.4 Métabolisme in planta et acquisition du fer

Le fer est un élément très important pour toutes les cellules vivantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou des microorganismes. En plus de son rôle nutritionnel essentiel, le fer est également impliqué dans de nombreux processus cellulaires et dans la signalisation moléculaire ; c'est un cofacteur de nombreuses enzymes. Cependant le fer peut se révéler hautement toxique pour la cellule en générant des radicaux libres. Lorsqu'il est présent en excès le fer est stocké dans la cellule sous une forme non toxique appelée ferritine, à l'inverse lorsque la concentration intracellulaire en fer est trop basse la cellule doit activer ses systèmes d'acquisition du fer ou mobiliser le stockage (Expert, 1999).

Dans la nature, le fer est présent en très faible concentration et la forme prédominante est celle de l'ion ferrique qui est fortement insoluble. Pour acquérir ce fer les cellules ont donc dû développer des systèmes de très haute affinité pour capter le fer à l'extérieur de la cellule et l'internaliser dans la cellule. C'est le rôle des sidérophores excrétés par les microorganismes et par quelques types de plantes. Les sidérophores sont des petites molécules de 400 à 1 000 Da capables de complexer le fer ferrique avec une très grande affinité. Chez les bactéries, les complexes fer/sidérophore sont internalisés à travers la membrane externe par des systèmes de transport très spécifiques appelés TonB-dépendants (Braun and Killmann, 1999).

Lors du processus infectieux, la bactérie doit capter le fer présent dans la plante de manière à assurer de nombreuses fonctions biologiques. Le fer étant rare dans les fluides intercellulaires de la plante et essentiel à la bactérie, la mutation des gènes de sidérophores engendre de nombreux effets impliquant des déterminants de virulence (Tableau 1). En dépit de la redondance fonctionnelle forte entre les sidérophores, l'implication de certains sidérophores dans le pouvoir pathogène a été démontrée chez quelques bactéries. Chez *Dickeya datantii*, deux systèmes d'acquisition du fer sont utilisés au cours de l'infection et induits par des faibles concentrations en fer ; l'un est médié par le sidérophore

chrysobactine, l'autre est médié par le sidérophore achromobactine. Ces deux sidérophores sont nécessaires à la réussite du processus infectieux notamment pour la multiplication et la survie bactérienne dans les espaces intercellulaires de l'hôte (Franza *et al.*, 2005). Le rôle des ferritines, molécules de stockage du fer dans la cellule, a également été étudié chez cette bactérie montrant l'implication des ferritines dans la tolérance au stress oxydatif et dans la virulence avec des impacts différents selon l'hôte étudié et la ferritine mutée (Boughammourra *et al.*, 2008). Finalement les transporteurs spécifiques TonB-dépendants sont également impliqués dans le pouvoir pathogène puisqu'ils sont nécessaires au transport des complexes fer/sidérophore. La mutation du gène codant pour un récepteur entraîne un phénotype similaire à celui observé avec le mutant du sidérophore qu'il transporte (Enard and Expert, 2000).

Le rôle des récepteurs TonB-dépendants n'est pas limité au transport des complexes fer/sidérophore. Chez la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* les récepteurs TonB-dépendants sont sur-représentés puisque 72 récepteurs TonB-dépendants ont pu être identifiés chez cette bactérie. Seuls neuf d'entre eux seraient impliqués dans le transport du fer ; les autres auraient un rôle dans le captage et la dégradation de carbohydrates végétaux (Blanvillain *et al.*, 2007).

Au cours du processus infectieux la bactérie doit faire face à un environnement pauvre en nutriment et l'induction des défenses de la plante telles que la production d'espèces réactives de l'oxygène ou de composés phénoliques antimicrobiens rend cet environnement d'autant plus hostile pour la bactérie. Pour assurer le succès du processus infectieux la bactérie doit donc adapter tout son métabolisme aux conditions très particulières rencontrées dans la plante. L'étude des gènes bactériens induits au cours du processus infectieux chez les bactéries *R. solanacearum* et *X. oryzae* pv. *oryzae* montrent que 20% des gènes induits chez *R. solanacearum* et 14% des gènes induits *in planta* chez *X. oryzae* pv. *oryzae* codent pour des fonctions métaboliques ou de transport (Brown and Allen, 2004 ; Soto-Suárez *et al.*, 2010). C'est donc le métabolisme complet de la bactérie qui est mobilisé pour assurer la survie et le développement de la bactérie garantissant la mise en place du processus infectieux.

2. Les différents éléments et mécanismes de régulation de la pathogénie

2.1 *La nécessité d'une régulation coordonnée*

Les agents phytopathogènes survivent dans des environnements divers, non seulement en tant que pathogènes chez leurs hôtes mais aussi comme des organismes épiphytes à la surface des plantes ou des saprophytes dans le sol et l'eau. L'expression des facteurs de virulence et des comportements associés à la virulence doit donc être coordonnée pour équilibrer l'énergie utilisée, la mise en place et le développement de la maladie, l'échappement aux réponses de défense de la plante infectée et la dispersion finale de l'agent pathogène une fois le cycle infectieux terminé.

Les stratégies d'infection des agents phytopathogènes requièrent généralement un changement global dans l'expression des gènes et dans la physiologie bactérienne pour répondre aux divers signaux environnementaux. Ces changements globaux sont coordonnés par des régulateurs globaux de la virulence reposant particulièrement sur la communication entre les cellules.

La comparaison des réseaux de régulation mis en place par différentes bactéries phytopathogènes permet de déterminer quels sont les grands événements et les mécanismes principaux qui conduisent au succès du processus infectieux mais aussi quelles sont les spécificités permettant à chaque agent pathogène d'occuper sa propre niche biologique. En effet, les bactéries phytopathogènes disposent des mêmes outils pour moduler l'expression de leurs gènes, les outils principaux étant les systèmes de régulation à deux composants ou TCSTS (pour *t*wo *c*omponent *s*ignal *t*ransduction *s*ystem), les AraC et les facteurs sigma. Cependant ces mécanismes sont utilisés avec des capacités et à des fins différentes engendrant la spécificité de chaque réseau de régulation.

2.2 *La communication bactérienne, cœur de la régulation globale de la pathogénie ?*

La signalisation AHL, un mécanisme commun entre les espèces

La communication bactérienne contribue à l'adaptation de la bactérie à son environnement : présence ou non de nutriments, présence d'autres agents pathogènes compétiteurs, et contribue donc à réguler l'expression de nombreux déterminants de virulence présentés

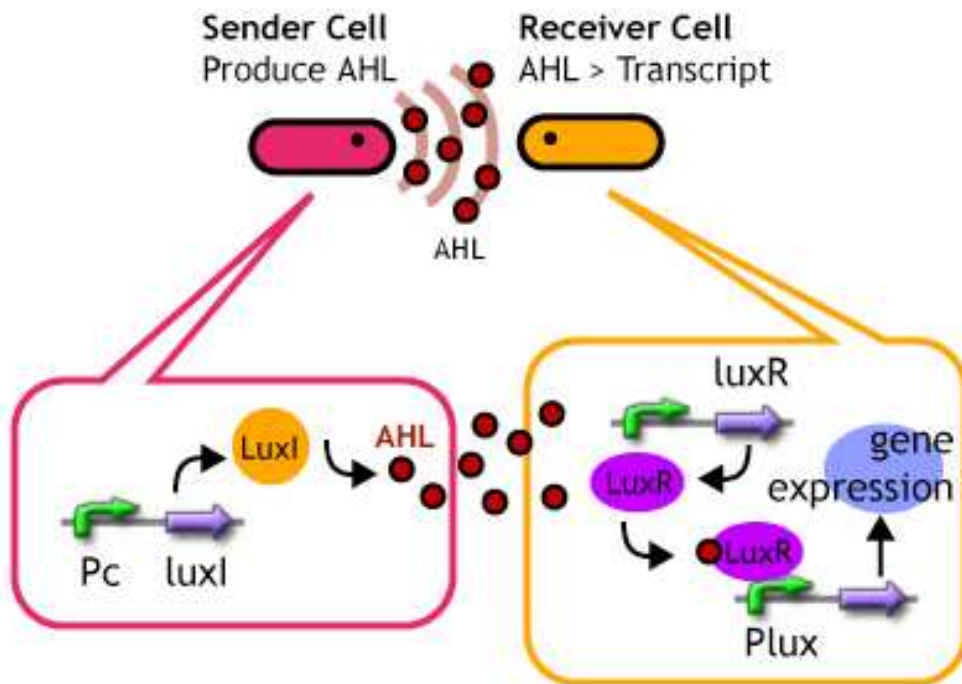


Figure 4. Schéma de mis en place du quorum sensing

Les AHL (acyl homoserine lactones) sont produites par la protéine LuxI, de manière continue et en faible quantité. Les AHL sont libérées dans le milieu extracellulaire. Lorsque la densité bactérienne est élevée dans le milieu, la concentration en AHL atteint le seuil de quorum sensing. Les AHL se fixent sur la protéine régulatrice LuxR engendrant l'activation du régulateur qui va induire l'expression de certains gènes de réponse au quorum sensing.

http://parts.mit.edu/igem07/index.php/Image:Chiba_aboutqs.png

précédemment tels que la synthèse d'EPS et la formation de biofilms, la production d'enzymes de dégradation, la mise en place de flagelles pour la mobilité... La coordination de tous ces facteurs de virulence est nécessaire à la mise en place et au succès du processus infectieux.

Pour communiquer entre elles, les bactéries utilisent des signaux de forme chimique, les auto-inducteurs, qui peuvent induire des changements physiologiques importants. Lorsque la densité de la population bactérienne augmente, la concentration en molécules auto-inductrices atteint et dépasse un seuil critique qui est perçu par les bactéries et engendre des réponses cellulaires spécifiques.

Les *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) et leurs dérivés sont les molécules signal les plus communes chez les bactéries. La génération et la réception du signal de quorum sensing impliquent les gènes *luxI* et *luxR* (Fuqua *et al.*, 1994) (Figure 4). Cette molécule est par exemple utilisée par les bactéries du genre *Pectobacterium* et la perception de cette molécule va induire la production d'antibiotiques. Ces antibiotiques ont pour rôle d'éliminer les bactéries compétitrices sensibles à l'antibiotique, des points d'infection de la plante hôte (Whitehead *et al.*, 2001).

D'autres mécanismes de communication sont propres à chaque espèce

La perception des AHL par les bactéries peut être affectée par des facteurs environnementaux tels que la présence d'autres microorganismes produisant aussi des AHL mais aussi par des métabolites dérivés de la plante. Ces interférences peuvent perturber la communication au sein d'une population bactérienne (Newton and Fray, 2004). C'est pourquoi certaines bactéries ont développé des mécanismes de quorum sensing qui leur sont propres.

Des molécules spécifiques à certaines espèces bactériennes ont été identifiées comme impliquées dans la quorum sensing de certaines bactéries phytopathogènes : le 3-OH PAME, un dérivé d'acide gras, chez *R. solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997) ou les petites molécules DF (Diffusible Factor) et DSF (Diffusible Signal Factor) chez *Xanthomonas campestris* (Poplawsky and Chun, 1997 ; Battler *et al.*, 1997 ; pour revue : He and Zhang, 2008).

La communication bactérienne : des implications différentes dans la régulation globale de la pathogénie selon les bactéries

Chez *R. solanacearum* le système de régulation médié par le 3-OH-PAME coordonne l'expression génique lors de la transition entre le stade saprophyte et le stade infectieux.

Chez *Pectobacterium carotovorum carotovorum* la communication intercellulaire contrôle l'expression du T3SS, la production d'enzymes extracellulaires et d'antibiotiques. Chez *X.c.c.* le signal de quorum sensing, DSF, est perçu par le TCSTS RpfC/G qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la virulence (Slater *et al.*, 2000). Pour ces trois modèles bactériens, la communication bactérienne est donc à l'origine du contrôle des déterminants de la pathogénie.

Chez *P. syringae*, la stratégie est différente et la communication intercellulaire ne semble pas être la première étape dans la hiérarchie de régulation de la virulence. En revanche, c'est le TCSTS GacS/A, régulateur de la virulence, qui contrôle le système de quorum sensing.

Des analyses phylogénétiques ont été menées sur le gène *gacA* qui est présent chez les familles bactériennes *Pseudomonaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Burkholderia* et *Xanthomonas*. 49 séquences ont été étudiées et les analyses montrent que les séquences ADN du gène *gacA* sont phylogénétiquement plus proches entre deux espèces de la même famille qu'elles soient pathogènes ou non qu'entre deux espèces pathogènes de familles différentes (de Souza *et al.*, 2003).

2.3 La régulation des gènes du système de sécrétion de type III

L'expression des gènes du T3SS est contrôlée par des régulateurs de type AraC ou par des facteurs sigma (Tang *et al.*, 2006). Les régulateurs de type AraC sont généralement associés à la régulation du T3SS aussi bien chez les bactéries phytopathogènes que chez les pathogènes des animaux ; et plus particulièrement chez les entérobactéries telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* ou encore *Pseudomonas aeruginosa* (Francis *et al.*, 2002). Les régulateurs de type AraC possèdent deux domaines de liaison à l'ADN mais seul un des deux motifs semble réellement impliqués dans la liaison à l'ADN. Ils possèdent également un motif d'interaction avec l'ARN polymérase pour stimuler la transcription des gènes cibles. Ces deux motifs (interaction à l'ADN et interaction avec l'ARN polymérase) se situent dans une séquence de 99 acides aminés très conservés parmi les différents membres de cette famille. Les régulateurs de type AraC sont également connus pour former des dimères et les promoteurs qu'ils reconnaissent possèdent plusieurs sites de liaison (Gallegos *et al.*, 1997).

Les facteurs sigma sont des facteurs essentiels à l'initiation de la transcription qui dirigent directement l'ARN polymérase vers des promoteurs spécifiques. La substitution d'un facteur

sigma par un autre peut rediriger tout ou partie de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase ; c'est pourquoi les facteurs sigma alternatifs jouent un rôle clé dans la coordination de la transcription des gènes lors de réponses au stress ou de changements morphologiques. Les facteurs sigma à fonction extracytoplasmiques (ECF pour extracytoplasmic function) sont de petites protéines régulatrices qui ont une séquence relativement divergente des autres facteurs sigma. De manière générale, les facteurs sigma ECF sont co-transcrits avec une protéine transmembranaire qui joue un rôle de facteur anti-sigma en se liant au facteur sigma et en empêchant son interaction avec l'ARN polymérase. Suite à un stimulus environnemental précis le facteur sigma est libéré du facteur anti-sigma et peut alors interagir avec l'ARN polymérase pour stimuler la transcription d'un groupe de gènes en réponse au stimulus perçu (Helmann, 2002).

Ces deux systèmes de régulation ont permis de répartir les gènes *hrp* en deux groupes (Alfano and Collmer, 1997). Le groupe I comporte les gènes *hrp* des bactéries du genre *Pectobacterium*, *Pantoea stewartii* et *P. syringae* qui sont régulés par le facteur sigma alternatif HrpL. Chez *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* et *P. syringae*, l'expression de HrpL est modulée par un autre facteur sigma : RpoN (Mole *et al.*, 2007). Le groupe II est formé des gènes *hrp* des bactéries du genre *Xanthomonas* et *R. solanacearum*. Chez *Xanthomonas spp.*, c'est le régulateur HrpX qui contrôle de manière directe l'expression des gènes du T3SS en se fixant au motif nommé plant inducible promoter, boîte PIP (Wengelnik and Bonas, 1996 ; Koebnik *et al.*, 2006). Chez *R. solanacearum* c'est le régulateur HrpB qui contrôle l'expression des gènes du T3SS en reconnaissant la boîte *hrpII*, dont le consensus est commun avec la boîte PIP (Genin *et al.*, 1992 ; Cunnac *et al.*, 2004).

2.4 Les TCSTS régulateurs de fonctions auxiliaires à la virulence ?

Les TCSTS sont composés d'un senseur membranaire percevant un signal environnemental et d'un régulateur cytoplasmique (leur mode de fonctionnement est plus spécifiquement décrit dans le Chapitre 3). Ces systèmes ont pour fonction de transmettre aux régulateurs centraux les informations perçues dans l'environnement et dans certains cas influencent différents aspects de la virulence. Peu de TCSTS jouent des rôles globaux dans la régulation de la virulence, ils sont plus souvent associés à la régulation d'un ou quelques déterminants du pouvoir pathogène. Cependant, certains TCSTS apportent des réponses plus globales aux mécanismes de régulation de la virulence, c'est le cas notamment des TCSTS GacS/A chez *P. syringae* (voir la partie 3 de ce chapitre) et RpfC/G chez *X.c.c.*

Chez *X.c.c.*, le système RpfC/G perçoit le signal de quorum sensing engendrant la dégradation de di-GMP cyclique (Slater *et al.*, 2000). Le di-GMP cyclique est un messager secondaire présent chez de nombreuses bactéries qui contrôle l'amplitude et la chronologie de processus biologiques complexes tels que la formation de biofilms ou la virulence (Römling and Amikam, 2006). Le rôle du di-GMP cyclique dans la régulation et la mise en place du processus infectieux a été très étudié chez les bactéries pathogènes des animaux mais beaucoup moins chez les bactéries phytopathogènes.

Chez *X.c.c.*, l'activation du di-GMP cyclique est impliqué dans la biosynthèse d'EPS, du T3SS et dans la production d'enzymes extracellulaires (Ryan *et al.*, 2007). Chez *Dickeya dadantii*, le di-GMP cyclique joue un rôle global dans la régulation de la pathogénie en contrôlant divers facteurs de virulence tels que la formation de biofilm, la motilité et la production d'enzymes extracellulaires de dégradation de la paroi végétale. De plus, chez cette bactérie, le di-GMP cyclique régule négativement l'expression du T3SS via les facteurs sigmas HrpL et RpoN.

Le di-GMP cyclique est donc certainement impliqué dans la régulation de la virulence d'autres bactéries phytopathogènes. Le niveau de di-GMP cyclique est régulé par des protéines présentant des domaines GGDEF, EAL ou HD-GYP ; ces domaines sont conservés et présents chez de nombreuses bactéries (Galperin *et al.*, 2001). Ces domaines peuvent constituer les domaines effecteurs des régulateurs de réponse des systèmes à deux composants qui seront détaillés dans le chapitre 3.

Ainsi, malgré quelques traits comparables et des outils communs, les bactéries phytopathogènes ont adopté des stratégies de régulation différentes pour mettre en place le processus infectieux et développer la maladie. C'est pourquoi nous ne détaillerons qu'un seul réseau global de régulation par la suite, celui de *P. syringae* ; ce réseau de régulation est très bien documenté et diffère fortement de celui de *R. solanacearum* qui sera également détaillé.

3. La régulation chez *Pseudomonas syringae* : le système à deux composants GacS/GacA

3.1 Conservation du système GacS/GacA

Le système à deux composants GacS/GacA (pour global activator) est présent chez une large variété de bactéries Gram-négatives et a été principalement étudié chez les bactéries entériques et les *Pseudomonas* fluorescents, bactéries racinaires profitables aux plantes. On dénombre près de 20 homologues de ce système (Heeb and Haas, 2001), la plupart d'entre eux ayant été identifiés par le phénotype généré par la mutation du gène *gacA* ou *gacS*. Par exemple, chez les *Pseudomonas* fluorescents, un mutant de ce système perd partiellement ou entièrement ses capacités de biocontrôle qui ont pour rôle de protéger les plantes des champignons pathogènes. Dans le cas des bactéries pathogènes animales ou pathogènes des plantes, un mutant *gacAS* est fortement réduit dans son pouvoir pathogène (pour revue, Heeb and Haas, 2001).

Le point commun des phénotypes induits par une mutation *gacAS* est l'impact sur la synthèse de composés extracellulaires, enzymes ou métabolites secondaires, tels que des composés antimicrobiens contribuant à la protection des plantes colonisées par les *Pseudomonas* fluorescents. D'autres phénotypes de mutants *gacA* ou *gacS* ont pu être observés chez ces bactéries comme chez *Pseudomonas fluorescens* CHA0 dont la motilité et la morphologie sont également modifiées par cette mutation (Duffy and Défago, 2000) suggérant que le système GacS/GacA impacte également sur des composants de surface bactériens.

Concernant *P. syringae*, le premier mutant GacA a été isolé par Willis et ses collaborateurs en 1990 chez *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Le gène identifié avait alors été nommé *lemA* pour lesion manifestation. Le phénotype de ce mutant a la particularité de ne pas provoquer la maladie sur plantes sensibles, mais conserve la capacité d'éluciter la réponse hypersensible sur plantes résistantes et présente une croissance *in planta* chez le haricot comparable à celle d'une souche sauvage. Ces deux dernières caractéristiques diffèrent de ce qui est observé pour des mutants *hrp* dont la croissance *in planta* est affectée et qui ne provoquent plus de réponse hypersensible (Willis *et al.*, 1990). Il est important de noter qu'en revanche, chez la tomate, la croissance *in planta* d'un mutant *gacA* est affectée (Chatterjee *et al.*, 2003).

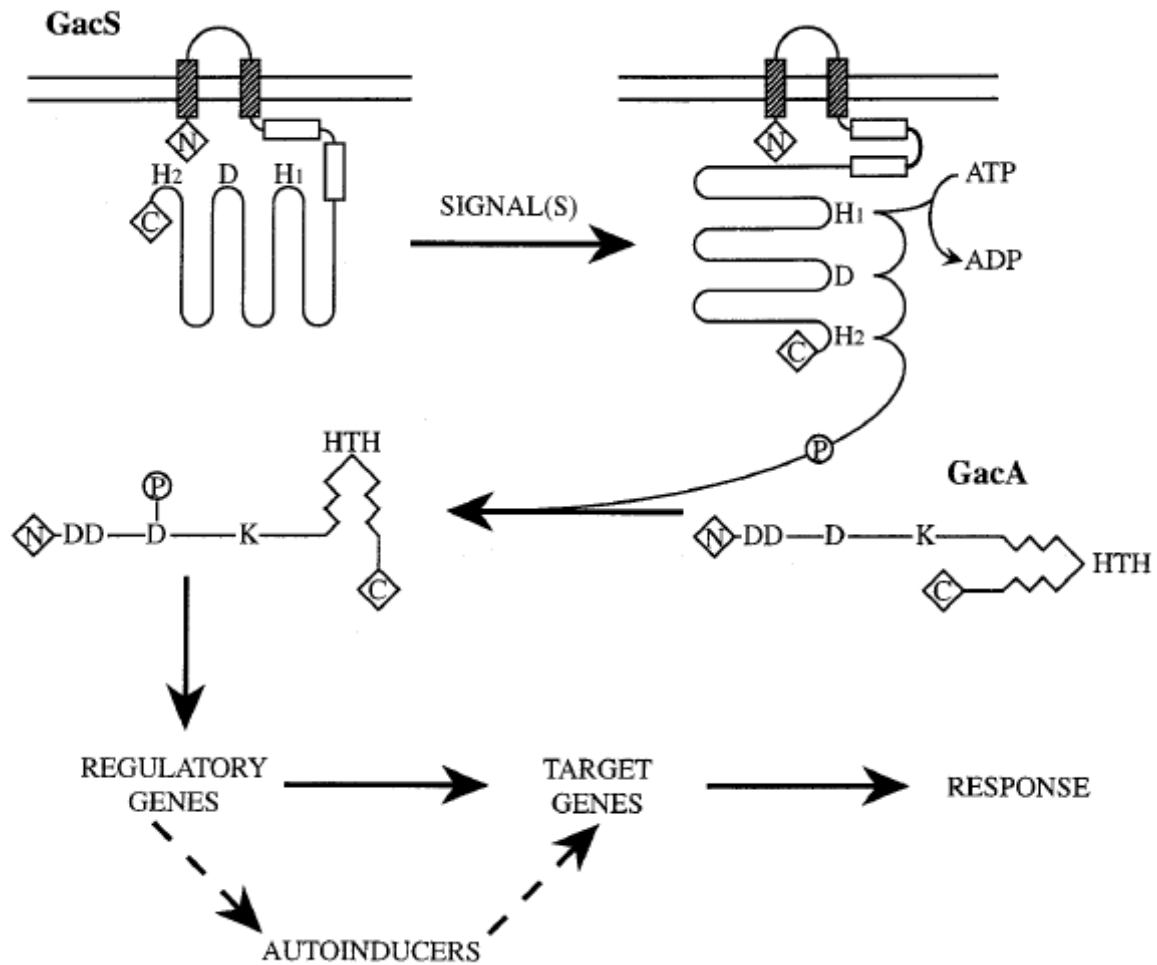


Figure 5. Activation du système GacS/GacA chez *P. syringae*

Modèle de transduction du signal médiée par le TCSTS GacS/GacA. L'autophosphorylation de GacS sur le premier résidu histidine conservé (H₁) est engendrée par un signal inconnu. Un groupement phosphoryl est transféré à des résidus aspartate (D) et histidine (H₂) de gacS par un mécanisme de phospho-relais. Un résidu aspartate conservé de GacA sert d'accepteur final du groupement phosphoryl. Le régulateur GacA phosphorylé active ou réprime la transcription d'un certain nombre de gènes dont des gènes codant pour des régulateurs.

(D'après Heeb and Haas, 2001)

3.2 Mécanismes du système GacS/GacA

GacS est un senseur histidine kinase. La partie N-terminale de la protéine contient le domaine senseur qui consiste en deux segments transmembranaires (Figure 5) séparés par une boucle périplasmique. Lorsqu'un signal particulier est perçu par les domaines transmembranaires de GacS, la protéine est activée et entre dans une nouvelle conformation. Cette conformation permet à la protéine de s'autophosphoryler et de transférer le groupement phosphoryl jusqu'à l'extrémité C-terminale de la protéine qui transmet finalement ce groupement phosphoryl au régulateur GacA (Heeb and Haas, 2001, Figure 5). GacA contient un motif hélice-tour-hélice (HTH) impliqué dans la fixation du régulateur à l'ADN. La séquence reconnue par GacA et l'intégralité des gènes directement contrôlés par ce régulateur ne sont pas connus et la majorité des effets de GacS/GacA sur des gènes cibles semblent être indirects et impliquent des régulateurs intermédiaires (voir partie 3.3). Le stimulus particulier auquel répond le système GacS/GacA n'est pas déterminé précisément. Il a été montré que l'expression de *gacA* chez la souche *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 dépend de la densité bactérienne en milieu riche : l'expression de *gacA* est induite à forte densité bactérienne dans ce milieu. Ce gène est également induit en milieu minimum par rapport au milieu complet (Chatterjee *et al.*, 2003). L'activation du système GacS/GacA a lieu lors du passage de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire, cette activation est inhérente aux mécanismes de phosphorylations successives de GacS et de GacA (Heeb and Haas, 2001). Ce système peut donc être actif en l'absence de cellules hôtes.

3.3 Les cibles du système GacS/GacA chez *P. syringae*

La régulation positive du quorum sensing

Nous avons vu que le système GacS/GacA n'est pas régulé par le quorum sensing de type AHL chez *P. syringae*, contrairement à d'autres modèles de régulation globale chez les bactéries phytopathogènes. Au contraire, c'est le système GacS/GacA qui induit le quorum sensing en régulant de manière positive les gènes de synthèse des *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs).

En effet, un mutant *gacA* de *P. syringae* produit plus de 10 fois moins d'AHL que la souche sauvage. De plus, il a été montré chez cette bactérie que l'expression des gènes impliqués dans la réception de la molécule signal du quorum sensing, *ahlI* et *alhR*, est induite par

GacA (Chatterjee *et al.*, 2003). Cette régulation positive du quorum sensing par GacA a également été montrée chez *Pseudomonas aeruginosa* (Pessi and Haas, 2001).

La régulation positive de gènes de réponse au stress

Le facteur sigma σ^S codé par le gène *rpoS* est un régulateur induit lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance. Ce régulateur est impliqué dans les réponses au stress. Chez *P. syringae*, le gène *rpoS* est induit par GacA (Chatterjee *et al.*, 2003). Les interactions entre la régulation par RpoS et le système GacS/GacA ne sont pas entièrement définies et comprises mais elles confirment le rôle de GacA dans la régulation globale bactérienne.

La régulation positive de gènes impliqués dans la virulence

GacA contrôle de manière positive l'expression de certains déterminants de virulence tels que la production d'alginate, un exopolysaccharide, via *algD*, mais cette production d'alginate n'est pas impliquée dans la virulence de la bactérie (Willis *et al.*, 2001). GacA induit également la motilité par « swarming » (Chatterjee *et al.*, 2003).

GacA régule l'expression d'autres régulateurs qui contrôlent des facteurs de virulence tels que *salA*, *rpoN*, *hrpS/R* et *corR/S*.

- SalA est un régulateur impliqué dans le contrôle de la biosynthèse d'une toxine, la syringomycine, via *syrB*, et qui est impliqué dans la formation de lésions sur haricot. SalA n'a en revanche pas de rôle dans la production de protéases extracellulaires, ni dans la production d'AHL (Kitten *et al.*, 1998 ; Chatterjee *et al.*, 2003).
- Le gène *rpoN* code pour le facteur sigma σ^{54} nécessaire à l'expression de *hrpL*. HrpL est un facteur sigma alternatif responsable de l'activation du système *hrp* mais également d'autres facteurs de virulence tels que la biosynthèse de phytohormones et de phytotoxines (Hendrickson *et al.*, 2000 ; Ferreira *et al.*, 2006).
- Les gènes *hrpR* et *hrpS* constituent un opéron chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ; l'expression de ces deux gènes est fortement diminuée dans un mutant GacA (Chatterjee *et al.*, 2003). Ces deux gènes interagissent pour induire l'expression de *hrpL* (Hutcheson *et al.*, 2001), cependant *hrpL* n'est pas leur seule cible, le régulon dépendant de HrpL constitue uniquement un sous-groupe du régulon de HrpR/HrpS (Lan *et al.*, 2006).
- CorR et CorS sont des membres d'un système à deux composants, impliqués dans le contrôle des gènes de biosynthèse de la coronatine, phytotoxine dont le rôle dans la virulence de *P. syringae* est majeur (Bender *et al.*, 1999). L'expression de ces deux

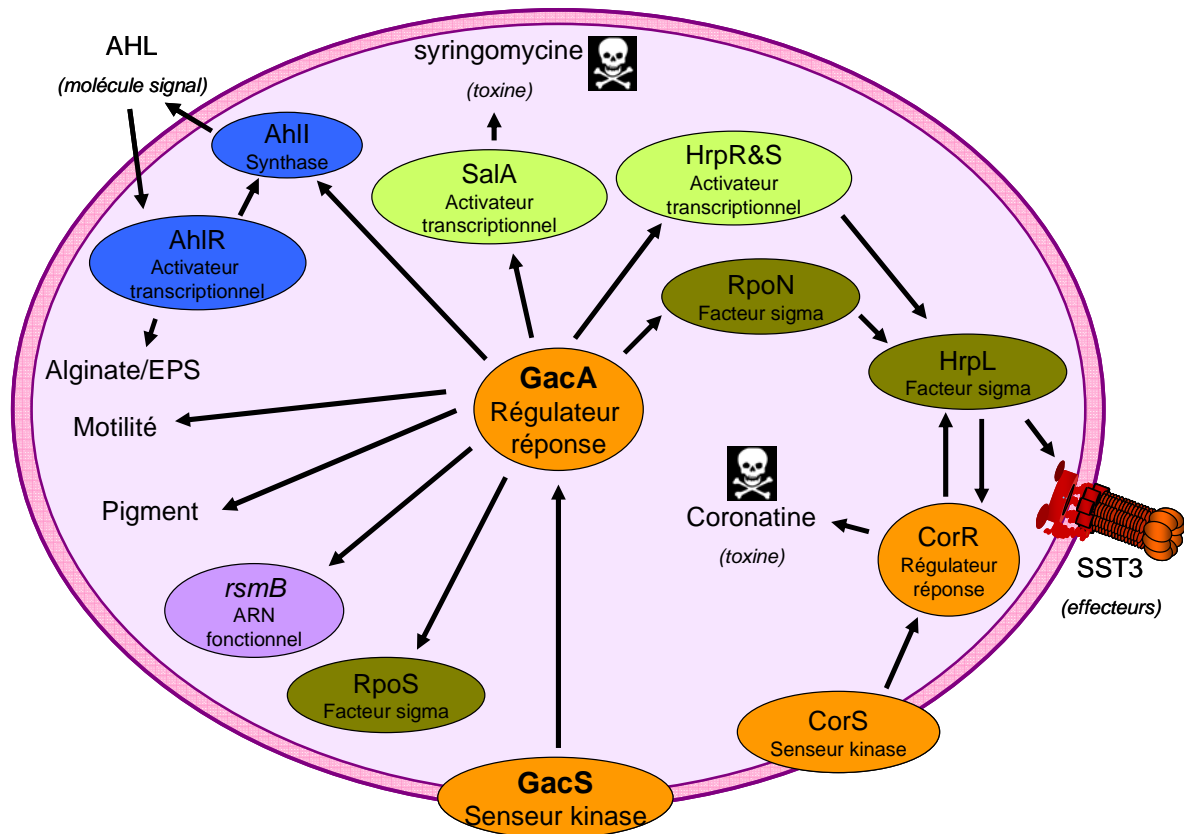


Figure 6. Régulation globale de la virulence chez *P. syringae* pv. *tomato*

Code couleur : bleu = régulateurs liés à la communication intercellulaire, orange = système à deux composants, vert foncé = facteur sigma, vert clair = autres types de régulateur, violet = système de régulation Rsm.

GacA contrôle de manière directe ou indirecte le quorum sensing, la synthèse de phytotoxines (coronatine et syringomycine), le système de sécrétion de type III, la motilité et la production de pigment.

(Adapté de Mole *et al*, 2007)

gènes, *corR* et *corS* est induite par GacA (Chatterjee *et al.*, 2003). Un mutant dans le gène *corR* a un pouvoir pathogène fortement réduit sur tomate. En fait *corR* est une cible directe de HrpL puisqu'on trouve dans son promoteur le motif de reconnaissance par HrpL (Ferreira *et al.*, 2006). De manière assez surprenante un mutant *corR* ne provoque pas de réaction hypersensible sur *Nicotiana benthamiana* ; ce résultat s'explique par le fait que CorR régule également l'expression de *hrpL*, impactant par cet intermédiaire sur l'expression du cluster *hrp* (Sreedharan *et al.*, 2006).

La régulation positive de régulateurs post-transcriptionnels

Chez *Pectobacterium carotovora*, GacA contrôle l'expression de *rsmB* (Chatterjee *et al.*, 2002) et de *rsmZ* chez *P. fluorescens* (Aarons *et al.*, 2000 ; Heeb *et al.*, 2002).

rsmB et *rsmZ*, pour regulator of secondary metabolism, sont des molécules ARN non traduites appartenant au système de régulation post-transcriptionnelle RsmA-*rsmB*. RsmA est une protéine se liant à l'ARN messager de gènes impliqués dans des fonctions de virulence et des fonctions cellulaires en engendrant la dégradation de ceux-ci. *rsmB* se lie à RsmA et empêche la dégradation des ARN messagers cibles de RsmA. Le système Rsm est un système de régulation largement distribué chez les bactéries, laissant entrevoir un rôle commun et central dans la régulation de la virulence (White *et al.*, 1996). Concernant les bactéries phytopathogènes, il a été particulièrement étudié chez *Pectobacterium carotovora* : chez cette espèce bactérienne *rsmB* est induit par GacA (Cui *et al.*, 2001) et RsmA est réprimé par le quorum sensing via RpoS (Mukherjee *et al.*, 1998 ; Cui *et al.*, 2005). Chez *P. syringae* il a également été démontré que GacA induit l'expression de *rsmB*.

Un modèle présentant le système GacS/GacA est illustré par la figure 6.

3.4 Un système conservé avec des rôles différents selon la souche étudiée

Nous avons vu que le système GacS/GacA est très conservé chez de nombreuses espèces bactériennes, qu'elles soient pathogènes ou non, et que dans le cas des bactéries phytopathogènes, ce système contrôle de nombreux éléments qui sont associés voire nécessaires à la virulence. Cependant au sein même de l'espèce bactérienne *P. syringae*, un mutant *gacA* peut avoir différents impacts sur le pouvoir pathogène, selon le pathovar.

Chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, un mutant *gacA* ou *gacS* entraîne une absence de symptômes sur tomate, une croissance *in planta* affectée et une absence d'induction de la réponse hypersensible (Chatterjee *et al.*, 2003). Chez la souche *P. syringae* pv. *phaseolicola*, GacA/GacS est légèrement impliqué dans l'apparition des symptômes et dans la croissance *in planta*, mais aucune implication dans la réponse hypersensible n'a été détectée (Ortiz-Martin *et al.*, 2010).

Chez *P. syringae* pv. *syringae* B728a, le système GacS/GacA est impliqué dans l'apparition de symptômes sur haricot mais pas dans l'induction de la réponse hypersensible ni dans la croissance bactérienne *in planta* (Willis *et al.*, 1990).

Cette différence s'explique par l'effet de GacS/GacA sur la régulation de l'expression de *hrpL*. Chez la souche *P. syringae* pv. *syringae* B728a, le système GacS/GacA ne contrôle pas l'expression de *hrpL* via HrpR et HrpS (Chatterjee *et al.*, 2003) expliquant l'absence de rôle de GacA dans l'induction de la réponse hypersensible chez cette souche. En revanche, nous avons vu que le système GacS/GacA est également impliqué dans le contrôle de l'expression d'autres déterminants de la virulence et notamment les phytotoxines (syringomycine) ; ces autres déterminants de virulence sont impliqués directement dans le pouvoir pathogène de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Heeb and Haas, 2001).

Le système GacS/GacA est donc un système de régulation très sophistiqué. Malgré la très forte conservation du système, ce TCSTS joue un rôle différent dans le pouvoir pathogène de *P. syringae* selon le pathovar étudié.

GacS/GacA a un rôle de régulation globale et contrôle l'expression de nombreux autres régulateurs. Les différences de phénotypes des mutants *gacA* ou *gacS* observées selon le pathovar sont liées à des connexions différentielles entre le système GacS/GacA et les autres réseaux de régulation.



Figure 7. Symptômes de flétrissement bactérien sur différentes plantes hôtes

A. Tomate ; **B.** Aubergine ; **C.** Poivron ; **D.** Tabac ; **E.** Datura ; **F.** Banane ; **G.** Pomme de terre ; **H.** plante modèle *Arabidopsis thaliana* ; **I.** plante modèle *Medicago truncatula*.

CHAPITRE II.

Notre modèle d'étude : la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*

1. *Ralstonia solanacearum* est l'agent causal du flétrissement bactérien

1.1 Spectre d'hôtes et répartition géographique de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum est l'agent pathogène responsable du flétrissement bactérien, l'une des premières bactérioses mondiales (Hayward, 1991). Cette bactérie possède la particularité de pouvoir infecter un large spectre d'hôtes, puisqu'on compte plus de 200 espèces végétales hôtes de *R. solanacearum*, réparties dans 50 familles botaniques différentes. La gamme d'hôtes de *R. solanacearum* comporte des solanacées (tomate, pomme de terre, tabac, aubergine...) mais également des légumineuses (arachide, haricot...), des monocotylédones (bananier, gingembre...) et des arbres et arbustes (mûrier, olivier, manioc, eucalyptus...) (Hayward, 2000). Cette bactérie est donc capable d'infecter de nombreuses plantes ornementales mais aussi des plantes d'intérêt agronomique provoquant des pertes économiques importantes dans les pays touchés (Figure 7).

Les régions touchées par cette bactériose sont les régions tropicales et subtropicales. Récemment des cas d'émergence de flétrissement bactérien sont apparus dans des zones au climat plus tempéré. Des cas sur géranium *Pelargonium zonale* ont été rapportés en 1999 au Royaume-Uni et un peu plus tard en Belgique, Allemagne et aux Pays-Bas. Les plants de géranium infectés étaient originaires du Kenya (Janse *et al.*, 2004). La détection de la bactérie dans les plants importés et infectés n'est pas évidente car l'infection par *R. solanacearum* peut être latente et asymptomatique (Swanson *et al.*, 2004). Le risque principal est que la bactérie et la maladie s'étendent à d'autres cultures telles que la pomme

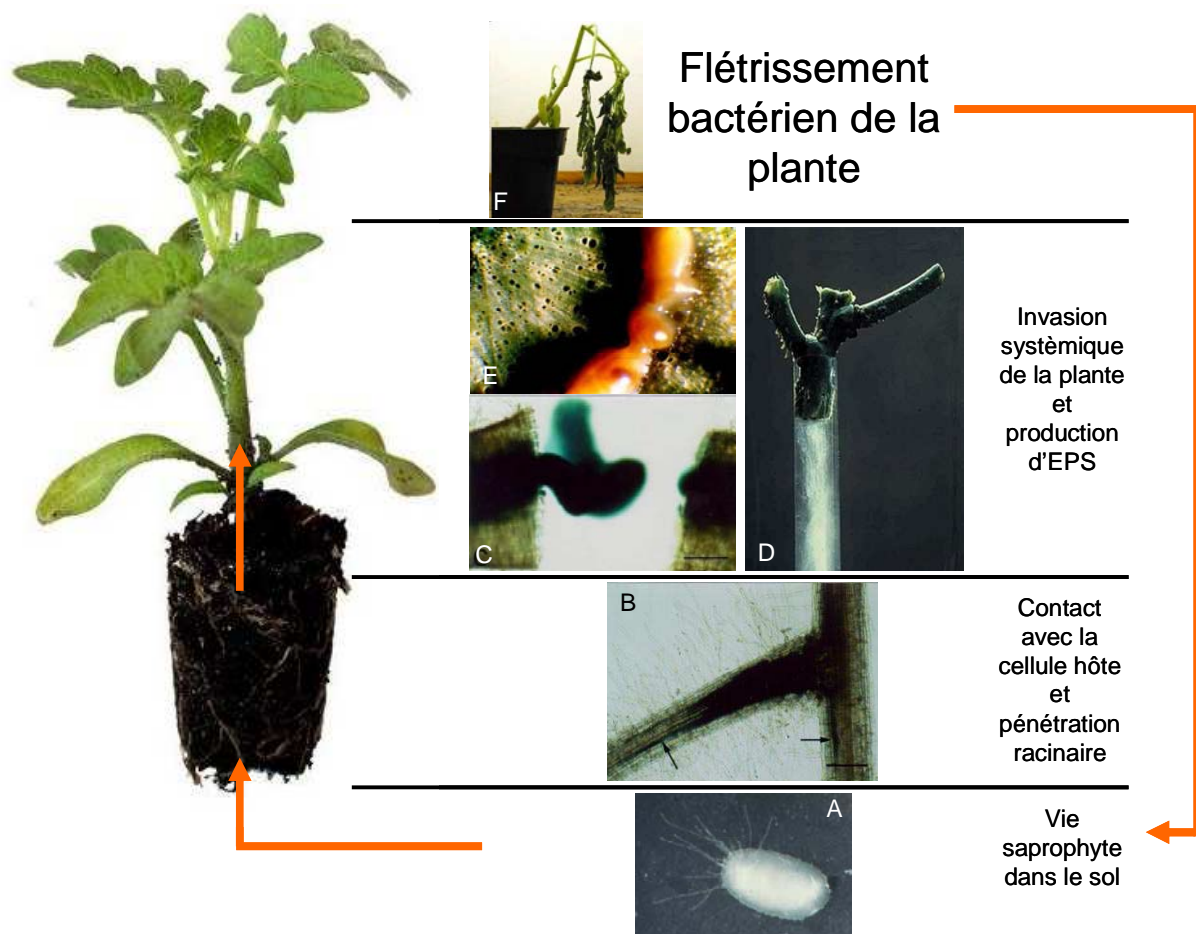


Figure 8. Cycle de vie et d'infection de *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum est une bactérie capable de survivre dans le sol plusieurs années. Elle pénètre dans la plante par les racines, atteint les vaisseaux du xylème dans lesquelles elle se développe et envahit la plante. La production d'exopolysaccharides par la bactérie dans les vaisseaux conducteurs conduit au flétrissement bactérien de la plante infectée.

A. observation de *R. solanacearum* au microscope électronique à transmission (J. Vasse, LIPM, Toulouse).

B. Infection intercellulaire le long du cylindre vasculaire des racines primaires et secondaires (flèche) observée 6 jours après infection (Vasse *et al.*, 2000).

C. Colonisation vasculaire de la partie supérieure de la racine principale : exsudation bactérienne du cylindre vasculaire après une coupe transversale des racines observée 18 jours après inoculation (Vasse *et al.*, 2000).

D. Invasion systémique de la plante : exsudation bactérienne d'une section transversale de tige d'une plante infectée par *R. solanacearum* (Photo de l'Université de Géorgie, *Plant Pathology Extension*).

E. Production d'exopolysaccharides : écoulement d'exopolysaccharides à partir de la section transversale d'une tige (C. Boucher, LIPM, Toulouse).

F. Flétrissement bactérien de la plante : symptômes sur jeune plant de tomate après inoculation de *R. solanacearum* (Photo de P. Champoiseau, Université de Floride).

de terre (Williamson *et al.*, 2002) provoquant des conséquences agronomiques et économiques plus importantes. L'émergence de cette souche a permis de mettre en évidence l'existence de souches dont la résistance au froid est plus importante que les autres souches et pouvant infecter leurs hôtes à des températures plus basses que les souches jusqu'alors connues et étudiées (Milling *et al.*, 2009).

1.2 Cycles de vie de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum présente deux cycles de vie : le cycle saprophyte dans le sol, dans lequel la bactérie peut survivre de nombreuses années (Van Elsas *et al.*, 2000) et le cycle infectieux dans la plante (Figure 8). Le cycle infectieux de *R. solanacearum* est commun à toutes les souches de cette espèce bactérienne malgré la diversité phylogénétique existant au sein de cette espèce. Peu d'éléments sont connus concernant la phase saprophyte de la vie de la bactérie ; le génome de la souche GMI1000 montre que *R. solanacearum* possède l'équipement génétique nécessaire au catabolisme de divers composés organiques pour lui fournir l'énergie nécessaire à sa survie (Genin et Boucher, 2004).

La bactérie est également capable de se disséminer et de survivre dans les cours d'eau (Alvarez *et al.*, 2008). Une fois de plus le mécanisme de survie de la bactérie dans l'eau n'est pas défini. Les bactéries conservées dans l'eau à des températures basses (4°C) entrent dans une forme viable mais non cultivable sur milieu habituel. L'ajout de catalase dans le milieu permet la croissance de ces formes viables (Grey and Steck, 2001). Cependant il a été montré que ces formes viables ne sont plus pathogènes sur la tomate (Overbeek *et al.*, 2003). D'autres mécanismes sont donc sans doute impliqués dans la survie de *R. solanacearum* dans l'eau ou dans le sol.

Finalement, un cycle de vie épiphyte de la bactérie n'est pas à exclure, puisqu'il a été montré que la bactérie est capable de survivre sur feuilles de tabac et de tomate à de très forts taux d'humidité (proche de 90%) (Hayward, 1991).

Pour infecter ses plantes hôtes *R. solanacearum* pénètre dans la plante par les racines et plus particulièrement au niveau de l'apex racinaire, des points d'émergence de racines secondaires ou de blessures naturelles (Figure 8). La bactérie progresse ensuite très rapidement (quelques heures) dans les espaces intercellulaires du cortex racinaire et dégrade les parois végétales pour finalement atteindre les vaisseaux du xylème à partir desquels elle colonise son hôte de manière systémique en 2-3 jours (Vasse *et al.*, 1995). La multiplication dans les vaisseaux du xylème est très importante (jusqu'à 10^{10} cellules par

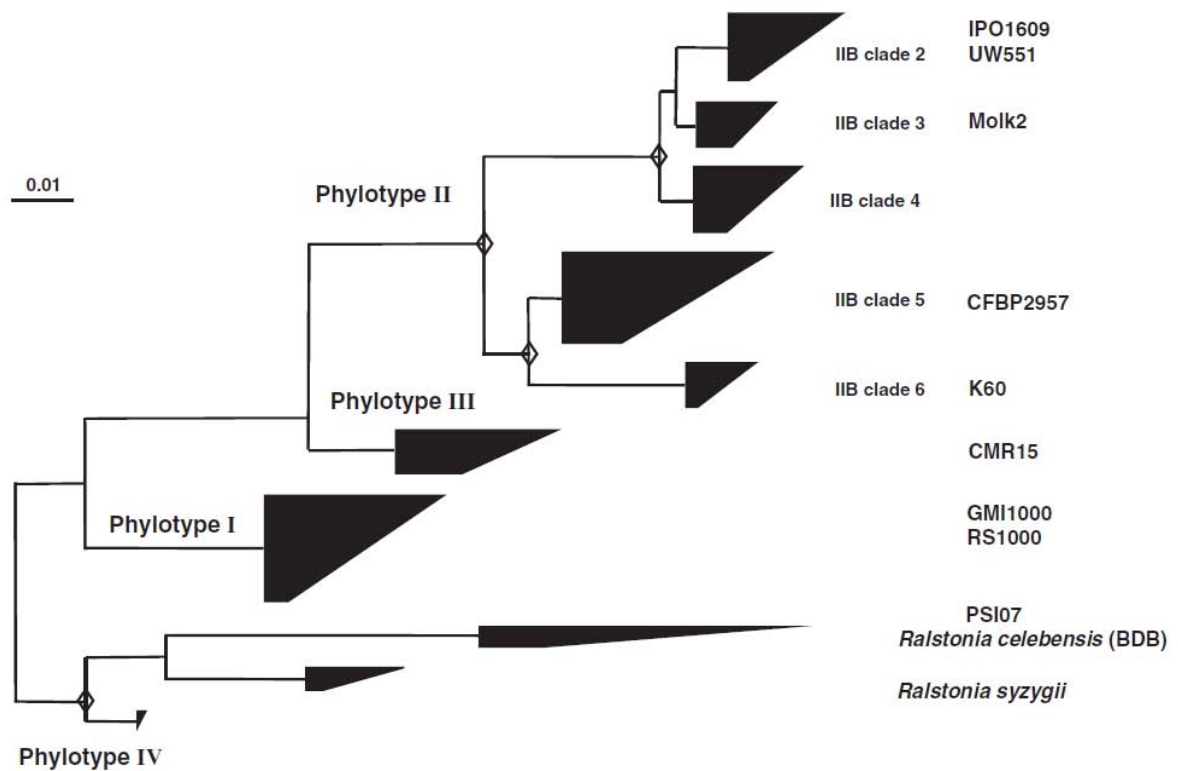


Figure 9. Arbre phylogénétique du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

Arbre phylogénétique construit à partir des séquences du gène *egl* de 771 souches de *R. solanacearum*. Les souches dont le génome a été séquencé et/ou utilisées comme souches de référence sont identifiées. Les bactéries *R. syzygii* et *R. celebensis* (BDB, banana blood disease bacterium) sont des espèces taxonomiquement proches de *R. solanacearum*. La barre d'échelle représente la substitution d'un nucléotide sur 10 nucléotides. L'épaisseur des « bandes » est relative au nombre de souches échantillonnées par phylotype.

(Ph. Prior, INRA, Réunion)

centimètre de tige de tomate, 8 jours après infection). Cette forte multiplication bactérienne s'accompagne de la sécrétion massive d'exopolysaccharides bloquant la circulation de la sève brute et provoquant les symptômes caractéristiques de flétrissement bactérien. Lorsque la plante est entièrement infectée, la bactérie regagne le sol où elle peut atteindre à nouveau des racines saines et réaliser un nouveau cycle infectieux.

La survie de *R. solanacearum* dans le sol, dans l'eau mais aussi dans les mauvaises herbes qui dans certains cas permettent la multiplication de la bactérie, fait qu'il est très difficile d'éliminer la bactérie d'une parcelle infectée. Les moyens de lutte les plus efficaces utilisés actuellement sont l'emploi de variétés végétales résistantes ou tolérantes et la rotation des cultures.

1.3 Classification des différentes souches de *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum est une bactérie Gram-négative appartenant au règne des protéobactéries auquel appartient également de nombreuses espèces pathogènes d'animaux (*Yersinia*, *Salmonella*, *Escherichia*...) et de plantes (*Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Agrobacterium*...).

La diversité génotypique et phénotypique des différentes souches de *R. solanacearum* ainsi que les différences de gamme d'hôtes observées entre les souches mènent à définir *R. solanacearum* comme un « complexe d'espèces » (Gillings *et al.*, 1993).

La classification la plus récente des souches de ce complexe d'espèces correspond à des groupes phylogénétiques appelés phylotypes. Cette classification basée sur l'analyse des séquences des gènes 16S, *egl* (gène codant pour une endoglucanase) et *hrpB* a permis d'identifier quatre phylotypes différents qui sont corrélés à l'origine géographique des souches (Figure 9) (Fegan and Prior, 2005 ; Poussier *et al.*, 2000) : phylotype I (Asie), phylotype II (Amérique), phylotype III (Afrique) et phylotype IV (Indonésie). Le phylotype IV comporte également la bactérie *Ralstonia syzygii*, bactérie pathogène du giroflier. Cette bactérie est phylogénétiquement très proche de *R. solanacearum* et présente la particularité d'avoir un génome plus petit que *R. solanacearum*.

1.4 Caractéristiques génomiques du complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum*

A ce jour, sept séquences de *R. solanacearum* sont publiquement disponibles ainsi que la séquence de la bactérie *R. syzygii* (C. Boucher et Ph. Prior, communication personnelle). Les sept souches séquencées de *R. solanacearum* sont réparties dans les différents phylotypes. La souche GMI1000, modèle utilisé au laboratoire, a été isolée d'un plant de tomate et appartient au phylotype I (Salanoubat *et al.*, 2002). La souche Molk2, isolée de bananier, et les souches IPO1609 et UW551, isolées de plants de pomme de terre, appartiennent toutes les trois au phylotype II. Les souches IPO1609 et UW551 sont des souches particulièrement tolérantes au froid par rapport aux autres souches (Gabriel *et al.*, 2006 ; Guidot *et al.*, 2009). Récemment trois autres souches isolées de plants de tomate ont été séquencées : CFBP2957 appartient au phylotype II, CMR15 au phylotype III et PSI07 au phylotype IV. Les séquences connues à ce jour couvrent donc la totalité de la diversité génétique du complexe d'espèces *R. solanacearum* (Remenant *et al.*, 2010).

Les sept souches séquencées présentent des caractéristiques génomiques communes : un contenu GC élevé (autour de 67%), des tailles de génome et un nombre de gènes similaires avec une structuration commune en deux réplicons : un chromosome et un mégaplasme. Chez la souche GMI1000, le chromosome représente 3,7 Mb et code pour 3 500 protéines ; le mégaplasme représente 2,1 Mb et code pour 1 700 protéines (Salanoubat *et al.*, 2002). De plus malgré des distances phylogénétiques importantes entre les différentes souches, la syntenie entre ces souches est importante et concerne 60 % des gènes du mégaplasme et 70 % des gènes du chromosome. Une autre caractéristique commune est la présence de la plupart des gènes de ménage sur le chromosome et très peu sur le mégaplasme.

La disponibilité des sept séquences permet de déterminer le pan-génome du complexe d'espèces *R. solanacearum*, c'est-à-dire de définir l'intégralité des gènes présents dans ce complexe d'espèces. Le pan-génome de *R. solanacearum* défini à partir des souches séquencées est constitué de 9 093 gènes ; 28% de ces gènes (soit 2 543 gènes) sont retrouvés dans toutes les souches et définissent le « core genome » (Remenant *et al.*, 2010). Le nombre de gènes spécifiques dépend de la souche étudiée et varie de 391 gènes pour la souche Molk2 à 640 gènes pour la souche GMI1000. Au total, la proportion de gènes spécifiques représente 30 % du pan-génome de *R. solanacearum* ; la grande majorité de ces gènes n'a pas de fonctions connues et représente potentiellement des mécanismes impliqués dans la diversité biologique du complexe d'espèces (Remenant *et al.*, 2010).

Parmi les gènes spécifiques certains sont impliqués dans des voies métaboliques de dégradation de composés organiques particuliers ; cette spécificité peut être liée à la survie dans le sol, la nature du sol ayant un lien direct avec la survie de la bactérie (Hayward, 1991 ; Van Elsas *et al.*, 2000).

Finalement, une autre caractéristique des génomes de *R. solanacearum* est leur fort potentiel évolutif. Les sept génomes présentent une structure en mosaïque caractérisée par la présence de régions à usage de codons alternatifs appelées ACURs (alternative codon usage region) et avec un contenu GC différent. Ces régions ont sans doute été acquises par transfert horizontal de gènes. *R. solanacearum* est une bactérie naturellement compétente et transformable et peut intégrer des fragments d'ADN allant jusqu'à 90 kb (Coupat *et al.*, 2007, Guidot *et al.*, 2009). Selon Nakamura *et al.* (2004), 16 % du génome de la souche GMI1000 aurait été acquis par transfert horizontal de gènes. En plus de ces ACURs, *R. solanacearum* possède dans son génome des éléments génétiques mobiles tels que des transposons et des séquences d'insertion qui peuvent jouer un rôle dans l'instabilité génétique et l'évolution rapide du génome de la bactérie.

1.5 Conservation génomique des déterminants de virulence chez *Ralstonia solanacearum*

De nombreux gènes impliqués dans la virulence sont présents dans le « core genome » de *R. solanacearum* soulignant le caractère ancestral du pouvoir pathogène de cette bactérie (Guidot *et al.*, 2007). Parmi les gènes codant pour des déterminants de virulence et faisant partie du « core genome », on trouve les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides, les gènes codant pour des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des gènes impliqués dans la motilité bactérienne, des gènes impliqués dans la réponse aux défenses de la plante et les gènes codant pour le système de sécrétion de type III (Remenant *et al.*, 2010 ; Guidot *et al.*, 2007).

Certains gènes impliqués dans la virulence font partie du génome « variable » du complexe d'espèces *R. solanacearum* ; ces gènes de virulence variables correspondent plus particulièrement à des effecteurs de type III et à des gènes impliqués dans l'attachement de la bactérie à la cellule hôte, tels que des gènes codant pour des hémagglutinines. Concernant les effecteurs de type III et d'après leur conservation au sein du complexe d'espèces, il a été déterminé pour la souche GMI1000 que 34 gènes d'effecteurs, soit

environ la moitié des gènes d'effecteurs répertoriés, codent pour les « core effecteurs » ancestraux (Guidot *et al.*, 2007, Poueymiro and Genin, 2009).

Les gènes impliqués dans la régulation globale de la virulence (système Phc, détaillé dans la partie 2 de ce chapitre) de la bactérie et la régulation du système de sécrétion de type III (système Prh, détaillé dans la partie 2 de ce chapitre) sont également conservés chez les différentes souches séquencées et étudiées par hybridation génomique.

2. La régulation de la virulence chez *Ralstonia solanacearum*

Le réseau contrôlant la transcription des gènes de virulence et de pathogénie de *R. solanacearum* est composé de plus de 20 produits de gènes en interaction (Schell, 2000), laissant entrevoir des mécanismes de régulation très sophistiqués. Ce réseau est nécessaire pour coordonner les différents déterminants de virulence et adapter le métabolisme bactérien entre la phase saprophyte dans le sol, un environnement pauvre en nutriments, et le cycle infectieux dans la plante, un environnement riche en nutriments mais rendu hostile par les mécanismes de défense de la plante.

2.1 Le système Phc au cœur de la régulation de l'expression génique de *Ralstonia solanacearum*

Identification et présentation du système Phc

Le système Phc (pour phenotypic conversion) est au cœur du réseau de régulation du pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. Il est composé du régulateur PhcA, un régulateur de type LysR et des produits de l'opéron *phcBSRQ* qui contrôle le taux de PhcA actif en réponse au quorum sensing (Clough *et al.*, 1997). Les premiers mutants présentant un phénotype caractéristique d'une mutation dans le gène *phcA* ont été isolés par Kelman en 1954. Ces mutants ont un phénotype très particulier puisqu'ils ne sont pas muqueux, c'est-à-dire qu'ils ne produisent pas d'exopolysaccharides (EPS) et sont quasiment avirulents. En plus de réguler de manière positive la sécrétion d'EPS, PhcA active également la production de nombreuses exoprotéines (Brumbley and Denny, 1990). D'autre part, PhcA réprime l'expression d'autres gènes impliqués dans la virulence puisqu'un mutant *phcA* présente une surproduction de la polygalacturonase PglA (Schell *et al.*, 1988) ainsi qu'une motilité par « swimming » plus importante que la souche sauvage (Clough *et al.*, 1997). Finalement, PhcA réprime aussi la synthèse du système de sécrétion de type III (Genin *et al.*, 2005 ; Yoshimochi *et al.*, 2009). PhcA agit donc comme un véritable « interrupteur » central dans la régulation de la virulence de *R. solanacearum*, activant la transcription d'un certain nombre de gènes et réprimant d'autres gènes de manière à répondre à des situations différentes.

Ce système Phc est présent chez toutes les bactéries du complexe d'espèces *R. solanacearum* mais aussi chez d'autres espèces du genre *Ralstonia*, telles que *Ralstonia eutropha* CH34 qui est également capable de produire du 3-OH-PAME (Garg *et al.*, 2000).

En revanche, il est absent des autres bactéries pathogènes des plantes ou saprophytes et notamment les *Pseudomonas*.

Le système Phc et le quorum sensing AHL-dépendant

Nous avons vu que le quorum sensing chez *R. solanacearum* est dépendant d'une molécule endogène le 3-OH-PAME. Cette molécule est synthétisée par la protéine associée à la membrane bactérienne PhcB codée par le premier gène de l'opéron *phcBRSQ*. La présence de cette molécule, même en très faible quantité, active l'expression des gènes contrôlés par PhcA. C'est via cette molécule, le 3-OH-PAME, que PhcB contrôle de manière indirecte l'activation post-transcriptionnelle de PhcA. Ainsi l'inactivation du gène *phcB* présente le même phénotype que l'inactivation du gène *phcA* (Clough *et al.*, 1997 ; Flavier *et al.*, 1997). L'activation de PhcA par le 3-OH-PAME intervient lorsque la concentration en 3-OH-PAME atteint 5 nM, correspondant à une culture bactérienne à 10^7 bactéries / mL (Flavier *et al.*, 1997). Ainsi lorsque les cellules de *R. solanacearum* croissent lentement, dans un milieu pauvre en nutriments, ou lorsque la densité bactérienne est faible, c'est-à-dire que les cellules sont dispersées dans l'environnement, le seuil de 3-OH-PAME produit par PhcB n'atteint pas le seuil du quorum sensing nécessaire à l'activation de PhcA. Dans ces conditions, qui correspondent aux conditions rencontrées dans le sol, la bactérie ne produit donc pas d'exopolysaccharides, ni d'enzymes extracellulaires mais active son système de motilité. En revanche, lorsque les cellules sont dans la plante, elles doivent faire face à un environnement confiné et une multiplication rapide favorisée par un milieu riche en nutriments. Dans ce cas, la concentration en 3-OH-PAME atteint rapidement le seuil nécessaire au déclenchement du quorum sensing et à l'activation de PhcA. La biosynthèse d'exopolysaccharides est alors activée ainsi que celles d'enzymes extracellulaires, éléments cruciaux au pouvoir pathogène.

Un autre mécanisme de quorum sensing existe chez *R. solanacearum*. Ce mécanisme est codé par les gènes *soll* et *solR* qui sont fortement similaires aux gènes *luxI* et *luxR*, gènes impliqués dans le quorum sensing de nombreuses bactéries (Fuqua *et al.*, 1994). *Soll* synthétise une molécule de type AHL : lorsque le taux de AHL atteint le seuil nécessaire au quorum sensing, les AHL se lient au régulateur *SolR* induisant la transcription de ses gènes cibles. L'inactivation des gènes *soll* et *solR* n'a pas d'effet sur l'apparition de la maladie ni sur la production de facteurs de virulence. Cependant l'expression de ces gènes est induite par PhcA (Flavier *et al.*, 1997). De cette manière *R. solanacearum* dispose de deux systèmes de quorum sensing, le système Phc qui est actif dès que la concentration bactérienne atteint 10^7 bactéries / mL alors que le système *Soll/R* est uniquement activé au-

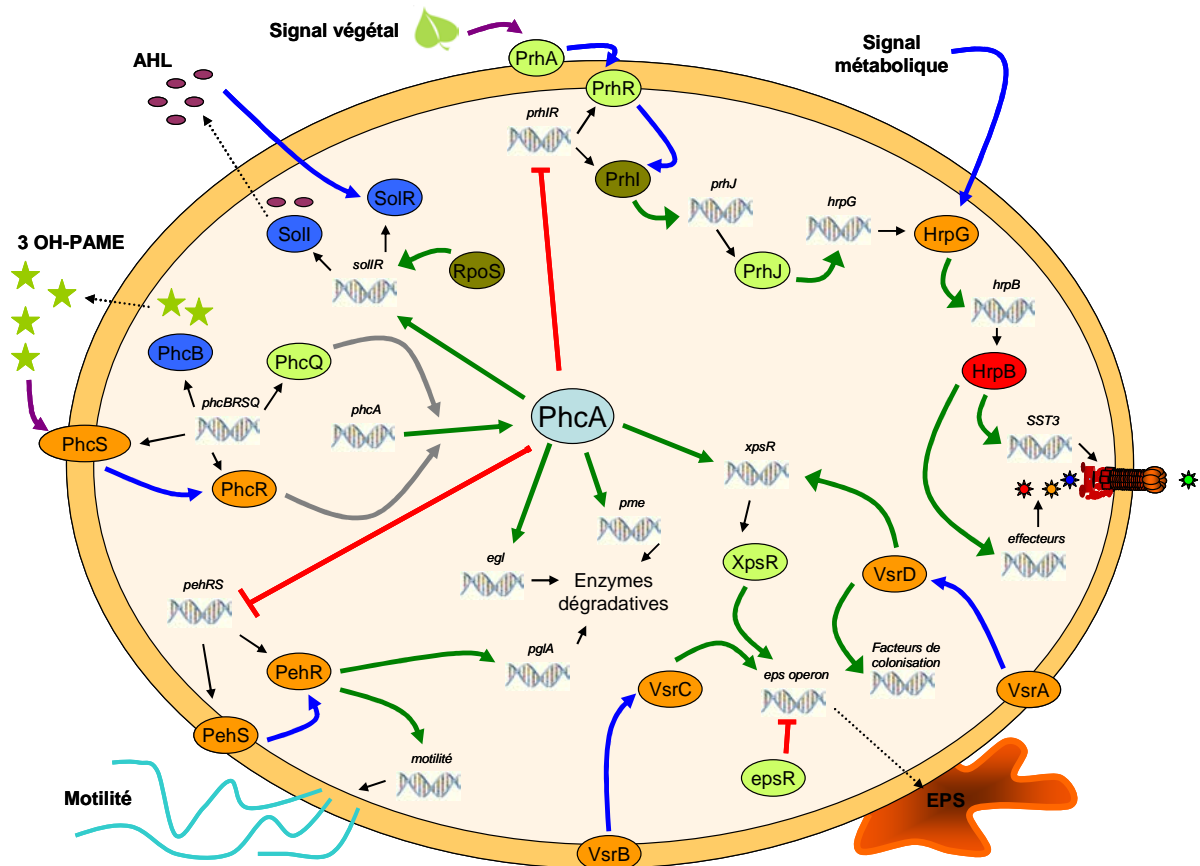


Figure 10. Régulation globale de la virulence chez *Ralstonia solanacearum*

Code couleur pour les protéines régulatrices : bleu foncé = régulateurs liés à la communication intercellulaire, orange = système à deux composants, vert foncé = facteur sigma, bleu clair = régulateur de type LysR, rouge = régulateurs de la famille AraC, vert clair = autres régulateurs.

Code pour les types d'activation : flèche verte = activation transcriptionnelle du gène, flèche grise = activation post-transcriptionnelle, flèche bleue = activation post-traductionnelle, flèche noire = produit du gène, flèche noire en pointillé = sécrétion extracellulaire de produits bactériens, flèche violette = perception d'un signal extracellulaire.

delà de 10^8 bactéries / mL. Une hypothèse possible est que le système *Soll/R* active des gènes impliqués dans des phases très tardives du processus infectieux ne nécessitant plus la production de facteurs de virulence. De plus l'expression de *soll* et *solR* dépend également du facteur sigma alternatif RpoS, facteur impliqué dans le contrôle de gènes de réponse au stress et dans la survie en conditions de carences nutritives et en phase stationnaire de croissance. Un mutant *rpoS* n'est que peu affecté dans son pouvoir pathogène même s'il produit deux fois moins d'exopolysaccharides que la souche sauvage (Flavier *et al.*, 1998).

Mécanisme d'activation de PhcA par le 3-OH-PAME

Le rôle du 3-OH-PAME sur l'activation de PhcA n'est pas clairement défini, il s'agit soit d'un effet post-transcriptionnel par stabilisation de l'ARN messenger codant pour PhcA, soit d'un effet post-traductionnel en protégeant la protéine PhcA de la dégradation (Schell, 2000). Deux autres gènes sont également impliqués dans ce processus, il s'agit de *phcS* et *phcR* qui sont en opéron avec le gène *phcB*. Ces deux gènes codent pour un système de transduction à deux composants (Clough *et al.*, 1997). L'inactivation de *phcS* ou *phcR* dans un mutant déficient dans la production de 3-OH-PAME (un mutant *phcB*) restaure l'expression des gènes régulés par PhcA suggérant que PhcS et PhcR répriment la production de PhcA en l'absence de 3-OH-PAME. L'hypothèse la plus probable est que le 3-OH-PAME stimule le senseur PhcS qui va phosphoryler le régulateur PhcR ; la forme phosphorylée de PhcR devient alors incapable d'inhiber l'activation post-transcriptionnelle de PhcA (Schell, 2000) (Figure 10). Le rôle du produit du gène *phcQ*, situé dans l'opéron *phcBRSQ* n'est pas encore défini, mais il pourrait également être impliqué dans l'activation post-traductionnelle de PhcA.

2.2 La régulation de la biosynthèse d'exopolysaccharides

Les gènes impliqués dans la biosynthèse et l'export d'exopolysaccharides forment un cluster de 18 kb dont la transcription est sous contrôle d'un seul promoteur qui nécessite au moins sept protéines régulatrices et répond à plus de trois signaux différents (Huang and Schell, 1995 ; Huang *et al.*, 1995).

Il a été montré que dans l'environnement confiné de la plante, la production et la présence d'exopolysaccharides dépend de la densité cellulaire, elle est particulièrement élevée dans les espaces intercellulaires entourant l'endoderme (Kang *et al.*, 1999).

Le contrôle de la production d'exopolysaccharides par PhcA n'est pas dû à la liaison directe de PhcA sur le promoteur de l'opéron *eps*. Ce contrôle se fait par l'intermédiaire d'un autre régulateur, XpsR. PhcA se fixe directement sur le promoteur de *xpsR* induisant l'expression du gène (Huang *et al.*, 1998 ; Yoshimochi *et al.*, 2009). XpsR conjointement avec le régulateur VsrC active la transcription de l'opéron *eps*. L'expression de *xpsR* est, en plus d'être régulée par PhcA, contrôlée par le système de transduction à deux composants VsrA/VsrD (Huang *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1998). L'expression de l'opéron *eps* répond à un contrôle synergique exercé par le système Phc et le système VsrA/VsrD. Les sites de fixation de PhcA et VsrD sur le promoteur de *xpsR* sont différents. L'activation de VsrD n'est pas suffisante pour induire l'expression de *xpsR*, son rôle est d'améliorer l'activation transcriptionnelle de *xpsR* médiée par PhcA, sans doute en stabilisant ou facilitant la liaison de PhcA à l'ADN promoteur de *xpsR* (Huang *et al.*, 1998). Cette synergie entre deux régulateurs de types différents (LysR et système à deux composants) sur un même promoteur est assez inhabituelle et le mode de fonctionnement de PhcA et VsrD de manière synergique n'a pas encore été démontré sur d'autres promoteurs.

Un autre système à deux composants intervient dans la régulation de l'opéron *eps*, il s'agit du système VsrB/VsrC ; le régulateur VsrC de ce système régule directement l'expression de l'opéron *eps* (Garg *et al.*, 2000).

L'opéron *eps* est réprimé par le régulateur négatif EpsR. Le rôle physiologique de ce répresseur dans le pouvoir pathogène n'est pas évident puisque l'inactivation du gène *epsR* n'a pas d'impact sur la production d'exopolysaccharides. La répression de l'expression de l'opéron *eps* par EpsR n'a lieu que lorsque le promoteur a été activé par VsrC et XpsR (Garg *et al.*, 2000).

2.3 La régulation de la biosynthèse d'enzymes pectinolytiques et de la motilité

De manière assez surprenante, toutes les enzymes pectinolytiques ne sont pas régulées de manière coordonnée : le système Phc active la production de la pectine méthylestérase (Pme) et de l'endoglucanase (Egl) alors qu'il réprime la production de la polygalacturonase PglA (Clough *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 1993). Cette régulation différentielle exercée par le système Phc sur la production d'enzymes pectinolytiques indique que le contrôle de l'expression des enzymes pectinolytiques n'est pas un effet direct du système Phc mais que

d'autres régulateurs permettant d'induire des effets contraires sont nécessaires. C'est le cas pour la régulation de la production de PglA pour laquelle un système de transduction à deux composants, PehS/PehR, sert d'intermédiaire au contrôle exercé par PhcA : PhcA réprime l'expression des gènes *pehS* et *pehR*, empêchant l'induction de la production de PglA par le régulateur PehR (Allen *et al.*, 1997). Un mutant *pehRS* présente un pouvoir pathogène plus réduit qu'un mutant *pglA* indiquant que PehR régule certainement l'expression et la production d'autres déterminants de virulence.

Le contrôle de la motilité est également exercé par le système Phc via le système PehR/PehS. L'inactivation du système Phc entraîne une motilité accrue de *R. solanacearum* même pour une densité cellulaire élevée (Clough *et al.*, 1997) ; en revanche l'inactivation du système PehR/PehS entraîne une perte de motilité par rapport aux cellules sauvages (Allen *et al.*, 1997). Les gènes impliqués dans la motilité et contrôlés par le système Phc ne sont pas connus. Mais ces résultats indiquent que l'expression de certains gènes de motilité est réprimée par le système Phc et activée par le système PehR/PehS. Ce profil d'expression est similaire à celui déjà décrit pour le contrôle de *pglA*, indiquant un contrôle coordonné de ces deux facteurs de virulence. La coordination de l'expression de *pglA* et de la motilité implique que ces deux facteurs sont importants dans les premières phases de l'infection, quand le système Phc est inactif : lorsque la bactérie est au contact des racines dans le sol ou lorsqu'elle se déplace dans les espaces intercellulaires de la plante.

2.4 La régulation de facteurs de colonisation

Nous avons déjà vu que le système à deux composants VsrA/VsrD est impliqué dans la régulation de l'expression de l'opéron *eps*. L'inactivation de *vsrA* et *vsrD* entraîne la perte de virulence de *R. solanacearum* en empêchant la colonisation de la plante et de la tige par la bactérie (Huang *et al.*, 1995 ; Schell *et al.*, 1994). Ce phénotype d'absence de colonisation n'est pas imputable à la réduction de la production d'exopolysaccharides dans un mutant *vsrA/vsrD*. Un mutant *vsrD* est toujours capable de produire des exopolysaccharides de manière similaire à la souche sauvage et pourtant un mutant *vsrD* ne peut pas coloniser la tige d'une plante hôte ni induire la maladie. Ces résultats indiquent que le système VsrA/VsrD contrôle l'expression de facteurs indispensables à la croissance *in planta* et à la colonisation de la plante, mais l'intégralité des cibles de VsrA/VsrD n'a pas encore été identifiée et les déterminants de colonisation contrôlés par ce système à deux composants ne sont pas encore connus.

2.5 La régulation du système de sécrétion de type III

La régulation du système de sécrétion de type III, dépend d'une cascade de régulation, la cascade Prh (pour *plant regulator of hrp genes*) composée de six protéines régulatrices. Cette cascade est activée par la perception d'un signal plante. Ce système de régulation est fortement différent de celui connu chez *P. syringae*, mais il est très similaire à celui décrit chez *Xanthomonas campestris* (Wengelnik *et al.*, 1996). Dans les deux cas (*Xanthomonas* et *Ralstonia*), les deux derniers régulateurs de la cascade sont de la même nature : un régulateur de systèmes à deux composants (HrpG chez *R. solanacearum* et chez *X. campestris*) contrôle l'expression d'un régulateur de type AraC (HrpB chez *R. solanacearum* et HrpX chez *X. campestris*). HrpB et HrpX activent ensuite de manière directe la transcription des gènes du système de sécrétion de type III et des effecteurs. La cascade de régulation Prh de *R. solanacearum* (Figure 10) sera décrite plus précisément dans la suite de cette thèse.

Le système Phc intervient également sur la régulation du système de sécrétion de type III (Genin *et al.*, 2005). Il agit au début de la cascade de régulation en empêchant la transcription de l'opéron *phlR* codant pour deux régulateurs impliqués dans la cascade de régulation du système de sécrétion de type III (Yoshimochi *et al.*, 2009).

L'expression du système de sécrétion de type III est donc réprimée quand PhcA est actif, c'est-à-dire à forte densité bactérienne, à l'inverse de la sécrétion d'EPS. Le système de sécrétion de type III est donc impliqué dans les premières phases de l'infection pour supprimer, via l'injection des effecteurs, les défenses de l'hôte et permettre l'infection de la plante.

Le système de régulation du pouvoir pathogène chez *R. solanacearum* est comme on l'a vu très sophistiqué. Au centre de ce système se trouve le régulateur PhcA qui agit sur et avec d'autres réseaux de régulation. Les interactions entre les différents régulateurs sont à l'origine de ces systèmes très complexes et intégrés.

Dans la suite de cette introduction nous nous focaliserons sur les TCSTS et expliciterons les différents embranchements pouvant exister entre les différents TCSTS.

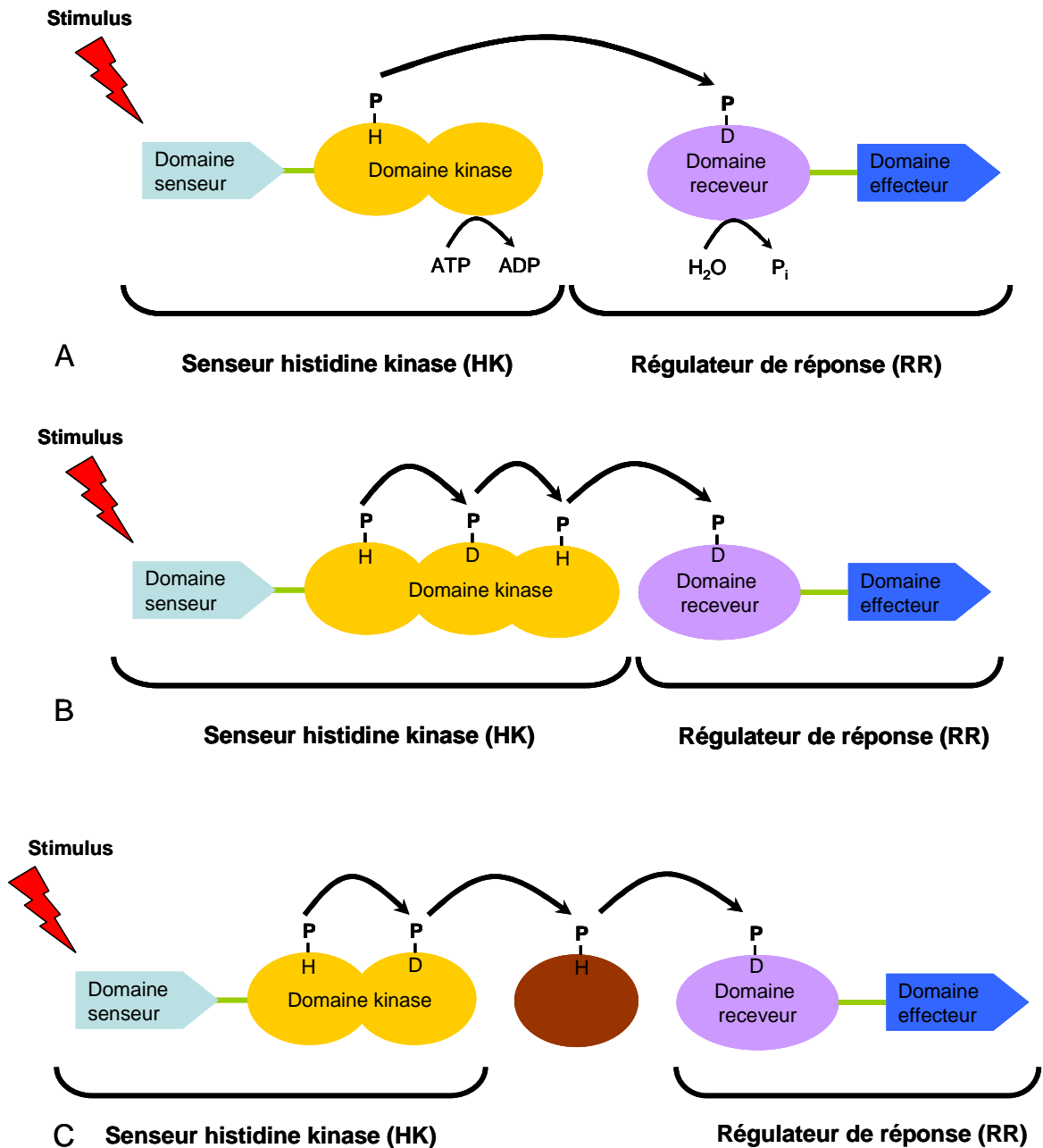


Figure 11. Prototypes d'activation des TCSTS

A. Mécanisme des TCSTS avec kinase orthodoxe : sur perception d'un stimulus particulier, le senseur histidine kinase est autophosphorylé sur un résidu histidine (H) conservé. Le senseur phosphoryle ensuite le régulateur de réponse sur un résidu aspartate (D) conservé.

B. Mécanisme des TCSTS avec kinase hybride : sur perception d'un stimulus particulier, le senseur histidine possède plusieurs sites donneurs et accepteurs de groupements phosphoryls permettant un mécanisme de phosphorelais du groupement phosphoryl. Le senseur phosphoryle finalement le régulateur de réponse sur un résidu aspartate (D) conservé.

C. Mécanisme des TCSTS avec kinase hybride, ce mécanisme fait intervenir une protéine indépendante dans le système de phosphorelais.

Les flèches noires indiquent les transferts de groupements phosphoryls.

CHAPITRE III.

Les TCSTS : Systèmes de transduction à deux composants

Les systèmes à deux composants sont utilisés par différents organismes pour sentir et répondre à des changements dans leurs conditions environnementales. Ces mécanismes de signalisation sont très sophistiqués et sont marqués par des structures très modulaires permettant l'intégration d'une large variété de signaux cellulaires et une grande diversité de fonctionnements d'un organisme à un autre.

1. Structure et fonction des systèmes à deux composants

1.1 Mécanismes des systèmes à deux composants : le transfert de groupements phosphoryls

Le prototype des systèmes à deux composants consiste en une protéine senseur histidine kinase (HK) et une protéine régulatrice de réponse (RR). Les stimuli extracellulaires sont perçus par la protéine kinase et servent à moduler son activité par autophosphorylation sur un résidu histidine. Une fois autophosphorylée et donc activée, la protéine kinase transfère le groupement phosphoryl sur le régulateur au niveau d'un résidu aspartate très conservé; cette réaction de transfert est catalysée par le régulateur. La phosphorylation du régulateur résulte dans l'activation du domaine « effecteur » de la protéine régulatrice élicitant une réponse spécifique au signal perçu (Stock *et al.*, 2000).

Le mécanisme d'activation du régulateur nécessite donc trois réactions de phosphorylations (Figure 11) :

- (i) autophosphorylation : $\text{HK-His} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$;
- (ii) phosphotransfert : $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \rightleftharpoons \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$;
- (iii) déphosphorylation : $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RR-Asp} + \text{P}_i$.

Concernant l'autophosphorylation et étant donné le ratio ATP/ADP intracellulaire, l'équilibre de la première réaction est fortement en faveur du senseur non phosphorylé : seul un faible pourcentage de la population des histidine kinases existe dans l'état phosphorylé. C'est donc d'avantage le flux de groupements phosphoryls qui prime dans cette réaction et dans l'activation des histidine kinases (Stock *et al.*, 2000).

Le temps de vie de la phosphorylation du régulateur est très variable selon le système étudié, allant de quelques secondes à plusieurs heures (Weiss and Magasanik, 1988). L'hydrolyse du groupement phosphoryl permet d'éteindre la transduction du signal. Le contrôle du temps de vie de la phosphorylation du régulateur de réponse est donc nécessaire pour que la cellule puisse mettre en place une réponse adaptée au stimulus perçu. La déphosphorylation du régulateur de réponse peut être catalysée par le régulateur lui-même mais elle est plus souvent médiée par une autre protéine : certaines kinases possèdent une activité phosphatase pour le régulateur auquel elles sont associées et d'autres protéines telles que des phosphatases auxiliaires peuvent également être impliquées dans cette déphosphorylation (Silversmith, 2010).

1.2 Conservation et distribution génomique des systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont présents chez tous les domaines du vivant : eubactéries, archæobactéries et eucaryotes. Cependant, leur abondance est variable d'un domaine à un autre. Les systèmes de phosphotransfert d'une histidine à une aspartate représentent la majorité des voies de signalisation chez les eubactéries mais sont plus rares chez les eucaryotes. Les voies de signalisation par phosphorylation prédominantes chez les eucaryotes sont les cascades de kinases impliquant des phosphorylations de serine, thréonine et thyrosine. Ce système de signalisation existe aussi chez les eubactéries (Zhang, 1996).

La disponibilité de séquences de génomes complets a permis de mettre en évidence l'importance des systèmes à deux composants. Par exemple chez *Escherichia coli*, 30 histidine kinases ont été identifiées pour 32 régulateurs de réponse (Mizuno, 1997). Le nombre de systèmes à deux composants diffère fortement d'un organisme à un autre, allant de zéro chez *Mycoplasma genitalium* à 80 chez les espèces de *Synechocystis* (Stock *et al.*, 2000).

Concernant les bactéries phytopathogènes, une analyse plus précise des systèmes à deux composants a été réalisée chez les différentes espèces de *Xanthomonas* à partir de six

génomés séquencés (Qian *et al.*, 2008). Les génomes des *Xanthomonas* contiennent généralement de larges répertoires de gènes impliqués dans des systèmes à deux composants, soit codant pour des senseurs, soit codant pour des régulateurs. 92 à 121 gènes par génome ont été identifiés comme étant impliqués dans des TCSTS ; parmi eux, un groupe de 70 gènes est conservé chez toutes les souches, avec très peu de variations alléliques d'une souche à l'autre. Les autres gènes sont en revanche très variables et montrent de nombreux signes d'évolution (recombinaison, réarrangement, duplication, délétion...). Ce potentiel d'évolution entretient la complexité de la régulation par les systèmes à deux composants. Les gènes impliqués dans les TCSTS représentent de 2,38 à 3,24% des génomes des *Xanthomonas*. Ce pourcentage élevé de TCSTS indiquent que les bactéries capables de vivre dans des niches écologiques diverses codent davantage de gènes de TCSTS que les organismes vivant dans des environnements limités (Galperin, 2005 ; Rodrigue *et al.*, 2000). Moins de 10% des TCSTS des *Xanthomonas* ont à ce jour été documentés quant à leur rôle et leur fonction (Qian *et al.*, 2008).

1.3 Structure et fonction des histidine kinases

L'autophosphorylation des histidine kinases

Qu'ils soient d'origine procaryote ou eucaryote les senseurs histidine kinases ont les mêmes caractéristiques : un domaine senseur très variable d'un système à un autre et un domaine kinase fortement conservé chez tous les systèmes des différents domaines du vivant. L'activité générale de la kinase est modulée par le signal perçu au niveau du domaine senseur.

L'autophosphorylation du senseur est un processus bimoléculaire impliquant des homodimères. Un monomère d'histidine kinase catalyse la phosphorylation du résidu histidine conservé d'un second monomère d'histidine kinase (Surette *et al.*, 1996).

Le contrôle des systèmes à deux composants classiques est opéré par la kinase et par sa capacité ou non à phosphoryler le régulateur. De nombreuses histidine kinases possèdent une activité phosphatase leur permettant de déphosphoryler le régulateur auquel elles sont associées (Keener and Kustu, 1988). Ce rôle bifonctionnel des histidine kinases est plus communément utilisé dans les systèmes ayant besoin d'être éteints très rapidement, pour répondre à un stimulus de manière très brève.

Kinases orthodoxes et kinases hybrides

Deux types de kinases existent : les kinases dites orthodoxes et les kinases hybrides. La majorité des kinases orthodoxes fonctionne comme des récepteurs membranaires périplasmiques (Figure 11). L'exemple le plus étudié est la kinase EnvZ de *E. coli*, senseur de l'osmolarité chez cette bactérie. Ce senseur possède deux domaines transmembranaires qui séparent la protéine en un domaine senseur périplasmique, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, et un domaine cytoplasmique contenant le domaine catalytique de la kinase et correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ce type de kinase avec deux domaines transmembranaires est le plus courant. D'autres kinases présentent de multiples domaines transmembranaires alors qu'au contraire d'autres senseurs ne sont pas du tout liés à la membrane plasmique de la bactérie, ce sont des kinases cytoplasmiques solubles. C'est le cas de la kinase impliquée dans la régulation de la chimiotaxie chez *E. coli*, CheA, ou encore de NtrB, kinase contrôlant les apports en azote (Stock *et al.*, 1988 ; MacFarlane and Merrick, 1985). Les kinases solubles peuvent être régulées soit par des stimuli intracellulaires, soit en interaction avec d'autres protéines membranaires.

Le second type de kinase, les kinases hybrides, est retrouvé dans quelques cas chez les procaryotes et représente la quasi-totalité des systèmes à deux composants chez les eucaryotes (Figure 11B et 11C). Ces protéines kinases ont la particularité de contenir plusieurs sites donneurs et accepteurs de groupements phosphoryls. La transduction du signal ne se fait donc pas via une seule étape de phosphotransfert mais implique au contraire tout un relais de phosphorylation en plusieurs étapes (Figure 11). C'est le cas du senseur GacS qui a été présenté précédemment.

Les différents domaines des histidine kinases

Les histidine kinases présentent trois domaines caractéristiques : le domaine kinase, le domaine senseur et un domaine de liaison entre ces deux parties. Le domaine kinase est long de plus de 350 acides aminés, c'est la partie la plus conservée de la protéine. Les éléments structurels retrouvés chez les histidine kinases sont un domaine de dimérisation et un site de liaison d'ATP ou un domaine catalytique. Le site de fixation de l'ATP forme une poche très flexible reflétant les changements conformationnels subis par la protéine lors de sa phosphorylation. L'histidine conservée et phosphorylée est située dans la plupart des cas dans le domaine de dimérisation de la protéine.

Au contraire des domaines kinases, les domaines senseurs sont très peu conservés renforçant l'idée que chaque régulateur répond à un stimulus particulier, c'est-à-dire que chaque domaine senseur correspond à une interaction avec un ligand spécifique. Cette caractéristique est vérifiée aussi bien lorsque le signal environnemental extracellulaire est

perçu de manière directe par le domaine senseur que lorsqu'il est perçu de manière indirecte (cas des kinases cytoplasmiques solubles).

Peu d'éléments sont connus sur le domaine de liaison entre le domaine senseur et le domaine catalytique. La taille de cette région est très variable : de 40 jusqu'à plus de 180 acides aminés (Fabret *et al.*, 1999) et cette région semble avoir un rôle important pour la transduction correcte du signal.

1.4 Structure et fonction des régulateurs RRs

La plupart des régulateurs sont formés de deux domaines : un domaine receveur N-terminal conservé qui reçoit le signal transmis par le senseur kinase et un domaine C-terminal plus variable ayant un rôle effecteur. Comme pour les kinases, ces deux domaines sont séparés par un domaine de liaison.

Domaine receveur et phosphorylation des régulateurs RRs

Dans les systèmes à deux composants procaryotes, les régulateurs sont le dernier relais de transduction du signal. Ces régulateurs fonctionnent comme des interrupteurs qui, activés par phosphorylation, répondent au signal perçu par le senseur. Le régulateur catalyse le transfert du groupement phosphoryl de l'histidine de la kinase à une aspartate conservée de son domaine receveur. Dans certains cas, les régulateurs n'ont pas besoin d'une histidine kinase pour être phosphorylés. Des petites molécules telles que les acétyl phosphates, les carbamoyl phosphates, les imidazole phosphates et les phosphoramidates peuvent servir de donneurs de groupements phosphoryls aux régulateurs (Lukat *et al.*, 1992).

Les domaines receveurs sont présents à l'équilibre entre forme active et forme non active, la phosphorylation du domaine receveur perturbe l'équilibre vers la forme active. Le site actif du domaine receveur est constitué de cinq acides aminés fortement conservés : trois résidus aspartate lient un ion divalent nécessaire au groupement phosphoryl, un de ces résidus aspartate est également le site de phosphorylation ; un résidu lysine et un résidu thréonine ou sérine sont nécessaires à la transduction du signal (Bourret and Silversmith, 2010).

De la même manière que pour les kinases, la phosphorylation des régulateurs induit un changement conformationnel affectant une grande partie du régulateur. Ce changement de conformation facilite les interactions inter ou intramoléculaires par lesquelles la réponse du régulateur est engendrée. La phosphorylation peut entraîner la dimérisation, l'oligomérisation

ou les interactions avec d'autres protéines. Certaines protéines utilisent une combinaison de ces mécanismes (Stock *et al.*, 2000).

Cependant la phosphorylation n'est pas toujours nécessaire à l'activation des régulateurs de réponse. En effet, plusieurs régulateurs présentant un domaine receveur atypique ont été mis en évidence. Pour ces régulateurs, la séquence en acides aminés et la structure tridimensionnelle sont similaires à celles connues pour les domaines receveurs classiques. Cependant, il manque un (ou plusieurs) acide aminé dans le site actif très conservé du domaine receveur ; qu'ils possèdent ou non le site de phosphorylation (le résidu aspartate) ces domaines pseudo-receveurs fonctionnent sans doute indépendamment de toute phosphorylation (Bourret and Silversmith, 2010).

Domaine effecteur des régulateurs RRs

Les domaines effecteurs des régulateurs sont très divers. La majorité des domaines effecteurs sont des facteurs de transcription ayant un site de liaison avec l'ADN : sur les 32 régulateurs de système à deux composants identifiés chez *E. coli*, 25 possèdent une activité transcriptionnelle (Mizuno, 1997). La structure du domaine de liaison à l'ADN a permis de définir trois familles de régulateurs représentées par OmpR, famille la plus large, NarL et NtrC (Stock *et al.*, 1989 ; Mizuno, 1997 ; Albright *et al.*, 1989). Les séquences ADN reconnues, les arrangements des sites de liaison et les mécanismes spécifiques de régulation transcriptionnelle diffèrent d'un régulateur à un autre ainsi qu' au sein d'une même famille de régulateurs.

L'analyse de différents régulateurs a montré une grande complexité dans les modes de fonctionnements de ces facteurs transcriptionnels. Les différences les plus importantes dans le fonctionnement des régulateurs RRs viennent de la manière subtile avec laquelle la dimérisation, l'autoinhibition par le domaine receveur et l'activation par la phosphorylation affectent les fonctions de sortie du régulateur. Pour mieux comprendre ces variations il est important de déterminer de quelle manière l'activation du domaine receveur par phosphorylation est transmise au domaine C-terminal. Le domaine de liaison joue un rôle important dans cette transmission du signal du domaine N-terminal au domaine C-terminal. Le domaine de liaison est adapté à chaque régulateur et à son mode de fonctionnement (Walthers *et al.*, 2003).

D'autres domaines effecteurs existent n'impliquant pas de liaison à l'ADN ; il peut s'agir de domaines de liaison à l'ARN, de liaison à une protéine ou de domaine transporteur. La réponse apportée par les régulateurs RRs n'est donc pas toujours exercée au niveau transcriptionnel mais peut être également post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle (Galperin, 2010). Dans certains cas, les domaines effecteurs sont des enzymes qui

OmpR	F1	<u>A</u> CTTTTGGTT <u>A</u> CATATTT
	F2	TCTTTTTGAA <u>A</u> CCAAATC
	F3	TATCTTTGTAG <u>C</u> ACTTTC
	F4	TTACATTGCA <u>A</u> CATTTAC
	C1	<u>A</u> CATTTTGA <u>A</u> CATCTAT
	C2	GATAAATGAA <u>A</u> CATCTTA
	C3	<u>A</u> GTTTTAGTAT <u>C</u> ATATTC
PhoB	CTGTCATA (A/T) A (T/A) CTGTC A (C/T)	
Current Opinion in Microbiology		

Figure 12. Séquences de reconnaissance des régulateurs OmpR et PhoB

Alignement des séquences de liaison du régulateur OmpR dans les promoteurs *ompF* et *ompC*. Les sites de liaison font approximativement 18 paires de base, composés de deux demi-sites, un monomère de OmpR se lie à chacun des sites. Les sites sont très peu conservés mais partagent quelques caractéristiques notamment le motif GXXXC présent dans tous les sites de liaison. Les deux paires « AC » (soulignées) sont les plus importantes pour la fixation de OmpR au site de liaison *in vivo*.

Les régions promotrices des gènes *pho* sont plus conservées et partagent un élément régulateur commun, la boîte *pho*, séquence de 18 nucléotides. PhoB se lie à la séquence TGTC**A** et chaque boîte *pho* contient deux sites de liaison. Ces sites de liaison sont situés 10 nucléotides en amont de la région -10.

(D'après Kenney, 2002)

participent elles-mêmes à des mécanismes de transduction de signal. C'est le cas des domaines effecteurs GGDEF, EAL ou HD-GYP. Ces domaines sont impliqués dans le contrôle du niveau de di-GMP cyclique cellulaire, un messager secondaire modulant de nombreux processus cellulaires bactériens (Galperin, 2010).

1.5 *Phosphorylation, dimérisation, oligomérisation et liaison à l'ADN : le cas des régulateurs OmpR et PhoB*

Présentation des régulateurs OmpR et PhoB

Le régulateur de réponse à l'osmolarité (OmpR) est associé chez *E. coli* au senseur EnvZ ; ce système a été très bien caractérisé. Le régulateur OmpR fonctionne à la fois comme répresseur et comme activateur pour contrôler différenciellement l'expression de ses gènes cibles *ompF* et *ompC*, gènes codant pour des porines (Head *et al.*, 1998).

PhoB est un autre régulateur d'un système à deux composants d'*E. coli* agissant en réponse à des carences en phosphate et contrôlant la transcription d'une quarantaine de gènes. PhoB et OmpR appartiennent à la même famille ; pourtant ils utilisent des mécanismes différents pour contrôler leur domaine effecteur. La phosphorylation de OmpR dans son domaine receveur augmente l'affinité de la liaison entre l'ADN et la protéine au niveau C-terminal ; au contraire la phosphorylation de PhoB en N-terminal supprime l'inhibition du domaine C-terminal par le domaine N-terminal, lui permettant de se fixer à l'ADN cible (Walthers *et al.*, 2003).

Structure de OmpR et mécanisme d'activation transcriptionnelle

OmpR possède un domaine Hélice-Tour-Hélice de fixation à l'ADN dans son extrémité C-terminale. Le tour du domaine HTH du régulateur OmpR est inhabituellement grand puisqu'il est composé de 10 acides aminés contre 3 à 4 acides aminés pour les autres tours des domaines HTH. L'hélice de reconnaissance est également plus grande que ce qui est observé pour les autres domaines HTH ; les deux extrémités de l'hélice sont impliquées dans la liaison à l'ADN.

La séquence d'ADN promotrice sur laquelle se fixe OmpR a été identifiée (Figure 12), il s'agit d'une séquence d'environ 20 nucléotides et qui contient une séquence répétitive de 10 nucléotides (Rampersaud *et al.*, 1989). OmpR a plus d'affinité pour les sites situés dans le promoteur de *ompF* que ceux situés dans le promoteur *ompC*. OmpR est capable de reconnaître ces séquences promotrices en l'absence de phosphorylation. La phosphorylation

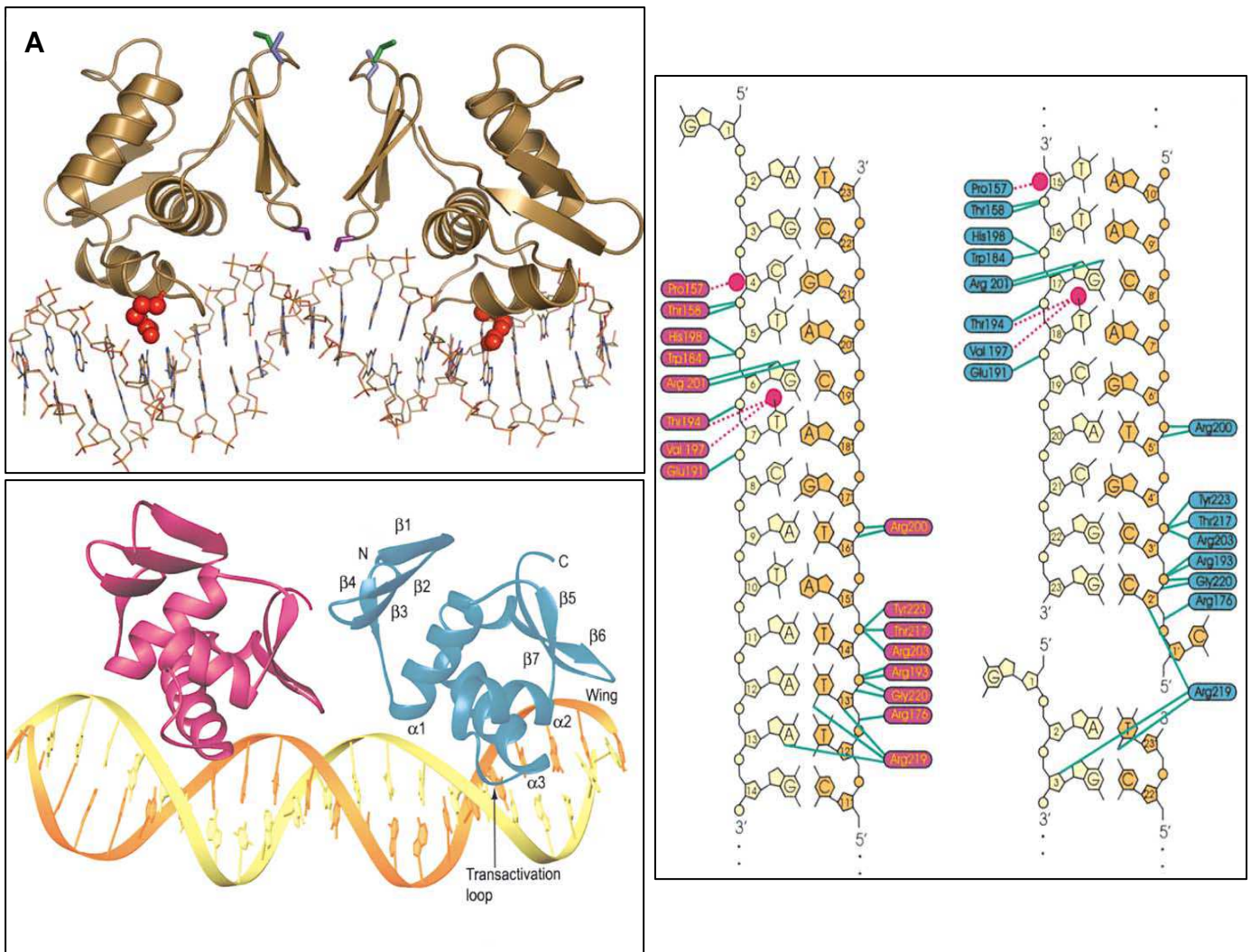


Figure 13. Interactions des régulateurs OmpR et PhoB avec leurs cibles respectives

A. Modèle du complexe OmpR/ADN en orientation « head to head ». Représentation en ruban du dimère protéique OmpR interagissant avec son ADN cible.

(Maris *et al.*, 2005)

B. Modèle du complexe PhoB/ADN en orientation « head to tail ». Représentation en ruban du dimère protéique PhoB interagissant avec son ADN cible, le monomère en violet interagit avec le promoteur amont et le monomère bleu avec le promoteur aval. Le brin d'ADN jaune représente le brin codant et le brin orange représente le brin complémentaire.

C. Schéma des interactions entre deux monomères de la protéine PhoB avec la boîte *pho*. Les lignes vertes représentent des ponts hydrogène, les points rouges indiquent les contacts Van der Waals.

(D'après Blanco *et al.*, 2002)

de OmpR stimule de manière drastique l'affinité de son domaine C-terminal pour l'ADN des promoteurs de *ompF* et *ompC*, effaçant les différences d'affinité de OmpR pour ses deux séquences promotrices (Head *et al.*, 1998).

OmpR est présent en tant que monomère en solution mais il a été montré qu'il se lie à l'ADN sous forme de dimère. La dimérisation de OmpR est stimulée soit par la phosphorylation soit par la liaison du régulateur à l'ADN (Maris *et al.*, 2005). OmpR se lie à l'ADN dans une orientation « head-to-head » mais il n'est pas exclu que la protéine utilise différentes orientations en fonction du promoteur auquel elle se lie et de son rôle d'activateur ou de répresseur (Maris *et al.*, 2005) (Figure 13A).

Structure de PhoB et mécanisme d'activation transcriptionnelle

PhoB possède également un domaine HTH, le tour de ce domaine HTH est plus petit que celui de OmpR de telle manière que l'hélice de reconnaissance est plus grande que celle du régulateur OmpR (Okamura *et al.*, 2000).

La phosphorylation de PhoB est apportée par la kinase qui lui est associée, PhoR, mais ce régulateur peut également être phosphorylé en présence d'acétylphosphate (McCleary, 1996). La forme phosphorylée de PhoB se lie beaucoup plus fortement à l'ADN cible que la protéine non phosphorylée. L'interaction entre PhoB et l'ADN cible se fait en tandem, c'est-à-dire que plusieurs monomères de PhoB se fixent sur des séquences directement répétées de 11 pb en orientation « head-to-tail » (Figure 13B et 13C). Cette oligomérisation de PhoB permet le recouvrement de tout un côté du double brin d'ADN. Il a également été montré que la liaison de PhoB avec son promoteur cible stabilise le domaine de transactivation du régulateur.

1.6 Le cas particulier des régulateurs orphelins

Dans la plupart des cas, les deux gènes codant pour les systèmes à deux composants, le gène codant pour l'histidine kinase et le gène codant pour le régulateur, sont situés côte à côte ou dans un voisinage proche dans le génome des bactéries (Raghavan and Groisman, 2010). Des régulateurs dont la structure correspond à celle des régulateurs de TCSTS, c'est-à-dire avec un domaine receveur, un domaine de liaison et un domaine de transactivation, ont été identifiés et étudiés chez la bactérie *Helicobacter pylori* et la bactérie *Francisella tularensis*, deux bactéries pathogènes de l'homme. Ces régulateurs ont été particulièrement étudiés car ils ont des rôles importants dans la croissance de la bactérie ou dans la

régulation de la virulence et que les gènes codant pour ces régulateurs ne sont pas associés au niveau génomique à un gène codant pour un senseur histidine kinase. Ces régulateurs correspondant à des régulateurs de TCSTS sans histidine kinase associée ont été nommés « régulateurs orphelins » (Schär *et al.*, 2005 ; Bell *et al.*, 2010). Des « régulateurs orphelins » ainsi que des « senseurs orphelins » sont souvent rencontrés dans les génomes bactériens, mais leur proportion par rapport aux systèmes à deux composants entiers est très variable d'une bactérie à une autre (Raghavan and Groisman, 2010).

Le génome de la bactérie *H. pylori* présente la particularité de comporter un nombre remarquablement faible de gènes régulateurs. Parmi ces régulateurs, on compte trois systèmes à deux composants et deux régulateurs orphelins : HP1043 et HP1021. HP1043 est essentiel à la croissance de la bactérie et un mutant *hp1021* présente une croissance limitée. La séquence du domaine receveur de ces deux régulateurs diffère de celles couramment observées (Schär *et al.*, 2005). Ces deux régulateurs n'ont pas besoin d'être sous forme phosphorylée pour être actifs. La structure de HP1043 a été étudiée par résonance magnétique nucléaire et a montré que la topologie moléculaire de la protéine ressemble à celle des régulateurs de type OmpR. L'interface nécessaire à la dimérisation de HP1043 ressemble à la forme active et phosphorylée de la protéine PhoB indiquant que le dimère formé par HP1043 est stable en l'absence de phosphorylation, contrairement aux régulateurs classiques des TCSTS (Hong *et al.*, 2007). La manière dont le régulateur HP1043 est activé reste encore inconnue, il semble que des mécanismes transcriptionnels mais aussi des mécanismes post-transcriptionnels ou post-traductionnels soient impliqués dans cette activation (Müller *et al.*, 2007).

L'étude d'un autre régulateur de *H. pylori* appartenant également aux TCSTS et étant associé à un senseur histidine kinase a montré que la phosphorylation de ce régulateur par la kinase associée n'est pas nécessaire à son activation. Ce régulateur contrôle l'expression de deux groupes de gènes, l'un nécessitant sa phosphorylation et l'autre étant régulé par la protéine non phosphorylée. La phosphorylation ou non de ce régulateur apparaît donc comme un moyen de contrôler l'expression de deux groupes de gènes différents (Schär *et al.*, 2005).

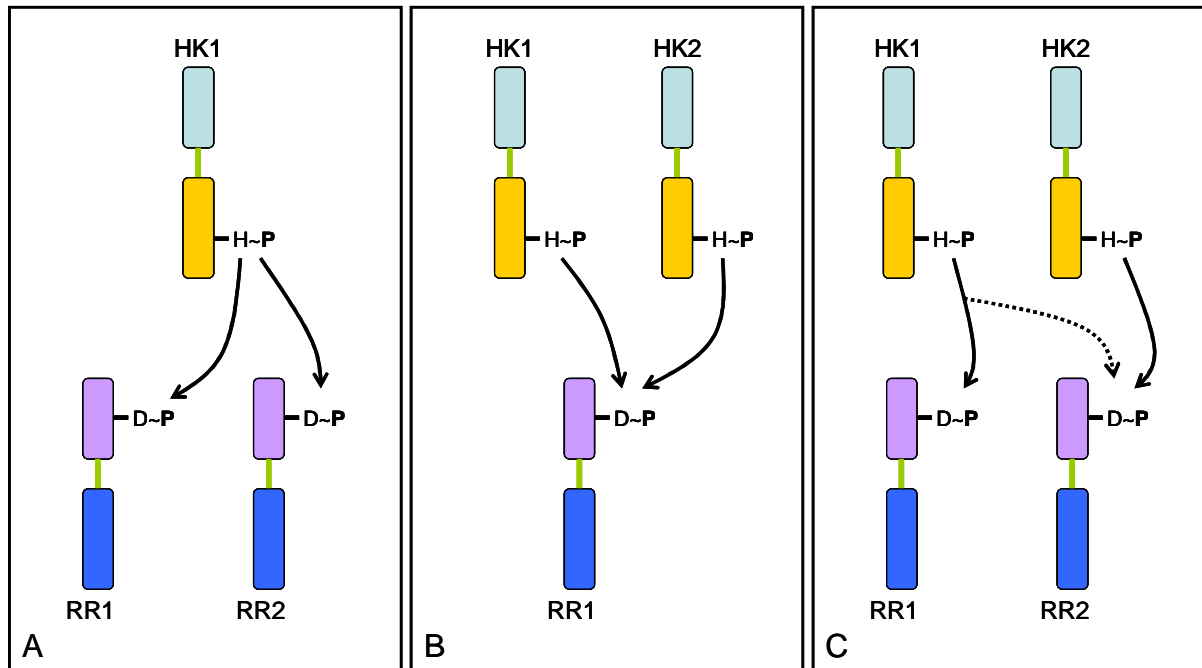


Figure 14. Schéma des dialogues possibles entre les TCSTS

A. Dialogue de type « un vers plusieurs » : une histidine kinase (HK) transmet son groupement phosphoryl à plusieurs régulateurs de réponse RR. C'est le cas de la régulation de la chimiotaxie chez *E. coli* : la kinase CheA phosphoryle les régulateurs CheY et CheB.

B. Dialogue de type « plusieurs vers un » : plusieurs histidine kinases (HK) transmettent leur groupement phosphoryl à un seul régulateur de réponse RR. C'est le cas de la régulation de la sporulation chez *B. subtilis* : les kinases KinA, KinB, KinC, KinD et KinE peuvent toutes phosphoryler le régulateur Spo0F.

C. Dialogue de type « Cross-Talk » : une histidine kinase (HK) transmet son groupement phosphoryl à un régulateur de réponse RR auquel elle n'est pas associée (flèche en pointillé). Si ce dialogue est aboli, les deux autres voies restent intactes (contrairement au cas A et B). A la différence des deux premiers cas, ce type de dialogue peut être détrimentaire pour la cellule.

Le code couleur utilisé pour les différents domaines des HKs et des RRs est identique à celui utilisé dans la figure 11.

2. Les dialogues entre systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants d'une même famille partagent une certaine homologie au niveau de leur séquence primaire mais aussi au niveau structurel. La similarité de ces protéines impliquées dans la signalisation cellulaire soulève la possibilité de dialogues entre les différents systèmes à deux composants. L'existence de dialogues a souvent été suggérée mais il est plus difficile de déterminer si de tels dialogues ont réellement lieu *in vivo*.

2.1 Les différents types de dialogues impliquant le transfert du groupement phosphoryl

La transduction du signal des systèmes à deux composants est établie par le transfert d'un groupement phosphoryl du senseur au régulateur associé. Ce transfert permet la possibilité de dialogues entre les différents systèmes (Figure 14).

Activation de plusieurs régulateurs par un seul senseur histidine kinase

Dans certains cas une même kinase peut activer plusieurs régulateurs en transférant son groupement phosphoryl à des régulateurs différents (Figure 14A). C'est le cas de la régulation de la chimiotaxie chez *Escherichia coli*. Cette régulation implique le senseur histidine kinase CheA. CheA peut transférer son groupement phosphoryl à deux régulateurs différents : CheY et CheB. La phosphorylation de CheY permet la liaison de CheY sur le promoteur de *flhM*, gène codant pour le moteur flagellaire, engendrant la motilité par « swimming » (Welch *et al.*, 1993). La phosphorylation de CheB améliore son activité de méthylestérase pour les chimiorécepteurs qui sont primordiaux pour une adaptation précise de la motilité (Anand *et al.*, 1998).

Ce type de dialogue est bénéfique à la bactérie et permet d'adapter plus précisément la réponse au stimulus perçu par la protéine senseur.

Activation d'un même régulateur par plusieurs histidine kinases

Ce type de dialogue permet d'intégrer plusieurs signaux au niveau d'un même régulateur (Figure 14B). C'est le cas de la régulation de la sporulation chez *Bacillus subtilis*, une bactérie du sol. La régulation de la sporulation et de l'entrée en phase stationnaire fait

intervenir cinq histidine kinases (KinA, KinB, KinC, KinD et KinE) qui sont toutes capables de phosphoryler le régulateur Spo0F (Jiang *et al.*, 2000).

Ce mécanisme est également retrouvé chez *Vibrio harveyi*, une bactérie marine luminescente, dans la régulation du quorum sensing. Dans ce système, trois histidine kinases de type hybride (LuxN, LuxQ et CqsS) transfèrent leur groupement phosphoryl à une même histidine phosphotransférase, LuxU, qui va ensuite phosphoryler un seul régulateur LuxO (Henke and Bassler, 2004). Chacune des histidine kinases impliquées dans ce système répond à un signal différent.

Les « cross-talks »

Les « cross-talks » désignent un type de dialogue bien spécifique (Figure 14C). Ces dialogues ont lieu lorsqu'un senseur phosphoryle un régulateur auquel il n'est pas associé, alors que ce régulateur est habituellement associé à un autre senseur. Il s'agit donc de la communication entre deux voies distinctes. A la différence des autres exemples de dialogues, si le « cross-talk » est aboli, c'est-à-dire si la kinase ne peut plus phosphoryler le régulateur, alors les deux voies impliquées restent intactes et fonctionnelles.

Ce type de « cross-talks » peut également être provoqué par la phosphorylation par des petites molécules donneuses de phosphate telles que les acétyl phosphates (Wolfe, 2005). Les acétyl phosphates sont très sensibles au statut métabolique de la cellule et il est possible que ces molécules fonctionnent comme un signal global qui pourrait être intégré dans de nombreux systèmes à deux composants en phosphorylant différents régulateurs. Cependant, dans la plupart des cas, les effets des acétyl phosphates sur les régulateurs ont uniquement été observés en l'absence de la protéine kinase associée.

En général, les « cross-talks » entre des voies différentes doivent être les plus restreints possibles, sinon l'organisme risque de ne plus pouvoir adopter les réponses les plus appropriées au stimulus spécifique reçu. Ces « cross-talks » diffèrent des autres cas présentés qui peuvent dans certaines conditions être bénéfiques à l'organisme en permettant d'intégrer différents signaux ou de diversifier les réponses au signal environnemental perçu (Wanner, 1992).

2.2 Les mécanismes de limitations des « cross-talks »

Les « cross-talks » au sens strict peuvent donc être défavorables à la cellule et brouiller les signaux perçus ou les réponses engagées à des signaux précis. C'est pourquoi plusieurs mécanismes existent pour limiter ces « cross-talks ».

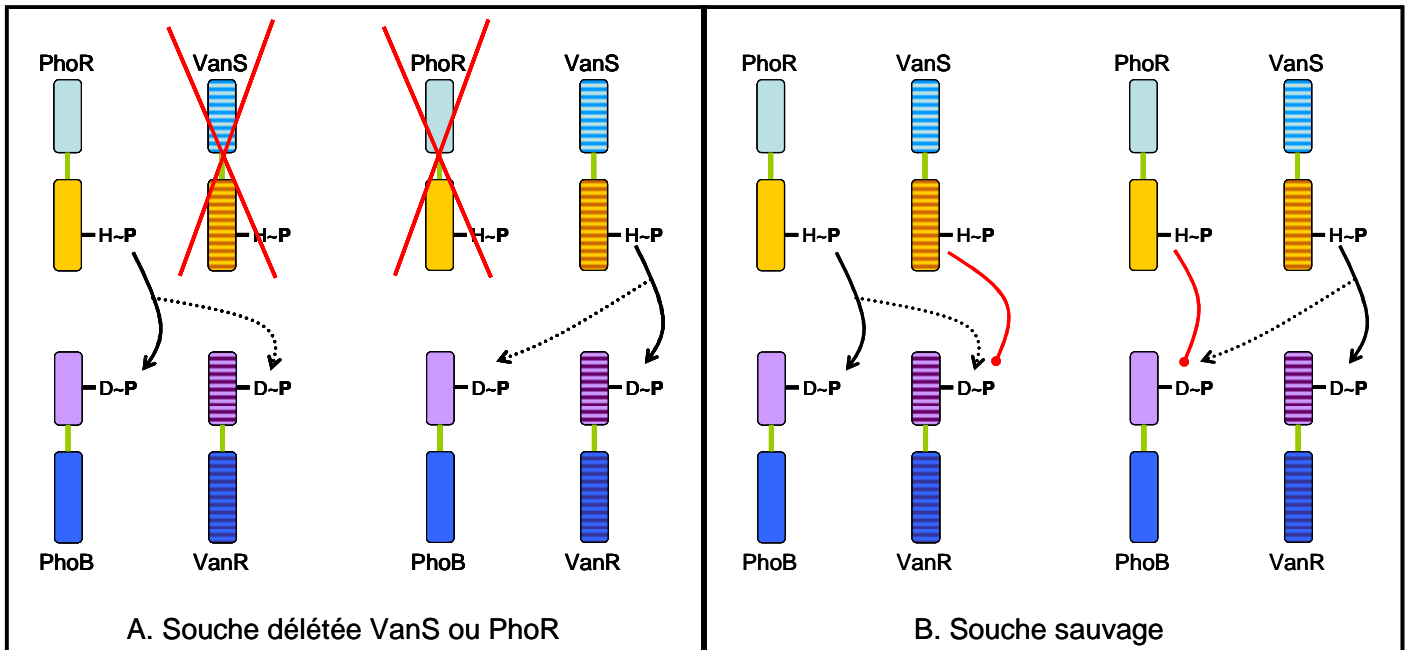


Figure 15. Mécanismes de limitations des « cross-talks » par l'activité phosphatase des histidine kinases

A. Dans un mutant délété pour une des histidine kinases, l'autre histidine kinase transmet son groupement phosphoryl au régulateur auquel elle n'est pas associée, on parle de « cross-phosphorylation » (flèche en pointillé). Cette « cross-phosphorylation » est en général défavorisée par la préférence de la kinase pour le régulateur auquel elle est associée.

B. Cette « cross-phosphorylation » est abolie dans la souche sauvage par l'activité phosphatase de la kinase associée au régulateur, supprimant la « cross-phosphorylation ».

Le code couleur utilisé pour les kinases HKs et les régulateurs RRs est le même que dans les figures précédentes. Les flèches rouges se terminant par un point représentent l'activité phosphatase.

Dans la plupart des cas, les « cross-talks » ont été observés en introduisant une perturbation dans les systèmes habituels et il semble peu probable qu'ils existent ou soient physiologiquement révélateurs chez les organismes sauvages.

L'étude des systèmes PhoR/PhoB et VanS/VanR, TCSTS respectivement impliqués dans la réponse aux carences en phosphate et dans la résistance à la vancomycine, a permis de mettre en évidence les mécanismes mis en place par la cellule pour éviter les « cross-talks » (Figure 15) (Silva *et al.*, 1998). Il a été montré que la phosphorylation du régulateur PhoB par VanS peut avoir lieu, mais uniquement lorsque PhoR, la protéine kinase associée à PhoB est absente. De la même manière, la kinase PhoR peut phosphoryler le régulateur VanR mais uniquement en l'absence de VanS, son senseur associé (Silva *et al.*, 1998) (Figure 15A). Le fait que les senseurs kinase aient également une activité phosphatase laisse penser que les « cross-talks » observés entre les systèmes VanS/VanR et PhoR/PhoB sont inhérents à l'absence d'activité phosphatase due à l'absence du senseur associé dans chacun des cas énoncés (Figure 15B). En fait, toute « cross-phosphorylation » non voulue de PhoB par VanS est éliminée par l'activité phosphatase du senseur associé, PhoR. De la même manière, toute « cross-phosphorylation » non voulue de VanR par PhoR est éliminée par l'activité phosphatase du senseur associé, VanS. Ce mécanisme de prévention des « cross-talks » utilisant la bifonctionnalité des senseurs kinase et leur activité phosphatase pour le régulateur auxquels ils sont associés semble être un phénomène général et a été observé dans plusieurs systèmes (Laub and Goulian, 2007).

En plus de l'activité phosphatase des senseurs, une compétition existe entre les senseurs pour les régulateurs. En effet, les « cross-talks » observés par phosphorylation de PhoB par le senseur VanS sont plus importants en l'absence de PhoR mais également en l'absence de VanR, c'est-à-dire qu'en l'absence de son régulateur associé VanR, le senseur VanS va phosphoryler une autre protéine régulatrice, PhoB. En revanche, aucun « cross-talk » n'a pu être observé en présence des deux régulateurs. Cette observation suggère que le régulateur est favorisé par son senseur associé par rapport à un autre régulateur.

Il a souvent été observé *in vitro* que les histidine kinases sont capables de phosphoryler un grand nombre de régulateurs. Cependant, elles présentent une préférence cinétique remarquable pour le régulateur auquel elles sont associées. *In vivo* les histidine kinases ont une capacité intrinsèque à discriminer leur régulateur associé par rapport aux autres régulateurs.

L'observation de la phosphorylation de régulateurs non associés à des histidine kinases *in vitro* est souvent liée à la surexpression de l'histidine kinase. *In vivo*, les histidine kinases activées par phosphorylation sont présentes en faible concentration, limitant encore les risques de « cross-talks » (Laub and Goulian, 2007). Les « cross-talks » non contrôlés

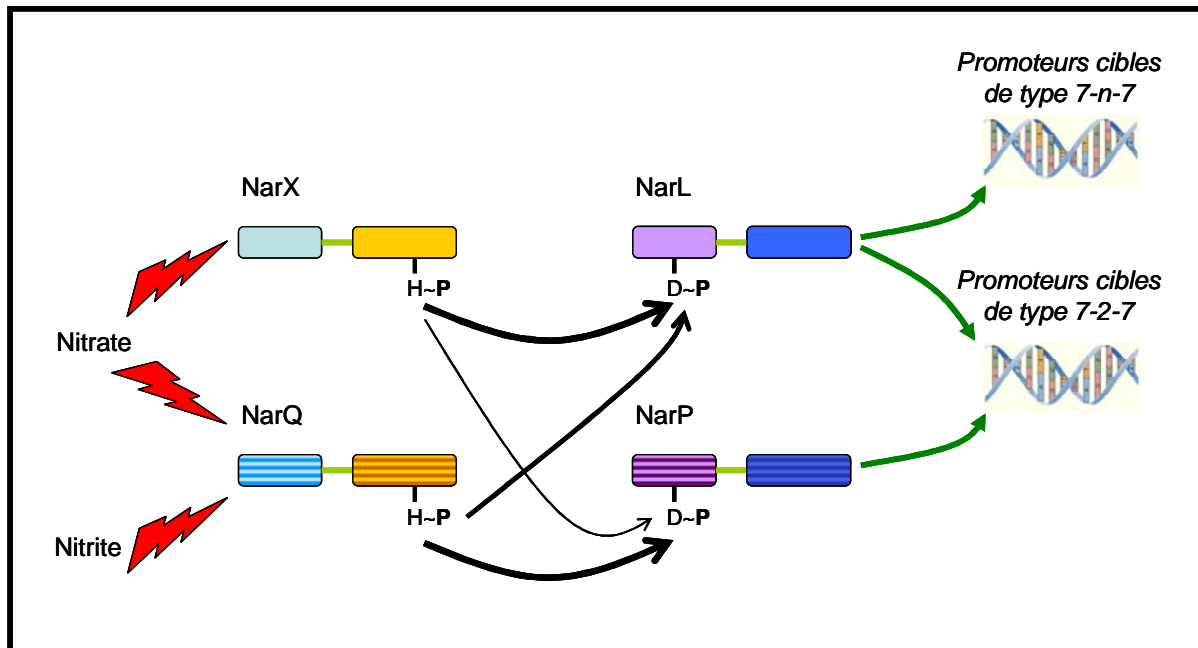


Figure 16. Mécanismes de NarQ/NarP et NarQ/NarL, deux systèmes impliqués dans la régulation de la respiration anaérobie chez *E. coli*

Le senseur histidine kinase NarX est activé par le nitrate et transmet son groupement phosphoryl au régulateur de réponse NarL. L'affinité de NarX pour NarL est beaucoup plus faible. Le senseur histidine kinase NarQ est activé à la fois par le nitrate et le nitrite et transmet son groupement phosphoryl à NarL et NarP avec une légère préférence cinétique pour NarP.

NarP et NarL reconnaissent la même séquence heptamérique. NarP se fixe uniquement sur les sites avec des séquences heptamériques en répétition inverse séparée de 2 pb. NarL est capable de reconnaître d'autres types d'arrangements du promoteur et peut donc se lier à d'autres promoteurs cibles que NarP.

Les épaisseurs des flèches noires indiquent l'affinité du senseur histidine kinase pour le régulateur. Les flèches vertes indiquent une activation transcriptionnelle.

semblent donc être des phénomènes peu communs *in vivo* et très limités par la compétition entre les systèmes et par l'activité phosphatase des senseurs.

Il existe cependant quelques situations pour lesquelles la «cross-phosphorylation» entre deux TCSTS a été identifiée. C'est le cas de la régulation des gènes impliqués dans la respiration anaérobie chez *E. coli*. En conditions anaérobiques, *E. coli* respire en utilisant le nitrate ou le nitrite comme accepteur final d'électrons. Deux histidine kinases, NarX et NarQ, et deux régulateurs, NarL et NarP, sont impliqués dans la régulation de ce mécanisme. NarX est activée préférentiellement par le nitrate et active NarL par phosphorylation préférentiellement à NarP. NarQ est stimulée à la fois par le nitrite et le nitrate et phosphoryle à la fois NarL et NarP, même s'il présente une très légère préférence pour NarP (Noriega *et al.*, 2010) (Figure 16). Ainsi la discrimination entre la perception du nitrate et celle du nitrite se fait uniquement par l'intermédiaire de NarX pour induire la réponse la plus appropriée.

2.3 Les autres types de dialogues, n'impliquant pas le transfert du groupement phosphoryl

D'autres types de dialogues peuvent avoir lieu entre systèmes à deux composants n'impliquant pas le transfert du groupement phosphoryl du senseur au régulateur. C'est le cas de la régulation croisée ou «cross-regulation», c'est-à-dire lorsque plusieurs régulateurs (déjà activés) reconnaissent la même séquence d'ADN. C'est le cas de NarL et NarP qui partagent certains gènes cibles communs. NarL et NarP se lient à la même séquence consensus, un heptamère nucléotidique, pourtant NarL régule l'expression de certains gènes qui ne sont pas reconnus par NarP. En fait, NarP ne reconnaît que les séquences organisées en répétition inversée avec un espacement de 2 pb entre les répétitions (les sites 7-2-7) alors que NarL est capable de reconnaître et de se lier à d'autres types d'arrangement des séquences heptamériques (Darwin *et al.*, 1997) (Figure 16). Les deux TCSTS impliqués dans la respiration anaérobie de *E. coli* montrent au moins deux niveaux d'interaction : la «cross-phosphorylation» et une régulation différentielle des promoteurs du régulon Nar. Ces deux niveaux d'interaction permettent une régulation très fine, en réponse à des niveaux très variables de nitrate.

Il devient également de plus en plus évident que les différentes voies de système de régulation à deux composants convergent au niveau de la transcription des gènes cibles, de

telle manière que des régulateurs issus de différentes voies contrôlent l'expression de groupes de gènes en commun. Pour exemple, les régulateurs PmrA et RcsB de *Salmonella* appartiennent à des voies de TCSTS différentes puisqu'ils répondent tous deux à des signaux distincts et sont activés par des kinases différentes. Pourtant ils activent tous deux l'expression des gènes *ugd* et *wzz* impliqués dans la composition en lipopolysaccharide de la membrane externe. Le contrôle de l'expression de ces gènes par PmrA et RcsB se fait par reconnaissance de deux séquences *cis*-régulatrices différentes au sein des promoteurs (Mousslim and Groisman, 2003).

Une analyse systématique par hybridation transcriptomique de tous les mutants de gènes impliqués dans des systèmes à deux composants a été entreprise chez *E. coli* (Oshima *et al.*, 2002). Les résultats obtenus suggèrent un recouvrement non négligeable des gènes cibles des différents TCSTS. Une approche identique a été menée au niveau protéique en analysant de manière systématique par FRET (Förster resonance energy transfer) tous les régulateurs appartenant à la famille OmpR/PhoB chez *E. coli*. Les interactions mises en évidence ont confirmé la formation d'homodimères par les régulateurs lorsqu'ils sont activés. D'autres interactions, plus faibles, ont été identifiées entre différents régulateurs suggérant la possibilité de formation d'hétérodimères entre régulateurs appartenant à des voies TCSTS différentes (Gao *et al.*, 2008).

Ces données indiquent donc que les systèmes à deux composants sont souvent arrangés dans des circuits sophistiqués régis par des interactions entre les différents systèmes possibles à plusieurs niveaux. Les différents systèmes de régulation croisée mis en évidence donnent à la cellule la capacité d'intégrer des informations complexes et d'y répondre de manière adaptée et précise.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I.

**Caractérisation d'un nouvel activateur
transcriptionnel positif des gènes de la pathogénie
chez *Ralstonia solanacearum***

CHAPITRE I.

**Caractérisation d'un nouvel activateur
transcriptionnel positif des gènes de la pathogénie
chez *Ralstonia solanacearum***

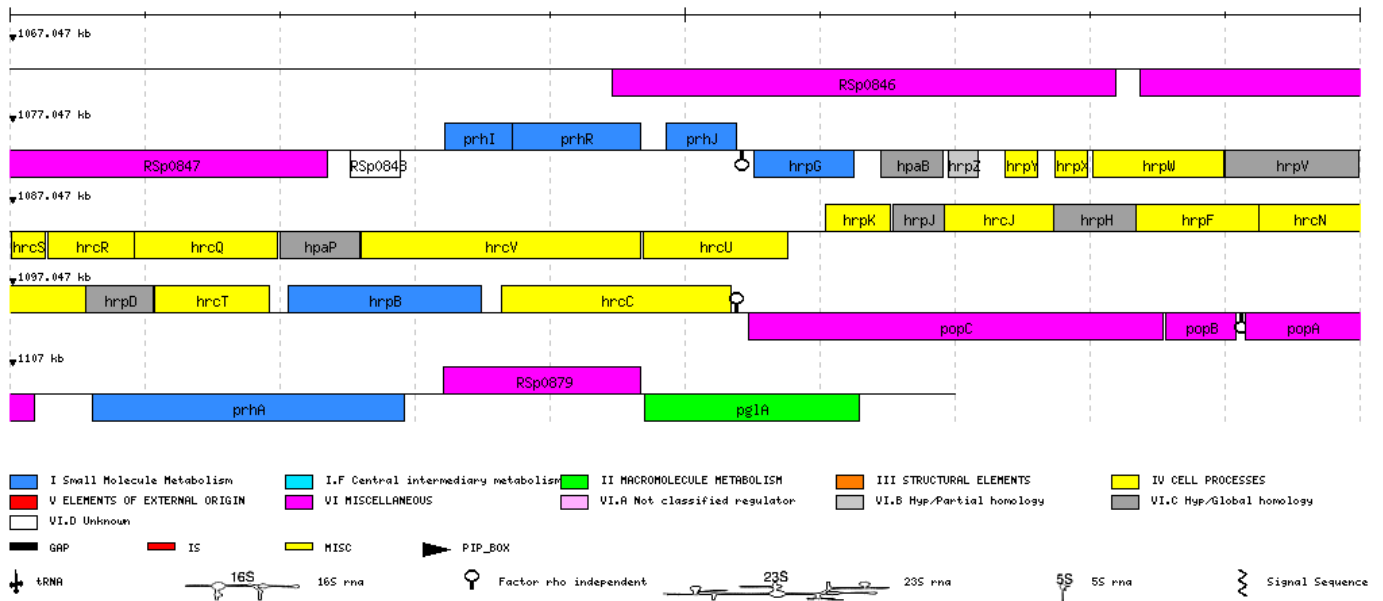


Figure 17. Représentation du cluster *hrp* de *Ralstonia solanacearum*

Les gènes *hrp* de *Ralstonia solanacearum* forment un cluster de 23 kb sur le mégaplasme. Chaque gène est représenté par un rectangle orienté selon le sens de transcription (de gauche à droite au-dessus de la ligne, et inversement pour les gènes situés en-dessous). Les traits verticaux délimitent 1000 pb. Les gènes en jaune sont les gènes impliqués dans la structure du système de sécrétion de type III, les gènes en rose sont des gènes codant pour des protéines effectrices et les gènes en bleu codent pour des protéines régulatrices

CHAPITRE I.

Caractérisation d'un nouvel activateur transcriptionnel positif des gènes de la pathogénie chez *Ralstonia solanacearum*

1. La régulation transcriptionnelle des gènes associés à la pathogénie

1.1 *La cascade de régulation Prh des gènes de régulation du système de sécrétion de type III*

Chez *Ralstonia solanacearum*, les gènes impliqués dans le système de sécrétion de type III forment un cluster de 23 kb situé sur le mégaplasmide et constitué de cinq unités transcriptionnelles (Van Gijsegem *et al.*, 1995). Parmi les gènes de ce cluster se trouvent : les gènes codant pour la structure du système de sécrétion de type III, des gènes codant pour certains effecteurs qui seront transloqués par le système de sécrétion de type III et six gènes codant pour des protéines régulatrices (Figure 17). Chacune de ces protéines régulatrices est impliquée dans une cascade de régulation amenant au contrôle final de l'expression du système de sécrétion de type III et des effecteurs associés. Cette cascade a été nommée Prh pour plant regulator of *hrp* genes (Figure 18).

Le premier élément de cette cascade est le récepteur PrhA. Cette protéine possède des similarités avec les récepteurs à sidérophores membranaires TonB-dépendants (Marenda *et al.*, 1998). Les protéines appartenant à cette famille sont localisées dans la membrane externe de la bactérie où elles lient de manière spécifique les complexes fer/sidérophore et permettent le transport de ces complexes dans le périplasme. La protéine PrhA de *R. solanacearum* présente également des domaines nécessaires à une localisation dans la membrane externe bactérienne. En revanche, contrairement aux autres récepteurs TonB-dépendants, l'expression de *prhA* n'est pas induite par un milieu carencé en fer (Marenda *et*

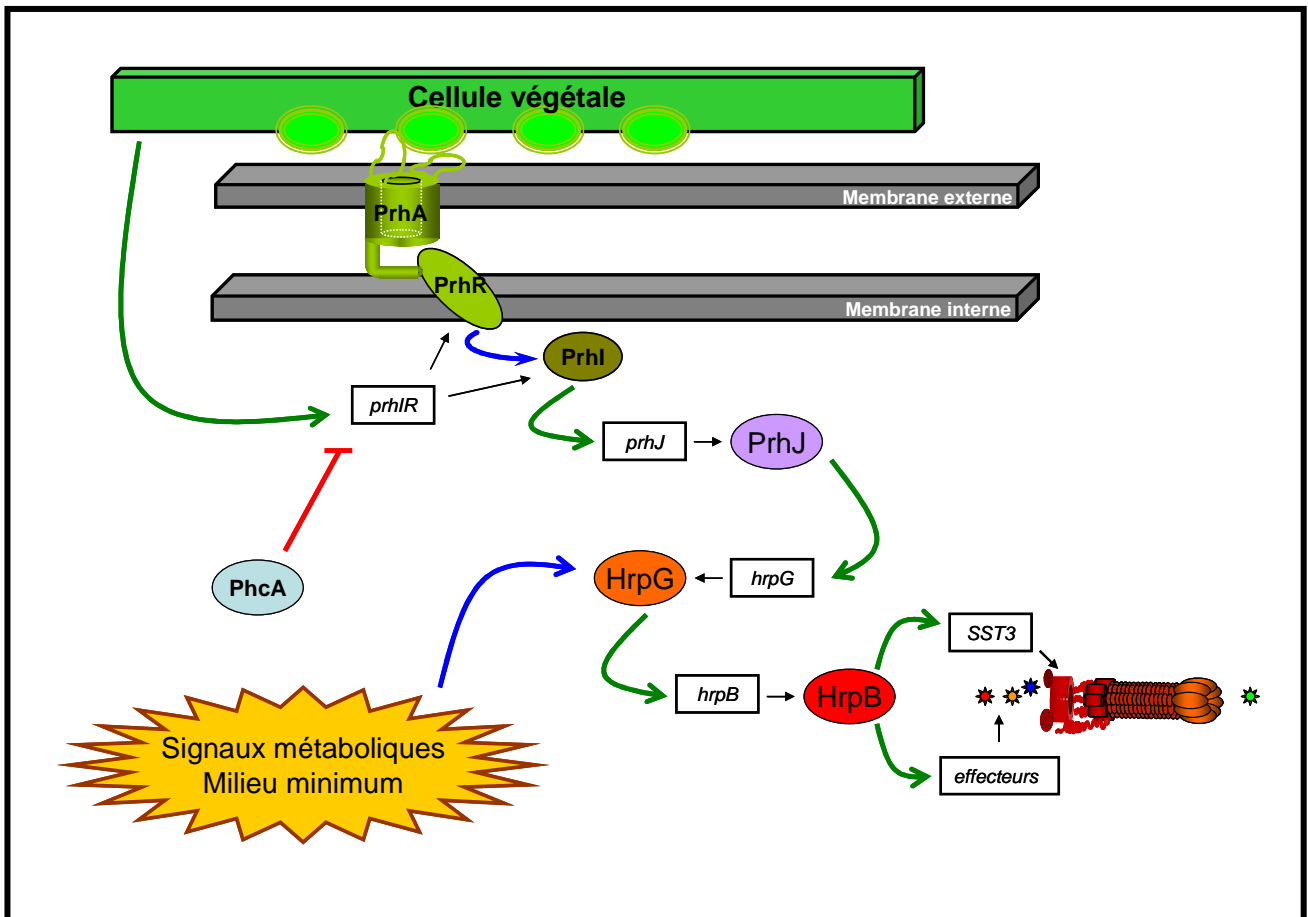


Figure 18. Schéma de la cascade Prh d'activation des gènes *hrp* chez *Ralstonia solanacearum*

Le signal plante est perçu après contact direct entre la bactérie et la paroi végétale par le récepteur PrhA. Celui-ci transmet le signal à PrhR puis PrhI. PrhI active la transcription de *prhJ*. PrhJ active la transcription de *hrpG*, HrpG induit *hrpB* et HrpB induit l'expression des gènes du système de sécrétion de type III et des effecteurs associés.

HrpG intègre au niveau post-traductionnel le signal métabolique présent dans le milieu minimum et induit l'expression des gènes *hrp* via HrpB dans ce milieu.

Les rectangles noirs représentent les gènes, les autres formes représentent les protéines.

Les flèches noires représentent les produits des gènes, les flèches vertes représentent une induction transcriptionnelle, les flèches bleues une induction post-transcriptionnelle et les flèches rouges fermées une répression transcriptionnelle.

Le code couleur pour les protéines régulatrices est le suivant : bleu clair = régulateur de type LysR, vert clair = protéines membranaires, vert foncé = facteurs sigmas, violet = régulateurs de type LuxR, orange = régulateurs de type OmpR et rouge = régulateurs de type AraC/XylS.

al., 1998 ; Clarke *et al.*, 2001). Le rôle de PrhA en tant que transporteur n'a pas été démontré.

PrhA active PrhR, un régulateur membranaire qui active à son tour PrhI, un facteur sigma extracytoplasmique (ECF). Les régulateurs PrhR et PrhI sont codés par l'opéron *prhIR* situé dans le cluster de gènes *hrp*. L'expression de *prhIR* n'est pas contrôlée par PrhA et vice-versa, l'expression de *prhA* n'est pas contrôlée par PrhI ou PrhR. En revanche, l'expression de *prhIR* est induite en présence de cellules végétales (Brito *et al.*, 2002) ; elle est également contrôlée négativement par le régulateur global PhcA (Yoshimochi *et al.*, 2009).

PrhI active la transcription de *prhJ*. PrhJ est un régulateur de type LuxR ; PrhJ active la transcription de HrpG, régulateur de type OmpR. L'expression de ces deux gènes est dépendante du récepteur PrhA (Brito *et al.*, 1999).

Finalement, HrpG active la transcription de HrpB, un régulateur de type AraC/XylS (Genin *et al.*, 1992 ; Brito *et al.*, 1999). HrpB régule l'expression des gènes du système de sécrétion de type III et des effecteurs associés (Occhialini *et al.*, 2005 ; Cunnac *et al.*, 2004b). La boîte promotrice reconnue par HrpB a été nommée boîte *hrp_{III}*, il s'agit d'un motif de quatre nucléotides répétés et séparés de 16 nucléotides : TTCGn16TTCG (Cunnac *et al.*, 2004).

1.2 Les signaux inducteurs du système de sécrétion de type III et leur intégration dans la cascade Prh

L'expression des gènes *hrp* est induite dans deux conditions différentes : lorsque les bactéries sont en présence de cellules végétales et lorsque les bactéries sont cultivées en milieu minimum (Arlat *et al.*, 1992). Ces deux signaux sont intégrés dans la cascade d'activation Prh.

Nature et perception du signal « plante »

PrhA, récepteur TonB-dépendant, est responsable de la perception du signal plante (Marenda *et al.*, 1998). La nature du signal plante perçu par PrhA n'a pas été clairement définie. Il s'agit d'un signal ubiquitaire puisque des cellules végétales d'*A. thaliana*, de tomate, de tabac ou encore de *Medicago truncatula* présentent chacune la capacité d'induire l'expression du système de type III via le récepteur PrhA. Il a également été déterminé que ce signal n'est pas diffusible ; c'est un composant de la paroi végétale résistant à la chaleur et au traitement à la protéinase K. Ce composant est constitutif : sa présence dans les parois végétales n'est pas induite par la présence de bactéries (Aldon *et al.*, 2000). L'induction des

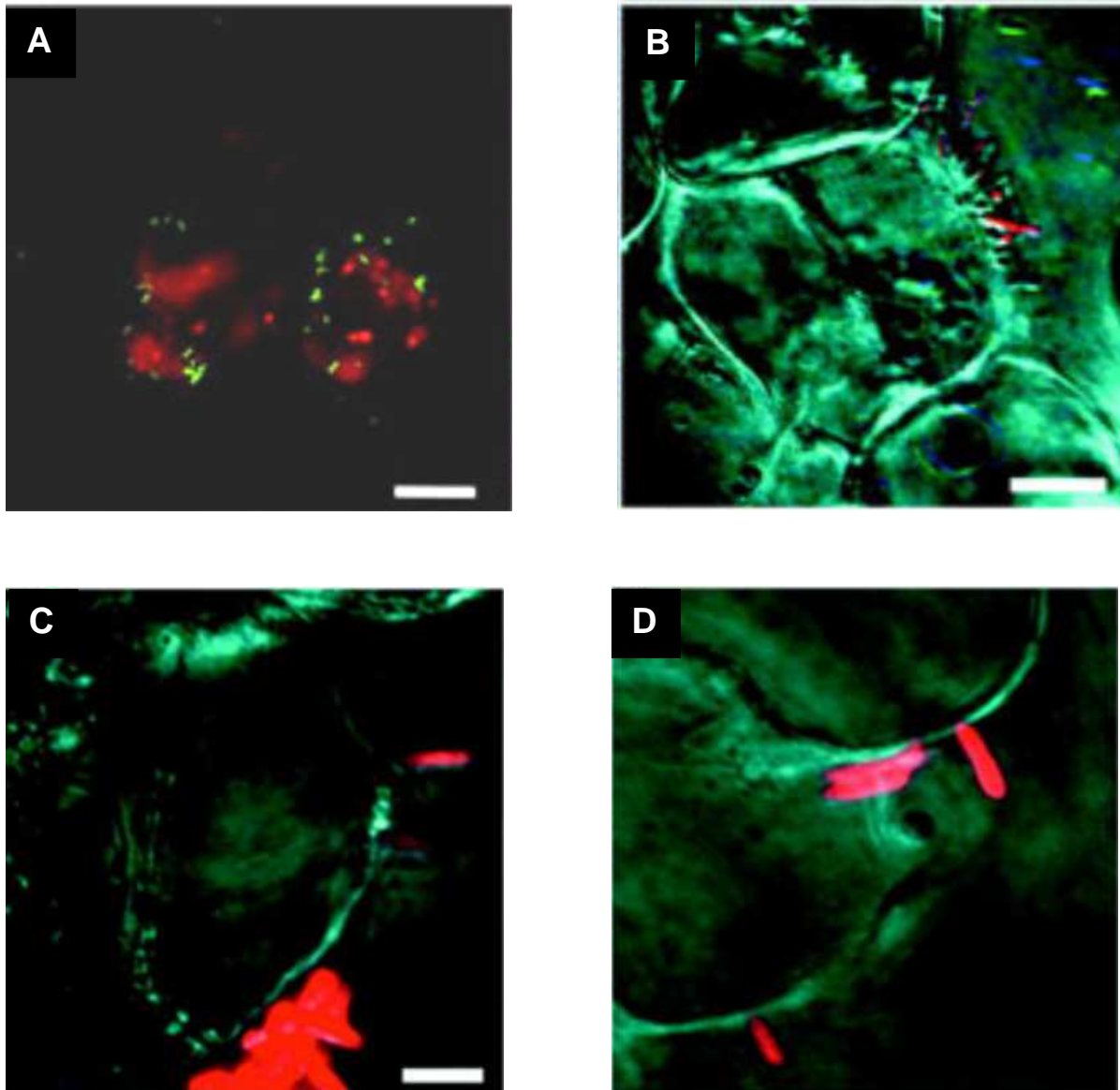


Figure 19. PrhA est nécessaire à la perception du signal plante mais pas à l'attachement des bactéries à la cellule hôte

A. Bactéries portant le gène *hrpB* fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente GFP (green fluorescent protein). L'expression de la construction *hrpB::gfp* est fortement induite lorsque les bactéries sont en contact direct avec les cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana*. Observation en microscope à épifluorescence.

B. Détail de l'interaction entre les bactéries et la surface des cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana* : les bactéries en contact avec la surface de la cellule végétale montrent un très fort niveau de fluorescence de la GFP (couleur rouge). Des bactéries pour lesquelles il n'y a pas d'induction de la GFP sont visibles en haut à droite de la photo. Observation en microscopie confocale.

C. Interaction entre la cellule végétale et les bactéries exprimant la GFP de manière constitutive. Observation en microscopie confocale.

D. Interaction entre la cellule végétale et les bactéries exprimant la GFP de manière constitutive et mutantes pour le gène *prhA*. Ces bactéries sont toujours capables de s'attacher à la cellule végétale. Observation en microscopie confocale.

(D'après Aldon *et al.*, 2000)

gènes *hrp* par le signal végétal nécessite donc un contact direct entre la bactérie et la cellule plante hôte. Ce contact direct et l'attachement de la bactérie à la cellule plante n'est pas médié par PrhA puisqu'une bactérie mutante dans le gène *prhA* est toujours capable de se fixer à la cellule végétale mais l'expression des gènes *hrp* n'est pas induite (Figure 19). Ce contact direct n'est pas non plus médié par le système de sécrétion de type III (Aldon *et al.*, 2000).

L'expression de *prhIR* est induite en présence de cellules végétales ; cette induction n'est pas dépendante de PrhA et ne suffit pas à induire l'expression de *prhJ* indépendamment de PrhA en présence de cellules végétales. En effet, l'expression de *prhJ* dans un mutant *prhA* en présence de cellules végétales est abolie. La transduction du signal végétal par le récepteur PrhA et les régulateurs PrhR et PrhI est donc nécessaire à l'induction de *prhJ* et à l'induction des gènes *hrp*. PrhA, PrhI et PrhR forment un système de transduction de signal à travers trois compartiments permettant la transmission du signal végétal à travers le périplasme de la bactérie (Aldon *et al.*, 2000 ; Brito *et al.*, 1999).

L'interaction entre la cellule végétale et la bactérie peut être divisée en deux étapes distinctes : une première étape où la bactérie s'attache à la cellule végétale, cet attachement est indépendant du récepteur PrhA et du système de sécrétion de type III, puis une deuxième étape au cours de laquelle la bactérie perçoit le signal végétal via le récepteur PrhA et induit l'expression des gènes du système de sécrétion de type III (Aldon *et al.*, 2000).

Le signal milieu minimum

Le second signal auquel répond la transcription des gènes *hrp* est le milieu minimum. Les signaux perçus par la bactérie dans ce milieu ne sont pas déterminés précisément. Il est considéré que ce milieu mime les conditions rencontrées par la bactérie dans l'apoplaste de la plante (Rahme *et al.*, 1992). Il a également été montré que la source de carbone utilisée pour compléter le milieu minimum module l'intensité de l'induction des gènes *hrp*. La source d'azote utilisée semble avoir un effet plus important puisque la présence de casamino-acides ou de peptone (des sources complexes d'azote) dans le milieu minimum supprime l'induction des gènes *hrp* (Arlat *et al.*, 1992).

Parmi tous les gènes impliqués dans la cascade Prh, seule l'expression de *hrpB*, gène codant pour le dernier régulateur de cette cascade, est induite en milieu minimum (Genin *et al.*, 1992). L'expression des gènes *prhA*, *prhIR*, *prhJ*, et *hrpG* n'est pas induite par le milieu minimum. En fait, l'intégration du signal milieu minimum est réalisée par le régulateur de type OmpR, HrpG. HrpG est nécessaire à l'induction de *hrpB* en milieu minimum, pourtant l'expression de *hrpG* n'est pas induite en milieu minimum. L'intégration du signal milieu

minimum a donc lieu au niveau post-transcriptionnel ; cette intégration du signal pourrait être médiée par une phosphorylation comme il l'a été proposé par Yoshimochi *et al.*, 2009. Ces auteurs suggèrent que le régulateur HrpG serait phosphorylé à la fois en milieu minimum et en présence de cellules végétales ; cette phosphorylation serait nécessaire à l'induction complète de *hrpB* par HrpG et dépendrait d'une cascade de transduction du signal indépendante de la cascade Prh déjà identifiée. Les deux cascades seraient nécessaires à l'activation complète de HrpG.

hrpG et hrpB sont les seuls régulateurs de la cascade indispensables à la pathogénie

HrpG est considéré comme un régulateur central du pouvoir pathogène de *Ralstonia solanacearum* puisqu'il perçoit deux types de signaux différents : le signal plante et le signal milieu minimum. Sur perception de ces deux signaux HrpG active la transcription de *hrpB* et de son régulon. L'intégration de ces deux signaux est importante pour la mise en place de la maladie puisque des mutants des gènes *prhA*, *prhI*, *prhR* ou *prhJ* présentent des phénotypes partiels : apparition des symptômes de flétrissement réduits et retardés et délai dans l'apparition de la réponse hypersensible. Seuls les mutants dans les gènes *hrpG* ou *hrpB* présentent un phénotype total : pas d'apparition de la maladie, ni d'induction de la réponse hypersensible.

L'étude détaillée de la cascade de régulation a montré que plus la mutation touche un gène en amont de la cascade de régulation moins le phénotype de maladie ou de réponse hypersensible est affecté par rapport à la souche sauvage. Ces données suggèrent que d'autres signaux pourraient être intégrés à différents niveaux de la cascade (Brito *et al.*, 2002). C'est le cas du signal (ou des signaux) présent(s) dans le milieu minimum : les gènes *prh* répondent uniquement au signal végétal alors que les gènes *hrp* intègrent les deux signaux (milieu minimum et signal végétal). Le stimulus métabolique perçu par HrpG est donc nécessaire à la virulence totale de la bactérie (Brito *et al.*, 1999).

Finalement, une autre caractéristique de HrpG est qu'il possède des gènes cibles spécifiques qui ne sont pas dépendants de HrpB mais dont le rôle dans la mise en place de la virulence est démontré (Valls *et al.*, 2006). Le rôle central de HrpG dans le pouvoir pathogène sera davantage détaillé dans le deuxième chapitre.

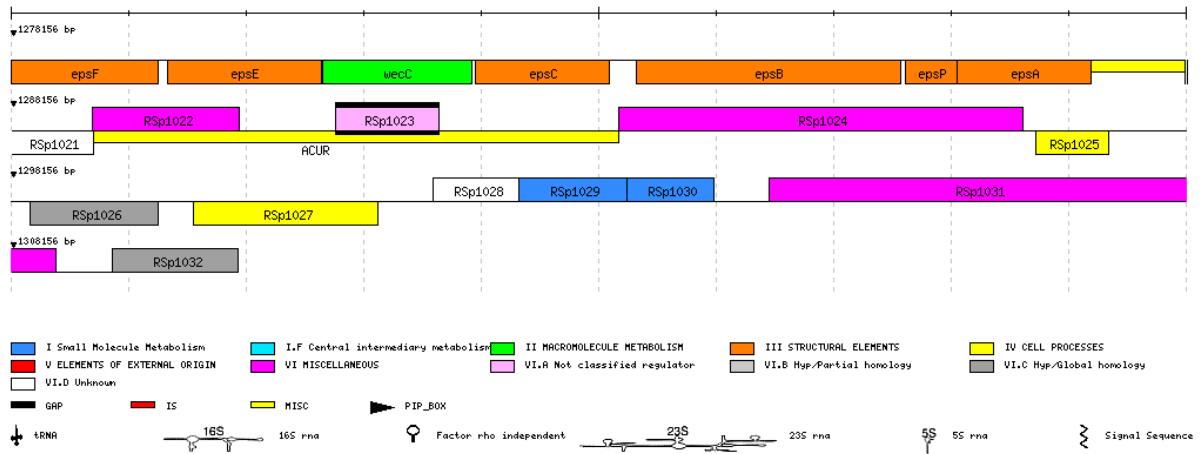


Figure 20. Contexte génomique du gène codant pour le régulateur PrhG (*rsp1023*)

Le gène codant pour le régulateur PrhG (*rsp1023*) est situé sur le mégaplasmide distant de 200 kb du cluster *hrp*. Il est situé dans une région à usage de codons alternatifs (ACUR, signalé en jaune sur la carte). Il est entouré de plusieurs gènes codant pour des effecteurs du système de sécrétion de type III (rose foncé).

Chaque gène est représenté par un rectangle orienté selon le sens de transcription (de gauche à droite au-dessus de la ligne, et inversement pour les gènes situés en-dessous). Les traits verticaux délimitent 1000 pb.

2. RESULTATS ET DISCUSSION : Identification d'un nouvel activateur transcriptionnel positif de *hrpB*

La séquence du génome de la souche GMI1000 a révélé la présence d'un gène régulateur fortement homologue à HrpG, ce régulateur a été nommé PrhG pour pathogenicity regulator homologue. Le gène codant pour ce régulateur est situé sur le mégaplasmide de *R. solanacearum* à 200 kb du cluster *hrp*, où il voisine plusieurs gènes codant pour des effecteurs substrats du SST3 (Figure 20).

PrhG, a Transcriptional Regulator Responding to Growth Conditions, Is Involved in the Control of the Type III Secretion System Regulon in *Ralstonia solanacearum*^{∇†}

Laure Plener,¹ Pablo Manfredi,¹ Marc Valls,² and Stéphane Genin^{1*}

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F-31320 Castanet Tolosan, France,¹ and Department de Genètica, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain²

Received 2 September 2009/Accepted 1 December 2009

The ability of *Ralstonia solanacearum* to cause disease in plants depends on its type III secretion system (T3SS). The expression of the T3SS and its effector substrates is coordinately controlled by a regulatory cascade, at the bottom of which is HrpB. Transcription of the *hrpB* gene is activated by a plant-responsive regulator named HrpG, which is a master regulator of a wide array of pathogenicity functions in *R. solanacearum*. We have identified in the genome of strain GMI1000 a close paralog of *hrpG* (83% overall similarity at the protein level) that we have named *prhG*. Despite this high similarity, the expression pattern of *prhG* is remarkably different from that of *hrpG*: *prhG* expression is activated after growth of bacteria in minimal medium but not in the presence of host cells, while *hrpG* expression is specifically induced in response to plant cell signals. We provide genetic evidence that *prhG* is a transcriptional regulator that, like *hrpG*, controls the expression of *hrpB* and the *hrpB*-regulated genes under minimal medium conditions. However, the regulatory functions of *prhG* and *hrpG* are distinct: *prhG* has no influence on *hrpB* expression when the bacteria are in the presence of plant cells, and transcriptomic profiling analysis of a *prhG* mutant revealed that the PrhG and HrpG regulons have only one pathogenicity target in common, *hrpB*. Functional complementation experiments indicated that PrhG and HrpG are individually sufficient to activate *hrpB* expression in minimal medium. Rather surprisingly, a *prhG* disruption mutant had little impact on pathogenicity, which may indicate that *prhG* has a minor role in the activation of T3SS genes when *R. solanacearum* grows parasitically inside the plant. The cross talk between pathogenicity regulatory proteins and environmental signals described here denotes that an intricate network is at the basis of the bacterial disease program.

In order to successfully colonize plants, bacterial pathogens must deploy a genetic program to express virulence genes, which enable adaptation to living conditions inside the host (25). A set of genes that is highly expressed upon contact with the eukaryotic host is the type III secretion system (T3SS) present in many plant and animal bacterial pathogens. This system is a major genetic determinant of disease development, as it translocates bacterial proteins—called effectors—into host cells to interfere with cellular defense responses and facilitate bacterial colonization (reviewed in references 12, 20, and 39). In bacterial plant pathogens, the T3SS is encoded by a cluster of some 20 *hrp* genes named after the inability of mutants deficient in them to cause a hypersensitive response in resistant plants or pathogenicity in susceptible hosts (21). In all of the species studied, the transcription of the T3SS and most of its effector substrates is tightly controlled by a succession of consecutively activated regulators.

Ralstonia solanacearum is the agent that causes bacterial wilt in more than 200 plant hosts, including important crops such as potato and tomato, and has long been studied as a model plant vascular pathogen (10, 14). In *R. solanacearum* GMI1000, the

regulatory cascade driving T3SS gene expression has been very well characterized (see references 6, 32, and 38 for a review). In this bacterium, the transcription of type III secretion genes is regulated by the HrpB regulator, which belongs to the AraC family (16). HrpB may directly bind to a specific *hrp_{II}* box found in the promoters of most of its target genes (8). The transcription of the *hrpB* gene is activated by the HrpG transcriptional activator, which belongs to the OmpR/PhoB subfamily of two-component response regulators (7, 13). The key role of the HrpB and HrpG regulators is illustrated by the fact that mutant strains deficient in any of them are nonpathogenic (7, 16, 35). Activation of the T3SS regulatory cascade in *R. solanacearum* is controlled by the outer membrane receptor protein PrhA. It has been shown that PrhA senses an unidentified, nondiffusible, plant-specific signal and transfers the activating signal through PrhR, PrhI, and PrhJ to drive HrpG transcription (1, 6).

Transcription of *hrp* genes is much higher when bacteria are cultured in defined minimal media rather than complete media (3, 30). This induction pattern seems to be general in all of the plant pathogens studied, and it has been attributed to the fact that minimal media somehow mimic the conditions encountered in the apoplastic environment (30, 32). In *R. solanacearum*, this metabolic regulation is superimposed on the induction caused by plant cell contact and seems to be integrated into the cascade by HrpG, HrpB, or both (7, 15, 16). This conclusion is based on the observation that only *hrpB* and *hrpG*, and not the upstream components of the *hrp* regulatory

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F-31320 Castanet Tolosan, France. Phone: 33561285416. Fax: 33561285061. E-mail: sgenin@toulouse.inra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 11 December 2009.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>recA lacZ</i> Δ M15	Bethesda Research Laboratories
<i>R. solanacearum</i>		
GMI1000	Wild-type strain	31
GMI1425	<i>hrpG</i> ::Tn5-B20 mutant	7
GMI1421	<i>hrpY</i> ::Tn5-B20 mutant	33
GMI1475	<i>hrpB</i> ::Tn5-B20 mutant	16
GMI1525	<i>hrpB</i> :: Ω mutant	16
GMI1613	<i>popA</i> ::Tn5-B20 mutant	4
GMI1755	GMI1000 Δ <i>hrpG</i> mutant	34
GRS404	<i>prhG</i> :: <i>lacZ</i> mutant	This work
GRS445	GMI1000 Δ <i>prhG</i> mutant	This work
GRS491	GMI1000 Δ <i>hrpG</i> Δ <i>prhG</i> mutant	This work
GRS497	RSp0201:: <i>lacZ</i> mutant	This work
Plasmids		
pBluescript KS(+)	Cloning vector, Amp ^r	Stratagene
pLAFR6	pLAFR1 with trp terminators, Tc ^r	18
pBBL12	pLAFR6 with a 1.5-kb PstI fragment carrying <i>hrpG</i>	7
pCZ367	pUC18-derived vector used for insertional mutagenesis, Ap ^r Gm ^r	9
pCM184	Allelic exchange vector, Km ^r	23
pGG15	pLAFR6 carrying the <i>cre</i> recombinase gene	This work
pSG371	pCZ367 carrying a 0.5-kb HindIII-XbaI <i>prhG</i> fragment	This work
pLP2	PCR fragment containing the <i>prhG</i> gene and 500 bp upstream the predicted coding sequence cloned in pLAFR6, Tc ^r	This work
pLP5	PCR fragment containing the <i>prhG</i> gene and 500 bp upstream the predicted coding sequence cloned in pBBL12, Tc ^r	This work

cascade, are required for *hrp* gene induction when the bacteria are grown in minimal medium.

Bacterial plant pathogens of the genus *Xanthomonas* share part of the *hrp* regulatory cascade of *R. solanacearum*, in contrast to other bacterial plant pathogens, where T3SS transcriptional control involves σ^{54} -dependent enhancer-binding regulators (32). Indeed, the HrpG and HrpB (named HrpX) regulators and their functions have been found to be conserved in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, although the upper components of the cascade have not yet been identified (36, 37). More generally, HrpX and HrpG orthologs have been found in all of the genome sequences of *Xanthomonas* T3SS-harboring species (29). The two different regulatory systems clearly coincide with the two subgroups into which the *hrp* gene clusters have been classified on the basis of gene conservation (2).

Recent transcriptomic profiling analyses have determined the HrpB and HrpG regulons and provided evidence that, besides activating HrpB transcription (and thus, T3SS expression), HrpG also controls the expression of other virulence determinants (33). From these studies, control of T3SS gene expression is now viewed as a regulatory network connected with other virulence determinants, rather than a linear cascade. HrpG is located at a central node in this network, integrating diverse environmental signals and controlling most of the bacterial functions that promote disease (33). In this work, we have identified in the genome sequence of *R. solanacearum* GMI1000 a new regulatory gene encoding a protein highly similar to HrpG. We have characterized this novel regulatory gene, named *prhG*, and we provide evidence that it is a new player in the complex network controlling T3SS gene expression. PrhG appears to be specifically involved in the control of

the *hrpB* gene in response to environmental signals encountered by the bacteria when they are grown under minimal medium conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The relevant characteristics of the plasmids and bacterial strains used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani medium (5). *R. solanacearum* strains were grown in complete BG medium or in MP minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration. The composition of BG medium is as follows (g liter⁻¹): Bacto peptone, 10; Casamino Acids, 1; yeast extract, 1. For agar plates, BG medium was supplemented with glucose (5 g liter⁻¹) and triphenyltetrazolium chloride (0.05 g liter⁻¹). The composition of MP medium is as follows (g liter⁻¹): FeSO₄ · 7H₂O, 1.25 × 10⁻⁴; (NH₄)₂SO₄, 0.5; MgSO₄ · 7H₂O, 0.05; KH₂PO₄, 3.4. The pH was adjusted to 7 with KOH. When needed, antibiotics were added to the media at the following final concentrations (mg liter⁻¹): kanamycin, 50; spectinomycin, 40 for *R. solanacearum*; gentamicin, 10; tetracycline, 10; ampicillin, 100 for *E. coli*.

DNA manipulations and genetic constructs. Standard recombinant DNA techniques were performed as described previously (5). Restriction enzymes, DNA ligase, and other DNA enzymes were used according to the manufacturers' recommendations. PCR amplification of *prhG* with 500 bp of its promoter region was performed with *Pfx* polymerase (Invitrogen) using genomic DNA of *R. solanacearum* from strain GMI1000 and primers Amo2360 (5'-TCCCACATCGTGTGCGACTT-3') and Aval2360H3 (5'-AAGCTTTGCCTGCGCCGTCGCCG-3').

An RSp0201 disruption mutant was created as previously described (9), using integrative plasmid pCZ367, into which an internal fragment of the gene was cloned after PCR amplification using primers 0201H3 (5'-GAAGCTTCGTTA TCGAGCAAC-3') and 0201Xba (5'-ATCTAGATCCGCCGGCTGAAG-3'). Plasmids (Table 1) were introduced into *R. solanacearum* strains by electroporation (2.5 kV, 200 W, 25 mF, 0.2-cm cuvette gap).

Creation of an unmarked Δ *prhG* mutant strain. A *prhG* deletion mutant was generated by using allelic exchange vector pCM184 for antibiotic marker recycling (23). Two DNA fragments flanking the *prhG* sequence were amplified by using primers 2360R1 (5'-GAATTCTCTCGCCCGGTGCGGC-3') and 2360NotI (5'-GCGGCCGCAAGCTGGAGGGAGAGG-3') for the left flanking frag-

ment and 2360Sc2 (5'-CCGCGGCGCATGTGCAATGGATGAA-3') and 2360Sc1 (5'-GAGTCTTACCCGCGTTGCAACG-3') for the right flanking fragment.

Both fragments were cloned into pCM184, and the resulting construct was used to transform GMI1000 to generate a *ΔprhG::nptII* mutant. The kanamycin resistance cassette was then excised *in vivo* using plasmid pGG15, which carries a copy of the *cre* recombinase in a pLAFR6 backbone vector. The deletion of *prhG* in resulting strain GRS445 was then checked by PCR.

Transcriptome analysis. RNA extraction and probe labeling were performed as already described (26). The *R. solanacearum* whole-genome DNA microarray with 65/70-mer oligonucleotides specific to the annotated open reading frames (ORFs) of GMI1000 was used for all of the transcriptomic profiling experiments. Hybridizations were conducted manually under the following conditions. Microarray slides were prehybridized for 1 h at 42°C in DIG Easy buffer (Roche) containing 10 mM salmon sperm DNA. Hybridizations were carried out for 13 h under the same conditions, except that the heat-denatured and labeled probes were added to the reaction mixture. Following hybridization, slides were washed once in 1× SSC (0.15 mM NaCl plus 0.015 M sodium citrate)–0.1% sodium dodecyl sulfate at 60°C for 10 min and once in 0.1× SSC for 1 min at room temperature. Slides were finally rinsed in isopropanol at 37°C and dried by 3 min of centrifugation at 1,000 × g.

Hybridized slides were scanned using a GenePix 4000B dual-channel confocal laser scanner (Axon Instruments, Union City, CA).

Signal quantification and data analysis were achieved using GenePix Pro (version 3.0; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and GeneSight software (version 4.1.6; Biodiscovery Inc., El Segundo, CA). For each array, following local background subtraction, the signal for each spot was normalized on the basis of the mean value of the intensity of all of the spots corresponding to *R. solanacearum* ORFs. The ratio of expression of the wild-type strain to the *prhG* deletion mutant or of the wild-type strain to the *prhG*-overexpressing mutant was calculated. The two ratios corresponding to the two replicates present on the same slide were averaged, and the averaged ratio was converted to its log₂ value.

For each experimental condition (wild-type strain versus *prhG* deletion mutant and wild-type strain versus *prhG*-overexpressing mutant), at least two independent RNA extractions from independent cultures were used and a minimum of six hybridizations were performed with dye swap labeling. In order to minimize false positives, only genes with high levels of significance ($P < 0.05$ by Student's *t* test) and an absolute log₂ value ratio of greater than 1.3 were considered in this study.

All of the primary data from transcriptome experiments, as well as the experimental protocols used, are available from the ArrayExpress depository (accession number E-MEXP-2456).

Pathogenicity tests. Pathogenicity tests by soil inoculation were performed by watering 4-week-old tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande) with 50 ml of a suspension containing 10⁷ or 10⁸ CFU ml⁻¹. Pathogenicity tests by stem injection were performed by injecting 20 μl of a 10⁶ CFU ml⁻¹ bacterial suspension into the stems of 4-week-old plants. Disease tests on *Arabidopsis thaliana* accession Col-0 were performed by immersing plants with cut or uncut roots into bacterial suspensions of 10⁷ and 10⁸ CFU ml⁻¹.

Disease development was scored daily by using a disease index scale ranging from 0 for no symptoms to 4 for completely wilted plants (27). Within-group Kaplan-Meier survival estimates (the total number of plants surviving [i.e., with disease index scores below 3] out of the total number inoculated for each group) were computed for each time interval in order to build Kaplan-Meier survival curves for each group. The log rank test was used to perform between-group comparisons, testing the equivalence of the Kaplan-Meier survival curves for a pair of groups.

Creation of *lacZ* reporter fusion strains. The *prhG::lacZ* fusion was created by using integration plasmid pCZ367 (9). An internal fragment of the *prhG* gene was PCR amplified by using primers 2360FW (5'-GTAAGCTTCCACCGCCGCGTACG-3') and 2360REV2 (5'-GTCTAGATGTGCTGCTCGATG-3') and cloned as a 0.5-kb HindIII-XbaI fragment into pCZ367 to generate plasmid pSG371. This plasmid was used to transform *R. solanacearum* GMI1000, and a single integrative event was selected by using pCZ367 gentamicin resistance (9). Recombinant clones were then checked by PCR.

lacZ reporter fusions with the *hrpG*, *prhG*, *hrpB*, *popA*, and *hrpY* genes were introduced into the different genetic backgrounds (*ΔhrpG*, *ΔprhG*, and *ΔhrpG ΔprhG*) by transformation with the genomic DNA of the donor strains. Recombinant strains were selected on media with adequate antibiotics, and the correct genomic insertion of the *lacZ* fusion was checked by PCR.

Plant cell cultures and bacterium-plant cell cocultures. The *A. thaliana* At-202 (accession Col-0) and tomato Msk8 cell suspension lines were grown in Gamborg B5 (Flow Laboratories) and T-MSMO (Sigma) media, respectively (22). For the

bacterium-plant cell cocultures, 10-ml samples of *Arabidopsis* and tomato cell suspensions were inoculated with *R. solanacearum*. After 16 h of incubation at 28°C, the coculture was filtered and the bacterial cells were recovered for β-galactosidase assays.

β-Galactosidase assays. β-Galactosidase assays were performed as described previously (4). β-Galactosidase activity was measured according to Miller (24), and values were expressed in Miller units or as a percentage of the activity of the strain carrying a *lacZ* fusion in a wild-type genetic background.

Protein sequence analysis. The analysis was performed with the MEGA versus 3.1 software (<http://www.megasoftware.net/>) using a neighbor-joining algorithm with 1,000 replications to build the tree and calculate the bootstrap values. The accession numbers of the 10 protein sequences compared in this analysis are as follows: PrhG from *R. solanacearum* GMI1000, NP_522584; PrhG from *R. solanacearum* Molk2, YP_002255075; PrhG from *R. solanacearum* UW551, ZP_00945868; HrpG from *R. solanacearum* GMI1000, CAA07190; HrpG from *R. solanacearum* Molk2, YP_002254969; HrpG from *R. solanacearum* UW551, ZP_00944901; HrpG from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A, AAK92203; HrpG from *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10, YP_363045; HrpG from *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913, NP_636540; OmpR from *E. coli* K-12, AAA58202.

RESULTS

Identification of *prhG*, a close paralog of *hrpG*, the master regulator of pathogenicity functions in *R. solanacearum*. Annotation of the genome of strain GMI1000 revealed the existence of a gene, RSp1023 (hereafter named *prhG*), homologous to the T3SS regulatory gene *hrpG*. A comparison of the gene products reveals that the two proteins are 72% identical (83% similar). The main difference between the two proteins is that PrhG is slightly longer, as it contains an ~50-amino-acid C-terminal extension which is absent in HrpG (Fig. 1A). Like HrpG, the PrhG protein belongs to the OmpR/PhoB family of two-component response regulators (13) and possesses a highly conserved helix-turn-helix motif DNA-binding domain (residues 173 to 205). The relatedness between PrhG and HrpG in this predicted DNA-binding domain reaches 96% amino acid identity. Also similarly to *hrpG*, no predicted sensor histidine kinase-encoding gene was found in the vicinity of *prhG*. Although *prhG* is located 200 kb away from the *hrp* gene cluster, the two immediate flanking genes (RSp1022 and RSp1024) are predicted to encode type III-dependent effectors (28), which could be suggestive of a functional link of this genomic region with the T3SS.

Analysis of the phylogenetic relationships with homologous sequences in the databases revealed that *prhG* is conserved in *R. solanacearum* strains taxonomically distant from GMI1000, such as Molk2 or UW551 (Fig. 1B). Secondly, this cladogram showed that the PrhG sequence group is closer to the *R. solanacearum* HrpG group than to the *Xanthomonas* sp. HrpG clade. This observation and the fact that the amino acid sequence identity between HrpG and PrhG is significantly higher than that between HrpG and its *Xanthomonas* orthologues (37 to 40%) support the view that *prhG* might be the result of an ancient *hrpG* duplication event that took place in *R. solanacearum* before the divergence of its various strains. Interestingly, none of the sequenced *Xanthomonas* sp. genomes was found to harbor a close paralog of HrpG, as observed in all of the *R. solanacearum* genomes investigated.

A *prhG* mutant is slightly reduced in pathogenicity on tomato plants. To evaluate the role of *prhG* in *R. solanacearum* pathogenicity, an unmarked deletion mutant derivative was generated from strain GMI1000. The resulting strain, GRS445,

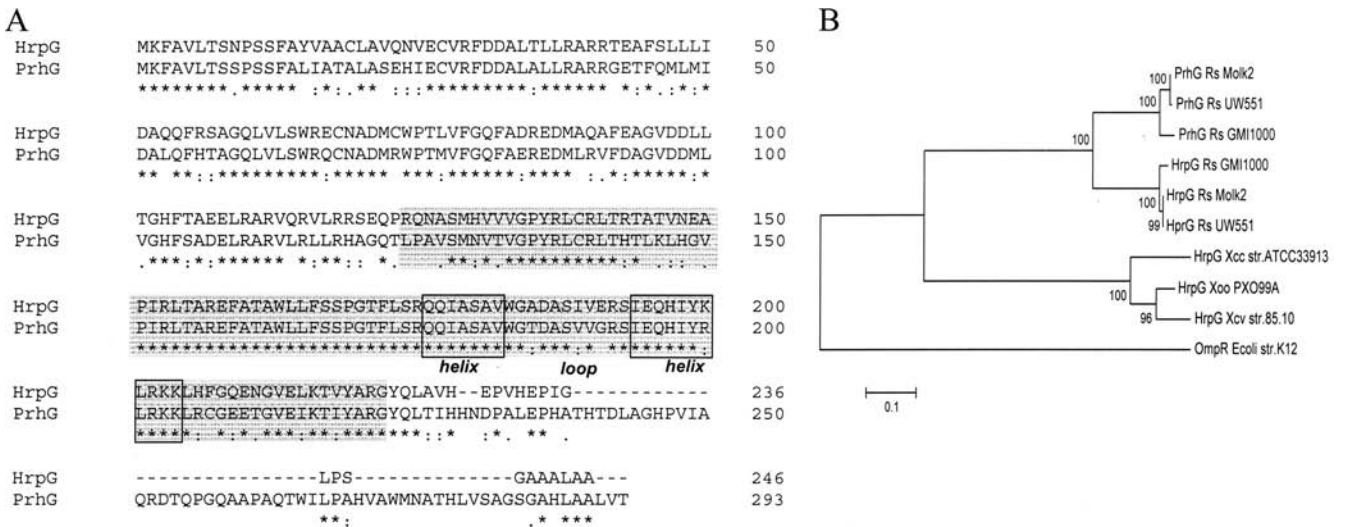


FIG. 1. (A) ClustalW analysis of homologous proteins HrpG and PrhG (72% global identity and 96% in the helix-loop-helix domain). The predicted DNA-binding and transactivation domain is highlighted in gray, and the helix-loop-helix domain is boxed. (B) Neighbor-joining analysis showing the relationships among the PrhG and HrpG protein sequences of three *R. solanacearum* strains (GMI1000, Molk2, and UW551) and three *Xanthomonas* sp. strains (*X. oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99A, *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10, and *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913). The *E. coli* K-12 OmpR protein sequence was added as an outgroup. The tree was constructed and the bootstrap values were calculated by using the neighbor-joining algorithm with 1,000 replications. The asterisks, periods, and colons below the sequences in panel A indicate identical residues, conserved substitutions, and semiconserved substitutions, respectively.

was used for inoculation assays on tomato, the natural host of GMI1000. Routine infection tests were performed either by injection of bacteria into the stem or by drenching the plants with a bacterial suspension, an inoculation method which better mimics natural infection conditions.

The pathogenicity assays done by drenching tomato plants showed no significant difference in the appearance of symptoms due to the mutant compared to the wild-type strain (data not shown). A difference in virulence was observed when a bacterial suspension of 10⁴ CFU was injected directly into the stems. Under these conditions, symptoms appeared with a slight delay when the plants were inoculated with the *prhG* mutant strain compared to the wild-type strain (Fig. 2). We applied a log rank test to determine whether the disease curves obtained with the wild-type strain and the *prhG* mutant derivative were significantly different under these conditions. A score of 3 was used to discriminate between live plants (score below 3) and dead plants (score of 3 or above). With these criteria, the *P* value is 0.00997, showing that the difference between the two disease curves is indeed significant and that *prhG* is required for full pathogenicity on tomato.

Pathogenicity assays were also performed on another host plant, *A. thaliana* ecotype Columbia, which is susceptible to GMI1000. No significant difference in pathogenicity was observed between the *prhG* mutant and the wild-type strain when *A. thaliana* plants with uncut or cut roots were inoculated (data not shown).

***prhG* and *hrpG* respond to different environmental signals.** Since *R. solanacearum hrpG* was known to display a distinct expression pattern, depending on the environmental conditions used (7), we determined the expression profile of *prhG* under the same conditions. In these assays, bacteria carrying a chromosomal *lacZ* fusion to *hrpG* (strain GMI1425) or *prhG* (strain GRS404) were grown in complete medium, in minimal

medium supplemented with glutamate as the sole carbon source, or in the presence of *A. thaliana* or tomato host cell suspensions. Figure 3 shows the levels of β -galactosidase activity monitored for each strain under each set of conditions. It appears that the *prhG::lacZ* fusion was induced in minimal medium (fivefold with respect to complete medium). However, in contrast to the specific and strong expression of the *hrpG::lacZ* fusion (strain GMI1425) detected in the presence of plant cells, the *prhG::lacZ* fusion was not induced under this

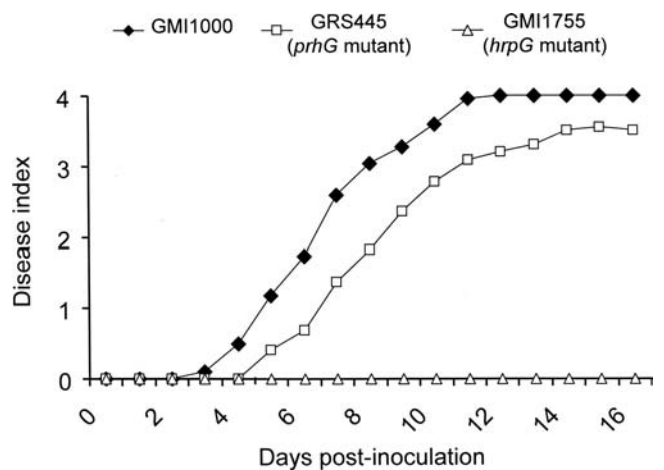


FIG. 2. Disease progress curves of *R. solanacearum* wild-type strain GMI1000 and the *prhG* and *hrpG* deletion mutant strains on tomato plants. An equivalent number of bacterial cells (10⁴ CFU) was injected into the stems of susceptible tomato seedlings, which were monitored for 18 days and rated on a disease index scale where 0 indicates healthy plants and 4 indicates 100% wilted. All of the assays had a minimum of 24 plants per treatment per assay. Results are representative of three independent experiments.

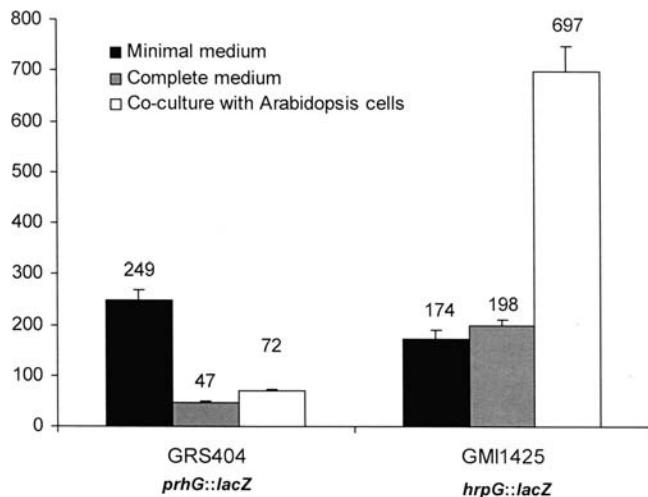


FIG. 3. Expression of *hrpG* and *prhG* in different media and coculture with plant cells. Strains GRS404 (*prhG::lacZ*) and GMI1425 (*hrpG::lacZ*) were grown for 16 h in minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration in B medium (complete medium) and in coculture with *Arabidopsis* At-202 cells in Gamborg medium. β -Galactosidase activity is expressed in Miller units. Each measurement corresponds to the average of four replicates, and bars indicate standard deviations.

condition. In the presence of *Arabidopsis* plant cells, *prhG* expression levels were even lower than those detected in minimal medium and ~ 10 times lower than those of *hrpG*. Similar observations were made when both strains were grown in tomato cell suspensions (data not shown). These data show that the two regulatory genes respond differently to environmental signals: transcription of *hrpG* is specifically enhanced in response to plant signals, while transcription of *prhG* appears to be mainly induced under minimal medium conditions.

Transcriptomic profiling of a *prhG* mutant reveals that the PrhG regulon significantly differs from the HrpG regulon. In order to determine the complete PrhG regulon, a GMI1000 whole-genome microarray (26) was used to compare the transcriptomes of *R. solanacearum* GMI1000 and its *prhG* deletion mutant derivative. Both strains were grown to late exponential phase in minimal medium, which has been shown to induce the expression of *hrp* genes (3), as well as *prhG*. Using >1.3 as the threshold of the absolute \log_2 ratio (an approximately threefold difference from the wild-type RNA level), we identified 95 genes as activated by PrhG and 1 gene (RSc1863) as repressed. The PrhG regulon largely overlaps the previously described HrpB regulon: nearly 75% of the genes which are activated by PrhG have already been proven to be activated by HrpB, and the gene repressed by PrhG is also repressed by HrpB (26) (see Table S1 in the supplemental material).

The comparison of the transcriptomes of *R. solanacearum* GMI1000 and a *prhG*-overexpressing strain (GMI1000/pLP2) enabled us to identify 21 additional genes upregulated by PrhG, 17 of which also belong to the HrpB regulon, and 22 additional genes repressed by PrhG, 15 of which are also repressed by HrpB. Finally, in order to avoid possible heterologous complementation of PrhG by HrpG, we also compared gene expression in the $\Delta hrpG \Delta prhG$ double mutant with that in the $\Delta hrpG \Delta prhG$ mutant expressing a *prhG* copy on a

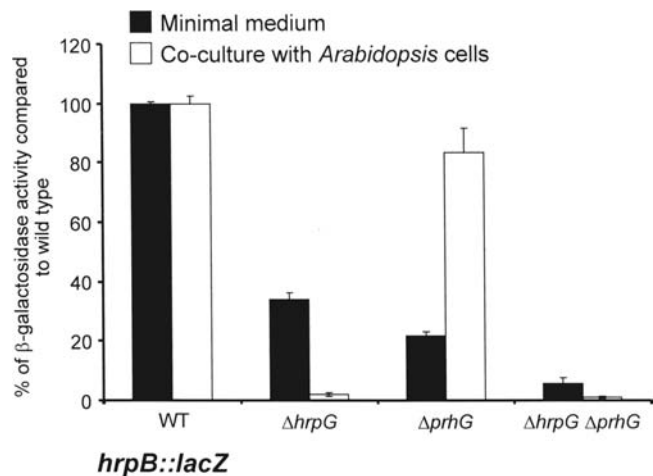


FIG. 4. Expression of *hrpB* in different genetic backgrounds after 16 h of growth in minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration and in coculture with *Arabidopsis* At-202 cells in Gamborg medium. β -Galactosidase activity is expressed as a percentage of the expression level measured in the wild-type (WT) genetic background. Each measurement corresponds to the average of four replicates, and bars indicate standard deviations.

plasmid (pLP2). Here again, almost all of the differentially expressed genes were found to be part of the *hrpB* regulon (data not shown).

In conclusion, the transcriptomic profiling analyses performed showed that PrhG mainly controls the expression of *hrpB* and thus of the genes regulated by HrpB. Besides the genes belonging to the HrpB regulon, 39 genes appeared to have a transcription level specifically altered in the *prhG* mutant, 32 of which are under positive control and only 7 of which are under negative control (see Table S1 in the supplemental material). Except for one gene, none of the genes known to be regulated by HrpG independently of HrpB (33) was found to be regulated by PrhG. The exception is the RSp0201 gene, which encodes a conserved hypothetical protein of unknown function. We generated a disruption mutant of RSp0201 in GMI1000 and found that its pathogenicity was not altered on tomato plants (data not shown). Therefore, rather surprisingly, the overlap between the PrhG and HrpG regulons is essentially reduced to the HrpB regulon.

PrhG controls the expression of *hrpB* and HrpB-regulated genes. To confirm the control of *hrpB* expression by PrhG, the *hrpB::lacZ* fusion from strain GMI1475 (16) was introduced into the *prhG* deletion mutant. The level of transcription of *hrpB* in this strain was measured by β -galactosidase activity and compared to that measured in a wild-type genetic background. The results showed a threefold decrease in *hrpB* expression in the *prhG* deletion mutant after growth of the strains in minimal medium compared to that in the wild-type genetic background (Fig. 4). In contrast, no decrease in *hrpB* expression was measured in the *prhG* deletion mutant compared to its expression in the wild-type strain upon coculture of these strains with tomato or *A. thaliana* cell suspensions. The comparison of *hrpB* expression in the mutant strains indicates that both HrpG and PrhG are required for full induction of *hrpB* in minimal me-

TABLE 2. β -Galactosidase activities obtained with *hrpY::lacZ* and *popA::lacZ* fusions in different genetic backgrounds

Genetic background	Avg (SD) β -galactosidase activity (Miller units) ^a with reporter fusion:	
	<i>hrpY::lacZ</i>	<i>popA::lacZ</i>
Wild type	741.0 (14.10)	1,677.0 (181.00)
$\Delta hrpG$	590.5 (4.90)	44.0 (2.80)
$\Delta prhG$	193.0 (15.60)	73.0 (2.80)
$\Delta hrpG \Delta prhG$	9.0 (1.40)	11.0 (5.70)

^a Measurements of four replicates were made after 16 h of bacterial growth in minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration.

dium but that in the presence of plant cells, only HrpG is involved in the induction of *hrpB* expression.

We also monitored the expression of two *hrpB*-regulated genes, *popA*, which codes for an *R. solanacearum* harpin (4), and *hrpY*, which encodes the structural component of the Hrp pilus (34). As shown in Table 2, expression of a *popA::lacZ* fusion decreased 23-fold in a *prhG* deletion mutant compared to that in the wild-type genetic background after the growth of these strains in minimal medium. For the *hrpY::lacZ* fusion, only a fourfold decrease was observed under the same conditions, but the impact was more important than that observed in the *hrpG* mutant. The transcription of both *popA* and *hrpY* was almost completely abolished in the double-deletion mutant.

Taken together, these results show that both HrpG and PrhG are necessary for full induction of *hrpB* and its targets in minimal medium.

Evidence that PrhG and HrpG can control *hrpB* expression independently. To get a better understanding of the regulation mechanism involving HrpG and PrhG in minimal medium, we conducted a complementation analysis of *R. solanacearum* mutants with *hrpG*, *prhG*, or both regulatory genes deleted, all bearing an *hrpB::lacZ* fusion. Three plasmid constructions were used: a plasmid carrying a copy of *prhG* (pLP2) under the control of its promoter, a plasmid with a copy of *hrpG* (pBBL12) under the control of its promoter, and a plasmid containing both regulators (pLP5), each under the control of its own promoter. Plasmids were introduced into the different *hrpB::lacZ* strains (the wild type and the $\Delta hrpG$, $\Delta prhG$, and $\Delta hrpG \Delta prhG$ mutants), and the expression of *hrpB* was measured by β -galactosidase assays.

The results presented in Fig. 5 indicate that both HrpG and PrhG are able to induce *hrpB* expression on their own. In the absence of the chromosomal copy of *hrpG* and *prhG*, plasmid pBBL12 or pLP2 carrying a copy of *hrpG* or *prhG*, respectively, is able to restore a significant and comparable expression level of the *hrpB::lacZ* reporter fusion. These results also show that under the same growth conditions and expressed on the same backbone vector, *prhG* and *hrpG* have similar *hrpB* promoter induction strengths. The complementation of the double mutant strain with pLP5, carrying both regulators, also restored *hrpB* expression, but not to a significantly higher level than the plasmids carrying a single regulatory gene. In conclusion, these complementation experiments show that HrpG and PrhG act independently to control the expression of their common target, *hrpB*, and suggest that no cooperation mechanism is involved in this control.

prhG does not control the expression of *hrpG* and vice-versa.

We then evaluated whether *prhG* could influence the transcription of its paralog *hrpG* or if, on the other hand, it could depend on *hrpG* for its own expression. The interdependency of each regulator was studied by using *R. solanacearum* strains carrying either a *hrpG::lacZ* or a *prhG::lacZ* fusion in a *prhG* or *hrpG* deletion background, respectively. β -Galactosidase assays proved that *prhG* transcription is independent of HrpG under minimal medium conditions, as the activity measured in the *hrpG* mutant is similar to that measured in the wild-type genetic background (Fig. 6B). Concerning the transcription of *hrpG*, the results showed a twofold decrease in β -galactosidase activity in the *prhG* deletion mutant and a twofold increase when an extra copy of *prhG* is introduced on a plasmid into the *hrpG::lacZ* strain. Because, it is known that HrpB exerts a positive but relatively modest impact on *hrpG* expression (16, 26), we investigated whether this slight effect of PrhG on *hrpG* expression is indirectly mediated through *hrpB*. As shown in Fig. 6A, this influence of PrhG on *hrpG* expression is abolished in an *hrpB* mutant, thus showing that the observed twofold factor maybe due to a positive feedback effect of HrpB on *hrpG*. Altogether, these data support the view that HrpG and PrhG do not exert direct transcriptional control on each other and belong to different signaling pathways.

DISCUSSION

In this study, we have identified PrhG, a novel component of the regulatory network controlling the expression of pathogenicity genes in *R. solanacearum*. The determination of the *prhG*

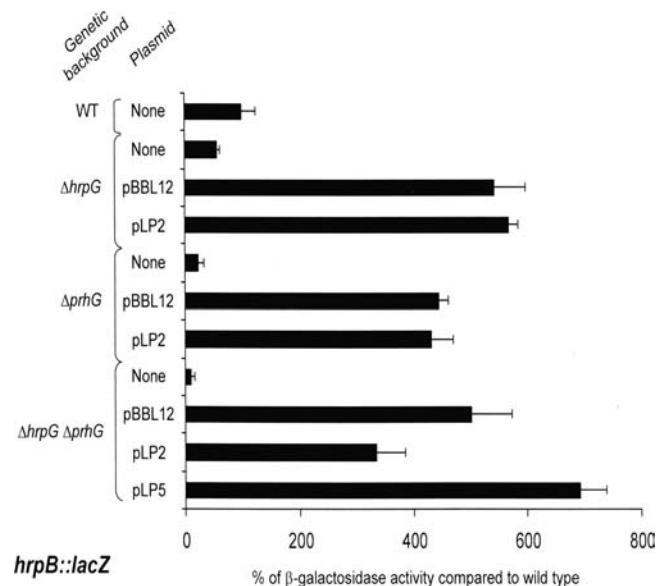


FIG. 5. Expression of *hrpB* in different genetic backgrounds after 16 h of growth in minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration. pBBL12, pLP2, and pLP5 are low-copy-number plasmids carrying, respectively, a copy of *hrpG*, a copy of *prhG*, and both *hrpG* and *prhG*, all under the control of their own promoters. β -Galactosidase activity is expressed as a percentage of the level of expression measured in the wild-type (WT) genetic background devoid of any plasmids. Each measurement corresponds to the average of three replicates, and bars indicate standard deviations.

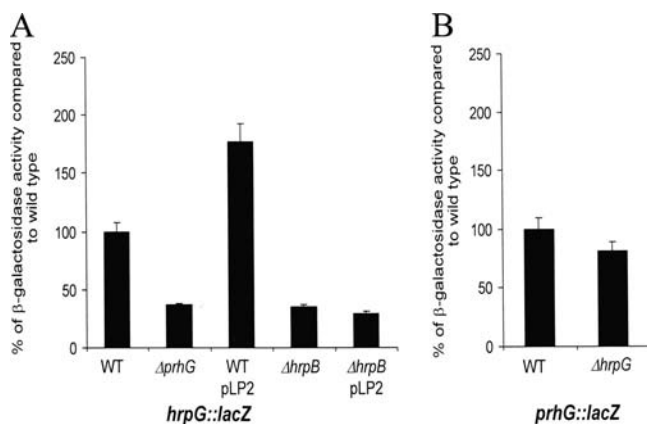


FIG. 6. Expression of *hrpG* (A) and *prhG* (B) in different genetic backgrounds after 16 h of growth in minimal medium supplemented with glutamate at a 20 mM final concentration. β -Galactosidase activity is expressed as a percentage of the level of expression measured in the wild-type (WT) genetic background. Each measurement corresponds to the average of four replicates, and bars indicate standard deviations.

regulon through transcriptomic profiling after growth of the bacteria in minimal medium revealed that a large proportion (75%) of the *prhG*-dependent genes are part of the previously described *hrpB* regulon (26). We confirmed by gene reporter fusion assays that expression of *hrpB* and some *hrpB*-controlled genes is indeed under the transcriptional control of *prhG* specifically under minimal medium conditions. PrhG is encoded by an OmpR/PhoB family regulatory gene which is the closest paralog to *hrpG*, a master regulator of pathogenicity genes in *R. solanacearum* (33).

Both PrhG and HrpG control the expression of T3SS and type III effector genes through *hrpB*. It is therefore rather surprising that a *prhG* mutant is only slightly affected in its pathogenicity and is not completely avirulent, as *hrpG* (or *hrpB*) deletion mutants have been shown to be (7). This marked difference in the *prhG/hrpG* mutant phenotypes on plants clearly reveals that the corresponding proteins have distinct roles, despite their strong relatedness and their having in common a major pathogenicity target (*hrpB*). The most probable hypothesis to explain the low impact of a *prhG* mutation on pathogenicity is based on the striking difference observed in the transcription pattern of the *prhG/hrpG* genes (Fig. 3). In the presence of plant signals, *hrpG* is much more strongly expressed in the bacterial cell and this low level of *prhG* expression in a *hrpG* mutant is probably not sufficient to restore pathogenicity. It is also possible that, in a plant environment, HrpG integrates specific signals or posttranslational modifications that do not impact PrhG so that specific activation of HrpG would bypass any requirement for PrhG. In this scenario, *prhG* seems to be dispensable for the expression of T3SS genes in plants as *hrpB* activation is mainly achieved through *hrpG*. This is supported by the data presented in Fig. 4 showing that the disruption of *prhG* has nearly no impact on *hrpB* expression after growth of bacteria in the presence of plant cells while disruption of *hrpG* abolishes *hrpB* expression.

The comparison of the defined PrhG and HrpG regulons reveals that they overlap only for the *hrpB* regulon. HrpG was

shown to control the expression of 184 genes independently of *hrpB* in minimal medium (33), and—with a single exception (RSp0201)—none of these genes appears to be a regulatory target of *prhG*, thus illustrating the specificity of these regulatory proteins. This specificity raises intriguing questions about the very high level of identity observed between PrhG and HrpG, especially in the helix-turn-helix domain which is predicted to bind DNA operator sequences. This suggests that the homologous PrhG and HrpG proteins are able to discriminate between specific target promoter sequences and that the *hrpB* promoter is unique in being a confirmed target of both regulators.

How is *hrpB* control jointly achieved by PrhG and HrpG? The fact that several OmpR/PhoB family regulators bind to DNA as dimers (13, 19) raised the possibility that an active PrhG/HrpG heterodimer controls *hrpB* transcription in minimal medium. Our complementation data (Fig. 5) do not fit this hypothesis: both regulators provided *in trans* on the same backbone vector are individually able to activate *hrpB* expression at similar levels. The use of the pLP5 construct containing *prhG* and *hrpG* on the same vector also revealed that there may be no cooperative binding on DNA since in the $\Delta hrpG \Delta prhG$ mutant background, complementation experiments with pLP5 did not lead to a significantly higher level of *hrpB* expression. The slight increase observed compared to complementation with only one of the regulators probably corresponds to an additive effect due to the presence of multiple copies of both regulatory genes. Although the mechanism of action and the DNA-binding specificities of PrhG and HrpG are still unknown, our data suggest that these two related regulators are able to activate *hrpB* independently. Simultaneous control of key T3SS promoters by distinct regulatory proteins has also been reported in other bacterial pathogens, such as *Salmonella* (11).

Because HrpG is the regulator acting just upstream of HrpB in the Hrp regulatory cascade, we determined whether PrhG could influence *hrpG* transcription (and could therefore indirectly control *hrpB*) or if, on the other hand, it was itself under the transcriptional control of HrpG. Our data show that the expression of each regulator is independent of that of the other. Interestingly, in the course of this investigation, we confirmed that *hrpG* expression is partially dependent on *hrpB* under minimal medium conditions. This had been previously observed through the transcriptomic profiling analysis of an *hrpB* deletion mutant, which showed decreased *hrpG* transcription (26). This retropositive regulatory loop illustrates the complex interplay between T3SS gene regulators in *R. solanacearum* (Fig. 7).

Since *prhG* is not crucial during plant pathogenesis, the biological relevance of this novel *hrp* regulatory component remains elusive. Surprisingly, transcriptomic profiling analyses revealed that, besides the *hrpB* regulon, *prhG* controls very few specific targets compared to *hrpG* (39 versus 184). Most of these *prhG*-specific genes were under positive control (32 out of 39), which makes unlikely a role for PrhG as a direct transcriptional repressor. The examination of the specifically activated genes does not provide any clue about the role of *prhG* during the *R. solanacearum* life cycle. In particular, none of these genes are clustered or organized in defined operons. Although eight of them (RSc0695, RSc1853, RSc2942,

Supplementary Material

Supplementary Table S1. List of the *prhG*-regulated genes identified through transcriptome analysis. The *prhG* regulon was determined using two comparisons: the wild-type strain (GMI1000) versus the *prhG* deletion mutant (GRS445) and the wild-type strain (GMI1000) versus the *prhG* overexpressing strain (GMI1000/pLP2, noted pLP2* in the table). For each gene and each experimental condition, the ratio (expressed as a log₂ value) of transcription of the studied strain is given together with the corresponding *p*-value of the Student *t*-test. Color highlights correspond to ranges of transcription ratio values as indicated below the table. Only genes presenting an absolute log ratio > 1.3 and *p*-values < 0.05 have been considered as belonging to the PrhG regulon.

Comparisons with previous studies have been led to determine whether the genes also belong to the HrpB and/or HrpG regulons (26, 34). The first part of the table presents genes which are activated by PrhG and the second part, genes which are repressed.

ID	HrpB regulated	HrpG regulated	GMI1000/GRS445 ratio	<i>p</i> -value	pLP2*/GMI1000 ratio	<i>p</i> -value	Gene	Features or functions
RSc0041	x	x	-1.67	0,01				TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc0086			-2.27	0,00	1,41	0,01	gstA	GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE
RSc0096	x	x	-2.23	0,00	1,96	0,00		HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0102	x		-4.01	0,00	2,52	0,00		CALCIUM BINDING HEMOLYSIN
RSc0220			-1.38	0,03				CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0390			-2.02	0,01	1,10	0,03	kdtB	PHOSPHOPANTETHEINE ADENYLYLTRANSFERASE
RSc0452	x		-1.91	0,00	1,59	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL TRANSMEMBRANE PROTEIN
RSc0507			-2.55	0,00	1,63	0,00		TRANSMEMBRANE AMINO ACID DEHYDROGENASE
RSc0594	x	x			1,82	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0608	x	x	-3.73	0,00	2,03	0,00	avrA	TYPE III EFFECTOR PROTEIN AVRA
RSc0616	x	x	-2.93	0,00	2,74	0,01		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0617	x	x	-3.03	0,00	2,78	0,01		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0695			-1.40	0,04				TYPE I SECRETION OUTER MEMBRANE PROTEIN
RSc0720	x	x	-1.54	0,00	1,29	0,00		TYPE 4 FIMBRIAL BIOGENESIS PILW-RELATED TRANSMEMBRANE PROTEIN
RSc0824	x	x	-1.52	0,00	1,28	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc0894	x	x	-3.85	0,00	2,71	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc0895	x	x	-2.03	0,00	1,62	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc0995			-0.92	0,00	1,50	0,00		PUTATIVE SPERMIDINE SYNTHASE
RSc1356	x	x			1,96	0,00	ripG	TYPE III EFFECTOR PROTEIN GALA 6
RSc1357	x	x	-2.02	0,00	2,01	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN GALA 7
RSc1364			-1.59	0,00	1,43	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1474	x	x	-2.97	0,00	1,87	0,00		TYPE III EFFECTOR CHAPERONE
RSc1723	x	x	-4.36	0,00	2,64	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc1794	x		-4.08	0,00	1,87	0,00		ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN
RSc1800	x	x			1,43	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN GALA4
RSc1815	x	x			1,46	0,00		TYPE III EFFECTOR AVRBS3 FAMILY PROTEIN
RSc1816	x				1,45	0,02		GCN5-RELATED N-ACETYLTRANSFERASE
RSc1818	x	x			1,51	0,00	metG2	METHIONYL-tRNA SYNTHETASE
RSc1819	x				1,30	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1841	x		-2.47	0,00	1,87	0,00		HYDROLASE
RSc1853			-1.38	0,00	0,46	0,04		HYD SECRETION FAMILY PROTEIN
RSc1916			-3.63	0,00	2,41	0,00		BACTERIOPHAGE PROTEIN
RSc2147	x		-1.90	0,01	1,37	0,01	polS	SORBITOL DEHYDROGENASE
RSc2190	x		-3.23	0,00	2,13	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc2200	x		-1.97	0,00	1,54	0,00		ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN
RSc2206			-1.46	0,00	0,91	0,02		RHODANESE DOMAIN CONTAINING PROTEIN
RSc2488			-2.64	0,00	1,85	0,00		HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc2510			-3.62	0,00	2,36	0,00		TRAP DICARBOXYLATE TRANSPORTER
RSc2775	x	x	-2.89	0,00	2,67	0,01	popW	TYPE III EFFECTOR HARPIN FAMILY PROTEIN
RSc2897	x	x	-1.62	0,00	1,99	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc2899	x	x	-1.94	0,01	1,09	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc2909	x		-1.97	0,00	1,49	0,00	mdoH	GLUCAN BIOSYNTHESIS GLUCOSYLTRANSFERASE
RSc2942			-2.42	0,00	1,41	0,00	tatA	TWIN-ARGININE TRANSLOCASE A
RSc3114			-1.30	0,00	0,93	0,00	gspD	GENERAL SECRETORY PATHWAY PROTEIN D
RSc3133	x	x			1,31	0,00		GCN5-RELATED N-ACETYLTRANSFERASE
RSc3155	x	x	-1.09	0,02	1,44	0,01		HYDROLASE
RSc3209			-1.39	0,04				DEHYDROGENASE
RSc3241			-2.83	0,00				TRUNCATED YOPP FAMILY TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc3290	x	x	-2.92	0,00				TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSc3298			-2.37	0,00	1,38	0,02		CARBOXYLATE-AMINE LIGASE
RSc3396			-1.51	0,02	1,06	0,01		TYPE I RESTRICTION ENZYME M PROTEIN
RSc3428			-1.49	0,00	1,80	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0087	x		-2.58	0,00	2,14	0,00		LEUCINE-RICH-REPEATS CONTAINING PROTEIN
RSp0093	x		-1.74	0,02			TIS142	IS1421-TRANSPOSASE ORFB
RSp0097	x		-1.33	0,00	1,94	0,00		ANKYRIN-REPEAT CONTAINING PROTEIN
RSp0142			-1.33	0,04	0,54	0,03		GENERAL SECRETION PATHWAY GSPG RELATED PROTEIN
RSp0158	x		-3.81	0,00	2,69	0,00		HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0159	x	x	-3.81	0,00	2,53	0,00		HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0201		x	-5.55	0,00	2,37	0,00		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0213	x	x	-1.90	0,00	1,75	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0216	x	x	-2.01	0,00	1,86	0,00		TYPE III EFFECTOR PROTEIN

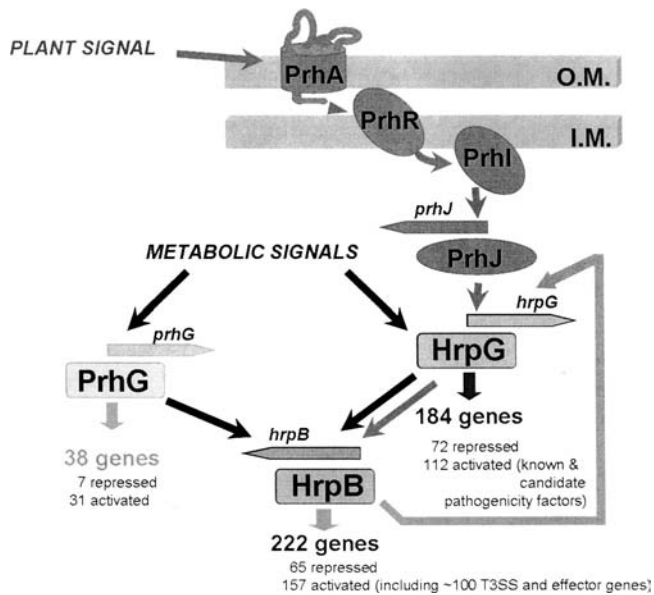


FIG. 7. Model describing the regulation network involved in the control of *R. solanacearum* pathogenicity. HrpB is the regulator mainly devoted to the control of the T3SS and effector gene transcription. PrhG and HrpG both regulate the expression of *hrpB* but belong to different signaling pathways and integrate at least two distinct inducing signals. The nature of the activating plant signal(s) is unknown, but it requires physical contact between bacteria and plant cells (1). The metabolic signals indicated here are those perceived by bacteria grown under minimal medium conditions. HrpG regulates, independently of HrpB, the expression of a subset of genes that includes several virulence and pathogenicity factors (33). The specific subset of genes regulated by PrhG is smaller and contains only one other target regulated by HrpG, RSp0201. The feedback loop by which HrpB induces *hrpG* (see text) is also shown. O.M., outer membrane; I.M., inner membrane.

RSc3114, RSp0142, RSp0312, RSp0934, and RSp1577) are predicted to be involved in type I or II secretion processes, the significance of this is unknown.

The fact that *prhG* is an ancestral gene broadly conserved among the taxonomically diverse *R. solanacearum* phylotypes is an argument supporting the view that this gene is not an evolutionary remnant of the *hrp* regulatory system and may have conserved a specific function. The *prhG* gene was indeed detected through comparative genomic hybridization in a selection of 18 strains representative of the biodiversity of the species (17), also suggesting that *prhG* is not the result of a recent duplication of *hrpG*. It is interesting that, unlike *hrpG*, which is universally conserved among *Xanthomonas* spp. and *R. solanacearum* as a T3SS regulator component, *prhG* appears to be specific to *R. solanacearum*, as no direct counterpart could be detected in any of the *Xanthomonas* sp. genomes sequenced to date. The analysis of phylogenetic relationships suggests that the orthologous *hrpG* genes from *R. solanacearum* and *Xanthomonas* spp. have diverged before the *prhG*/*hrpG* separation in *R. solanacearum* (Fig. 1B), thus raising the possibility that *Xanthomonas* HrpG proteins could combine the specificities of both the HrpG and PrhG proteins of *R. solanacearum*.

The findings that *prhG* expression is specifically induced under minimal medium conditions and that the *prhG*-depen-

dent regulation of *hrpB* follows this *prhG* expression profile strongly suggest that *prhG* has an important role in activating the T3SS before contact with host cells, which is the signal triggering the activation of *hrpG* (1). In the case of the *hrp* gene expression, minimal medium conditions have been proposed to mimic the plant apoplast environment (3, 30, 32), and this probably corresponds to an early phase of the plant-bacterium interaction before the translocation of type III effectors inside plant cells. It is tempting to speculate that minimal medium conditions reproduce the conditions under which the bacteria first perceive some host physicochemical signals necessary to induce the setting up of a functional T3SS before a second, stronger, plant cell wall-specific signal specifically transduced through *hrpG* would act as a type III effector translocation-triggering signal. Since a *prhG* mutant is not affected or very slightly affected in pathogenicity on tomato and *Arabidopsis* plants, this scenario implies that the first step could also be mediated through *hrpG*. It is possible that *prhG* requirement may be more important under other conditions such as on other host plants (considering the very wide host range of the bacterium) or respond specifically to some unknown signals in the environment that were absent under the experimental conditions of the present study. Further work is necessary to define the mechanistic basis of *hrpB* regulation by PrhG and obtain a better definition of the environmental signals involved.

ACKNOWLEDGMENTS

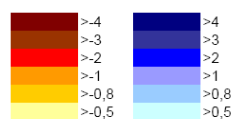
We are very grateful to Christian Boucher for critical reading of the manuscript and fruitful discussions, Alice Guidot and Nemo Peeters for help with protein sequence analysis, and Patrick Barberis and Laure Bapaume for technical assistance.

This work was funded by grants from the French Ministry of Science to L.P. and by an ANR-05-242-798 grant to S.G., as well a European reintegration grant (MERG030948) and grant BIO06-0919 from the Spanish Ministry of Science and Technology to M.V.

REFERENCES

- Aldon, D., B. Brito, C. Boucher, and S. Genin. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* **19**:2304-2314.
- Alfano, J. R., and A. Collmer. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**:5655-5662.
- Arlat, M., C. L. Gough, C. Zischek, P. A. Barberis, A. Trigalet, and C. Boucher. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:187-193.
- Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and C. A. Boucher. 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* **13**:543-553.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1989. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York, NY.
- Brito, B., D. Aldon, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin. 2002. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:109-119.
- Brito, B., M. Marena, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin. 1999. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **31**:237-251.
- Cunnac, S., C. Boucher, and S. Genin. 2004. Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **186**:2309-2318.
- Cunnac, S., A. Occhialini, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin. 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol. Microbiol.* **53**:115-128.
- Denny, T. P. 2006. Plant Pathogenic *Ralstonia* species, p. 573-644. *In* S. S.

ID	HrpB regulated	HrpG regulated	GM1000/GRS445 ratio	pLP2*/GM1000 ratio	Gene	Features or functions
RSp0218	x	x	-1,32	1,75	0,01	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0225			-2,27	0,99	0,01	fca p-HYDROXYCINNAMOYL CoA HYDRATASE/LYASE
RSp0304	x	x	-3,39	1,95	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0312			-2,41	1,63	0,00	mexD MULTIDRUG EFFLUX SYSTEM PROTEIN
RSp0316			-1,58	1,42	0,00	DIOXYGENASE
RSp0528	x		-1,53	1,00	0,00	OUTER MEMBRANE EFFLUX PROTEIN
RSp0538				2,64	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0572	x	x	-3,32	2,27	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0587	x			1,63	0,00	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0626			-1,24	1,55	0,00	cobN COBALAMIN BIOSYNTHESIS PROTEIN
RSp0693	x	x	-3,56	2,29	0,00	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN
RSp0694	x	x	-1,06	1,76	0,00	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN, TRYPTOPHAN-2,3-DIOXYGENASE
RSp0695	x	x	-1,21	1,32	0,00	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN
RSp0696	x		-3,59	1,98	0,00	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN, EPIMERASE
RSp0697	x	x	-1,88	2,10	0,02	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN, OXIDOREDUCTASE
RSp0698	x	x	-1,14	1,61	0,00	HDF BIOSYNTHESIS PROTEIN, AMINOTRANSFERASE
RSp0732	x	x	-1,88	2,11	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0733			-3,40	2,41	0,00	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp0825	x	x	-1,47	1,61	0,00	SPERMIDINE SYNTHASE
RSp0839	x	x	-1,57	2,39	0,00	TYPE III SECRETION PILIN-RELATED PROTEIN
RSp0841	x	x	-2,10	1,59	0,00	TYPE III SECRETION ASSOCIATED LYTC TRANSGLYCOSYLASE PROTEIN
RSp0846	x		-1,82	0,93	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0853	x		-2,18	2,28	0,00	hpaB TYPE III EFFECTOR CHAPERONE
RSp0855	x	x	-5,45	2,85	0,00	hrpY HRP PILUS SUBUNIT HRPY
RSp0856	x	x	-2,89	2,39	0,00	hrpX HRPX
RSp0860	x	x	-4,12	2,24	0,00	hrcR HRP CONSERVED PROTEIN HRCR
RSp0861	x	x	-1,45	1,44	0,00	hrcQ HRP CONSERVED PROTEIN HRCQ
RSp0865	x	x	-3,27	1,99	0,01	hrpK HRPK
RSp0866	x	x	-3,66	2,24	0,00	hrpJ HRPJ PROTEIN
RSp0867	x	x	-1,37	0,83	0,01	hrcJ HRP CONSERVED LIPOPROTEIN HRCJ
RSp0868	x	x	-2,48	1,80	0,01	hrpH HRPH
RSp0871	x	x	-0,68	1,70	0,00	hrpD HRPD
RSp0872	x	x	-2,25	1,33	0,02	hrcT HRP CONSERVED PROTEIN HRCT
RSp0873	x	x	-1,36	1,13	0,03	hrpB TYPE III SECRETION REGULATORY PROTEIN HRPB
RSp0875	x	x	-1,46	1,80	0,00	popC TYPE III EFFECTOR PROTEIN POPC
RSp0876	x	x	-3,11	2,32	0,00	popB TYPE III EFFECTOR PROTEIN POPB
RSp0877	x	x	-4,13	2,82	0,00	popA TYPE III EFFECTOR HARPIN FAMILY PROTEIN POPA
RSp0879	x	x		1,54	0,01	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp0900	x	x	-4,01	2,50	0,00	popF2 TYPE III TRANSLOCON PROTEIN POPF2
RSp0930	x			1,62	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN SKWP3
RSp0934			-2,97	1,45	0,00	ABC TRANSPORTER PERMEASE COMPONENT PROTEIN
RSp1023			-2,12	1,13	0,00	TRANSCRIPTION REGULATOR PRHG
RSp1130	x	x	-1,81	1,28	0,01	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp1150	x	x	-1,52	1,19	0,01	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1212	x	x	-4,05	2,61	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp1276			-3,12	2,17	0,00	ATP-DEPENDENT DNA HELICASE II
RSp1277	x	x	-0,73	1,62	0,00	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp1311			-1,77	1,66	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1323	x		-2,35	1,68	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1384	x	x		1,92	0,01	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp1466	x	x	-1,85			CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1467	x	x	-2,84	1,59	0,00	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1475	x	x	-2,78	1,54	0,02	TYPE III EFFECTOR PROTEIN
RSp1555	x	x	-5,23	2,65	0,01	popF1 TYPE III TRANSLOCON PROTEIN POPF1
RSp1556	x		-2,16	1,35	0,00	hexR TRANSCRIPTION REGULATOR RPIR FAMILY
RSp1577			-1,44	0,05		ABC TRANSPORTER PERMEASE COMPONENT PROTEIN
RSc0225				-1,49	0,05	NUCLEOTIDYL-TRANSFERASE LIKE PROTEIN
RSc0770	x			-1,92	0,02	DEHYDROGENASE
RSc0958	x			-1,48	0,00	TYPE VI SECRETION SYSTEM VGR FAMILY PROTEIN
RSc0959	x			-1,71	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1863	x	x	3,86	-1,60	0,04	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1896				-1,30	0,02	PROPHAGE INTEGRASE PROTEIN
RSc1904	x	x		-2,34	0,00	BACTERIOPHAGE TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN
RSc1927	x			-1,30	0,01	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1942	x			-1,40	0,02	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc1943	x			-1,86	0,01	TRANSMEMBRANE
RSc1944	x			-1,97	0,00	TYPE VI SECRETION SYSTEM VGR FAMILY PROTEIN
RSc2218				-1,34	0,03	PREDICTED FLAVOPROTEIN
RSc3121				-1,47	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSc3220	x			-1,56	0,01	TYPE VI SECRETION SYSTEM VGR FAMILY PROTEIN
RSc3308	x			-1,71	0,03	TRANSCRIPTION REGULATOR LYSR FAMILY
RSc3347	x			-1,73	0,05	TRANSCRIPTION REGULATOR MERR FAMILY
RSc3385				-1,31	0,01	SIGNAL TRANSDUCTION HISTIDINE KINASE
RSp0081	x	x		-2,63	0,00	GCN5-RELATED N-ACETYLTRANSFERASE
RSp0484	x			-1,46	0,00	AMIDINOTRANSFERASE
RSp0995				-1,49	0,04	dctA2 C4-DICARBOXYLATE TRANSPORT PROTEIN
RSp1377	x	x		-1,42	0,00	TRANSCRIPTION REGULATOR? ANSC FAMILY
RSp1580				-1,46	0,04	HYPOTHETICAL PROTEIN
RSp1643	x	x		-1,86	0,00	HYPOTHETICAL PROTEIN



- Gnanamanickam (ed.), Plant-associated bacteria. Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands.
11. Feng, X., D. Walthers, R. Oropeza, and L. J. Kenney. 2004. The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* **54**:823–835.
 12. Galán, J. E., and H. Wolf-Watz. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**:567–573.
 13. Gao, R., and A. M. Stock. 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:133–154.
 14. Genin, S., and C. Boucher. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Mol. Plant Pathol.* **3**:111–118.
 15. Genin, S., B. Brito, T. P. Denny, and C. Boucher. 2005. Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett.* **579**:2077–2081.
 16. Genin, S., C. L. Gough, C. Zischek, and C. A. Boucher. 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **6**:3065–3076.
 17. Guidot, A., P. Prior, J. Schoenfeld, S. Carrere, S. Genin, and C. Boucher. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* **189**:377–387.
 18. Huynh, T. V., D. Dahlbeck, and B. J. Staskawicz. 1989. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* **245**:1374–1377.
 19. Kenney, L. J. 2002. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:135–141.
 20. Lewis, J. D., D. S. Guttman, and D. Desveaux. 2009. The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**:1055–1063.
 21. Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. Panopoulos. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola." *J. Bacteriol.* **166**:1096–1105.
 22. Marena, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher, and M. Arlat. 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**:437–453.
 23. Marx, C. J., and M. E. Lidstrom. 2002. Broad host range cre-lox system for antibiotic marker recycling in Gram-negative bacteria. *Biotechniques* **33**:1062–1067.
 24. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 25. Mole, B. M., D. A. Baltrus, J. L. Dangel, and S. R. Grant. 2007. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **15**:363–371.
 26. Occhialini, A., S. Cunnac, N. Reymond, S. Genin, and C. Boucher. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:938–949.
 27. Poueymiro, M., S. Cunnac, P. Barberis, L. Deslandes, N. Peeters, A. C. Cazale-Noel, C. Boucher, and S. Genin. 2009. Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host range specificity on tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**:538–550.
 28. Poueymiro, M., and S. Genin. 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:44–52.
 29. Qian, W., Z.-J. Han, and C. He. 2008. Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**:151–161.
 30. Rahme, L. G., M. N. Mindrinos, and N. J. Panopoulos. 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **174**:3499–3507.
 31. Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Manganot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choinsne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Signier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C. A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**:497–502.
 32. Tang, X., Y. Xiao, and J.-M. Zhou. 2006. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:1159–1166.
 33. Valls, M., S. Genin, and C. Boucher. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2**:e82.
 34. Van Gijsegem, F., J. Vasse, J. C. Camus, M. Marena, and C. Boucher. 2000. *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* **36**:249–260.
 35. Vasse, J., S. Genin, P. Frey, C. Boucher, and B. Brito. 2000. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:259–267.
 36. Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **178**:3462–3469.
 37. Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:704–712.
 38. Yoshimochi, T., Y. Hikichi, A. Kiba, and K. Ohnishi. 2009. The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signalling proteins. *J. Bacteriol.* **191**:3424–3428.
 39. Zhou, J. M., and J. Chai. 2008. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**:179–185.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Vers une approche mécanistique pour comprendre le rôle de PrhG dans la régulation de *hrpB* chez *R. solanacearum*

Les études entreprises sur le régulateur PrhG n'ont pas permis, dans les conditions utilisées, de mettre en évidence une fonction biologique précise de ce régulateur. Il est possible que ce régulateur soit impliqué dans la mise en place de la pathogénie sur des plantes hôtes qui ne sont pas habituellement utilisées au laboratoire ou qu'il soit impliqué dans d'autres phases que le cycle infectieux, telle que la phase de vie saprophyte de la bactérie dans le sol.

Il serait intéressant de comparer les pouvoirs d'infection et de colonisation de différents mutants (HrpG, HrpB et PrhG) par des analyses cytologiques. Cependant, étant donné la virulence d'un mutant PrhG sur tomate, il est peu probable que celui-ci présente des capacités d'infection ou de colonisation différentes de la souche sauvage GMI1000. Le profil d'expression de ces gènes *in planta* n'a pas non plus été établi. L'expression de *prhG* est induite en milieu minimum et le milieu minimum mimerait les conditions rencontrées dans l'apoplaste (Rahme *et al.*, 1992) : il serait donc intéressant d'utiliser des fusions rapportrices de manière à déterminer si *prhG* est induit dans l'apoplaste de la plante et de comparer son expression *in planta* avec celle de *hrpG* et *hrpB*. Ces expériences nous permettraient de déterminer si *prhG* est induit à un moment très spécifique du processus infectieux ou non. Cependant ces expériences n'apporteraient qu'une réponse limitée, il est en effet possible que des phénomènes de régulation post-transcriptionnelle ou de modifications post-traductionnelles soient également mis en jeu et que ces signaux soient spécifiquement perçus par l'un ou l'autre des régulateurs.

La particularité du régulateur PrhG est sa très forte homologie avec le régulateur central de la pathogénie chez *R. solanacearum*, HrpG. Ce système mettant en jeu deux régulateurs fortement homologues et contrôlant tous deux l'expression de *hrpB*, régulateur du système de sécrétion de type III est tout à fait original. Chez les espèces de *Xanthomonas*, l'existence d'un tel système n'a pas été mise en évidence, pourtant ces espèces bactériennes partagent avec *R. solanacearum* les dernières étapes de la régulation du système de sécrétion de type III, avec un orthologue à HrpG, également appelé HrpG, qui contrôle l'expression de l'orthologue à *hrpB*, appelé HrpX, qui induit l'expression des gènes du système de sécrétion de type III. L'analyse phylogénétique des protéines HrpG_{Rs}, HrpG_{Xspp} et PrhG montre que les gènes HrpG de *R. solanacearum* et *Xanthomonas spp.* ont divergé avant la séparation de

HrpG et PrhG chez *R. solanacearum*. De manière intéressante, le fonctionnement et le rôle biologique de HrpG_{Xspp} rassemblent des caractéristiques de HrpG_{Rs} et PrhG. Par exemple, l'expression de *hrpG*_{Xspp} est induite en milieu minimum, contrairement à l'expression de *hrpG*_{Rs}, elle l'est également en présence de cellules végétales contrairement à l'expression de *prhG* (Wengelnik *et al.*, 1992). HrpG_{Xspp} est nécessaire à la virulence des *Xanthomonas spp.* mais le régulon de HrpG_{Xspp} semble être beaucoup plus restreint que le régulon de HrpG_{Rs} et serait principalement HrpX-dépendant (Noël *et al.*, 2001 ; Valls *et al.*, 2006).

Une des différences majeures entre les régulateurs HrpG et PrhG résident dans leur profil de transcription à savoir que l'expression de *prhG* est induite en milieu minimum et que l'expression de *hrpG* est très fortement induite en présence de cellules végétales mais ne répond pas au signal milieu minimum au niveau transcriptionnel. Pour montrer que cette différence dans les profils d'expression des deux régulateurs n'explique pas les différences observées dans les phénotypes de virulence, il serait nécessaire d'exprimer le gène *prhG* sous contrôle du promoteur du gène *hrpG* et vérifier si cette construction permet ou non de rétablir la virulence d'un mutant $\Delta hrpG$. Cependant les analyses transcriptomiques effectuées avec un mutant $\Delta prhG$ apportent un premier élément de réponse en montrant que le profil transcriptionnel de ces gènes n'est pas la seule différence existant entre les régulateurs HrpG et PrhG. En effet, ces analyses transcriptomiques ont montré que HrpG et PrhG ont pour seules cibles communes les gènes *hrpB* et *rsp0201*. Ce résultat est assez surprenant sachant que HrpG et PrhG partagent une très forte identité et que cette identité est particulièrement élevée (96 % au niveau de la séquence protéique) dans le domaine Hélice-Tour-Hélice, domaine de reconnaissance et de fixation à l'ADN cible. Il semble donc que la différence entre les deux régulateurs HrpG et PrhG ne soit pas uniquement due à leur différence dans leur profil de transcription.

Pour mieux comprendre le fonctionnement de ce système original et mieux caractériser le mode d'action de ces deux régulateurs nous avons décidé d'entreprendre une approche plus mécanistique en travaillant sur le promoteur du gène *hrpB*, seule cible commune vérifiée de ces deux régulateurs. L'objectif de cette approche est de mieux comprendre quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent à HrpG et PrhG d'agir sur un même promoteur et comment ces deux régulateurs se partagent le contrôle de l'expression de *hrpB*.

CHAPITRE II.

**Détermination de la séquence nucléotidique *cis*-
régulatrice reconnue par HrpG**

CHAPITRE II.

**Détermination de la séquence nucléotidique *cis*-
régulatrice reconnue par HrpG**

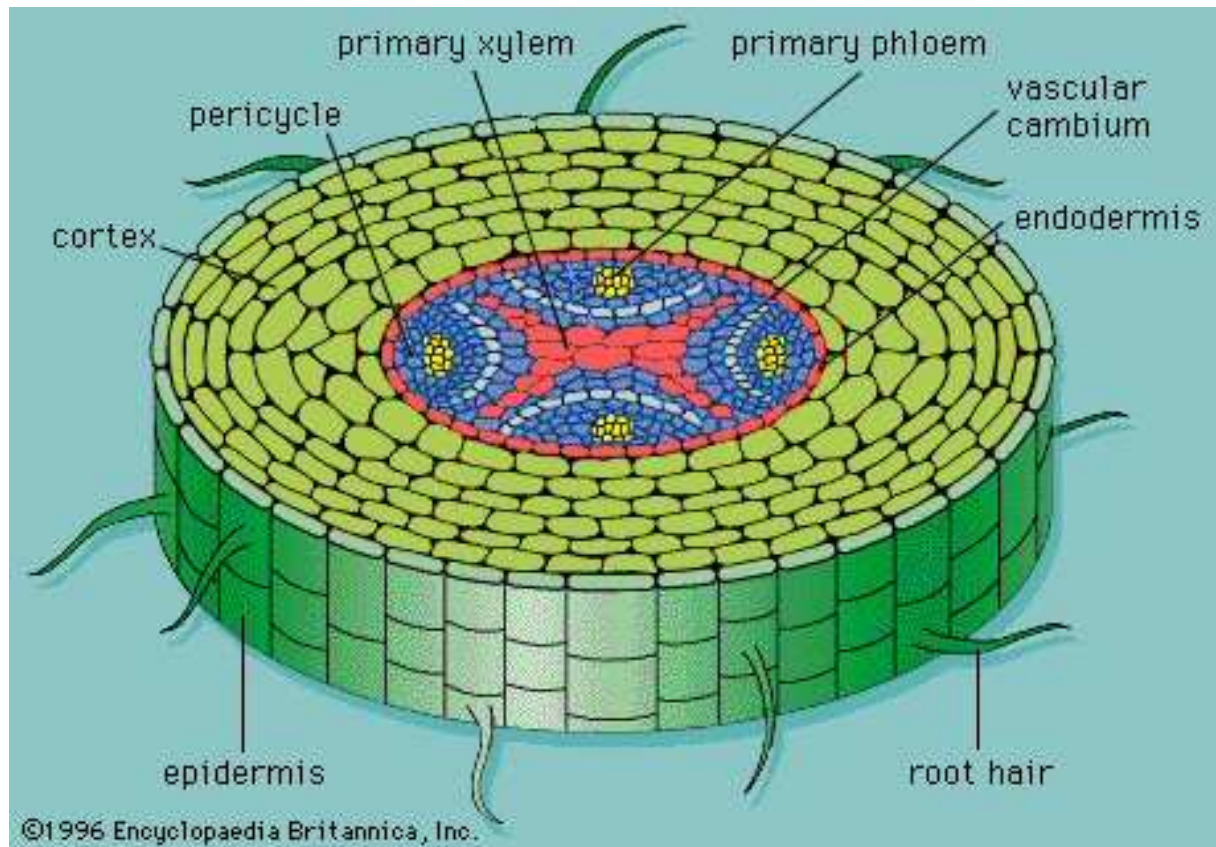


Figure 21. Coupe transversale d'une racine

Lors du processus infectieux *R. solanacearum* pénètre dans la racine de la plante hôte via des blessures naturelles, des points d'émergence de racines secondaires ou l'apex racinaire. La bactérie se développe ensuite dans les espaces intercellulaires du cortex, cette étape de multiplication est importante pour la réussite du processus infectieux. La bactérie doit ensuite atteindre les vaisseaux du xylème, pour pouvoir envahir la plante entièrement. Cette étape nécessite le franchissement de la barrière endodermique, autre étape critique de la mise en place du processus infectieux.

CHAPITRE II.

Détermination de la séquence nucléotidique *cis*-régulatrice reconnue par HrpG

1. HrpG, régulateur central du pouvoir pathogène

1.1 *Un mutant hrpG est diminué dans sa capacité de colonisation de la plante*

HrpG est le régulateur central du pouvoir pathogène chez *R. solanacearum*. Il intègre dans la cascade de régulation Prh les deux signaux inducteurs des gènes *hrp* : le signal métabolique du milieu minimum et le signal plante perçu par le récepteur PrhA. HrpG contrôle également l'expression d'autres gènes dont le rôle dans la virulence et dans la colonisation de la plante hôte a été démontré.

Des analyses cytologiques ont été réalisées sur la tomate pour déterminer et comparer les capacités d'infection et de colonisation d'un mutant *hrpB*, d'un mutant *hrpG* et d'un mutant *prhJ* (Vasse *et al.*, 2000). Un mutant *prhJ* possède les mêmes capacités que la souche sauvage. Comme les gènes *hrp* sont activés *in vitro* en milieu minimum indépendamment de PrhJ, il est possible que ce stimulus métabolique soit également présent *in planta*, expliquant ainsi les phénotypes de colonisation et d'infection observés pour un mutant *prhJ* (Vasse *et al.*, 2000). Ces résultats concordent avec les tests de pouvoir pathogène effectués sur la tomate pour lesquels un mutant *prhJ* présente un pouvoir pathogène faiblement réduit alors qu'un mutant *hrpG* est totalement avirulent (Brito *et al.*, 1999). L'intégration des différents signaux est nécessaire à l'apparition complète de la maladie mais aussi à la colonisation bactérienne *in planta*.

Un mutant *hrpB*, souche totalement avirulente, présente un pouvoir d'infection et de colonisation réduit. Sa capacité à se multiplier *in planta* est également affectée. Le phénotype de colonisation de cette souche est identique à celui observé pour un mutant *hrcV*, gène codant pour un élément de structure du système de sécrétion de type III. Ces mutants, *hrpB* et *hrcV*, sont caractérisés par une infection racinaire très limitée et une

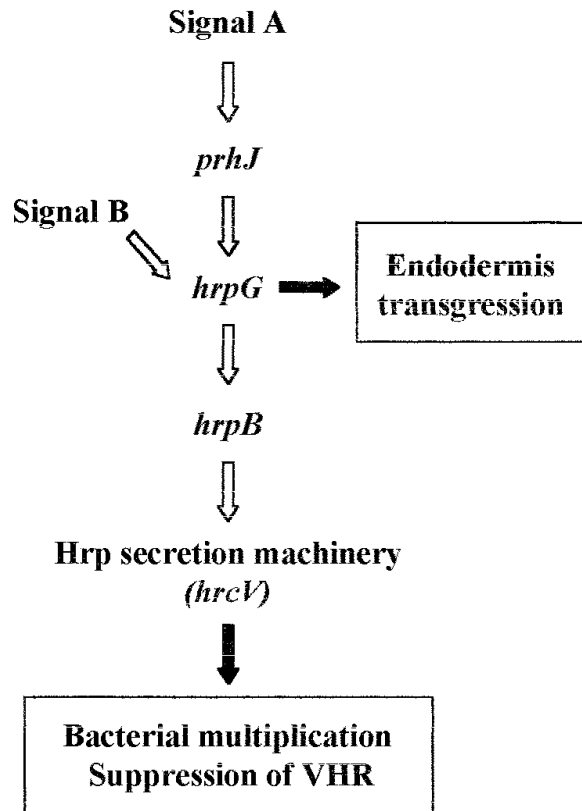


Figure 22. Schéma récapitulatif des phénotypes de colonisation de différents mutants de la cascade de régulation du SST3.

La fonction de HrpB et HrcV (et donc du système de sécrétion de type III) est de favoriser le développement bactérien *in planta* et de supprimer la réponse vasculaire hypersensible (VHR). HrpG semble contrôler d'autres déterminants bactériens, nécessaires au franchissement de la barrière endodermique.

Le signal A représente le signal plante perçu par PrhA, le signal B représente le signal métabolique présent dans le milieu minimum.

(D'après Vasse *et al.*, 2000)

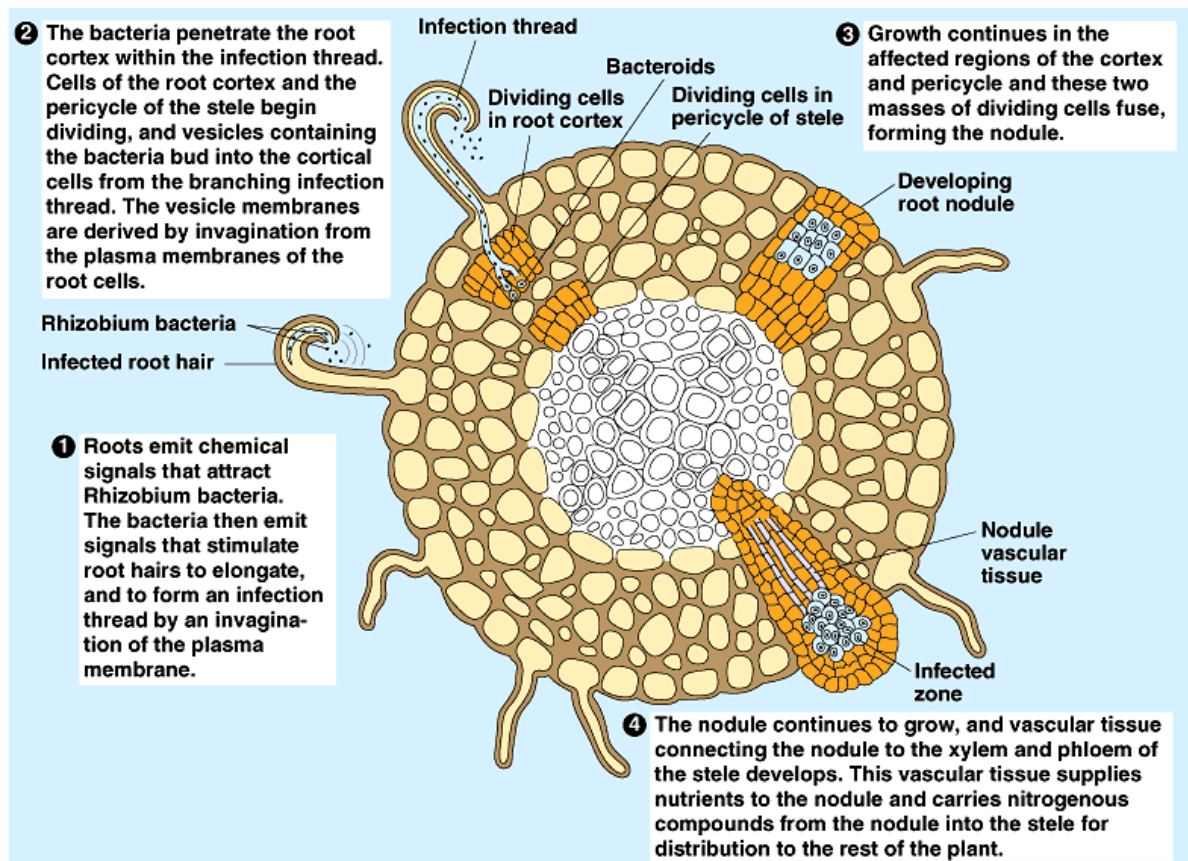
colonisation vasculaire réduite. Dans les deux cas, le phénotype observé est accompagné d'une réaction provoquant la dégénérescence des bactéries présentes dans l'espace intercellulaire et des cellules du parenchyme qui les entourent. Cette réaction a été identifiée comme étant une réponse hypersensible vasculaire (VHR pour vascular hypersensitive response). En même temps que la VHR, des réponses de défense de la plante ont pu être observées telles que le recouvrement vasculaire du xylème par une substance cireuse apparentée à la subérine (Vasse *et al.*, 2000).

Un mutant *hrpG*, souche totalement avirulente, présente paradoxalement une capacité d'infection des racines secondaires comparable à ce qui est observé avec une souche sauvage. Les bactéries sont ensuite capables de se développer fortement dans les espaces intercellulaires du cortex, le long du cylindre vasculaire (Figure 21). En revanche, un mutant *hrpG* est fortement réduit dans sa capacité à franchir la barrière endodermique et à envahir les vaisseaux du xylème. De nombreuses réponses de défense mises en place par la plante ont également été mises en évidence à différents niveaux histologiques : renforcement de la paroi cellulaire des cellules de l'endoderme, plasmolyse des cellules du parenchyme et renforcement du système vasculaire au-delà du point d'infection (Vasse *et al.*, 2000).

Ces résultats montrent que la multiplication bactérienne au point d'infection et le franchissement de la barrière endodermique sont des points cruciaux du processus infectieux. Ils indiquent également que le système de sécrétion de type III est nécessaire à la suppression des défenses de la plante puisque des mutants *hrp* induisent des réponses hypersensibles vasculaires, contrairement à la souche sauvage. Finalement, le fait que les mutants *hrpG* et *hrpB* présentent des phénotypes d'infection différents suggère que HrpG régule spécifiquement des fonctions nécessaires au pouvoir colonisateur de la bactérie (Figure 22).

1.2 HrpG régule des fonctions impliquées dans l'interaction entre la cellule végétale et la bactérie, indépendamment du T3SS

Par une approche originale d'évolution expérimentale *in vivo* des auteurs ont également mis en évidence le rôle de fonctions spécifiquement contrôlées par HrpG dans la colonisation de la plante. Ces expériences avaient pour objectif de faire évoluer une souche chimérique de *R. solanacearum* en une bactérie symbiotique, c'est-à-dire une bactérie capable d'induire la production de nodules racinaires et de les infecter de manière intracellulaire. *Cupriavidus taiwanensis* (anciennement *Ralstonia taiwanensis*) est une bactérie symbiotique du mimosa *Mimosa pudica* taxonomiquement proche de la bactérie *R. solanacearum*. Cette bactérie



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 23. Mise en place du processus symbiotique

1. Les bactéries émettent des signaux qui induisent l'élongation des poils racinaires qui se courbent pour former une crosse de berger. Les bactéries sont piégées dans les enroulements des crosses berger. Un cordon d'infection (IT pour infection thread) commence à se former.
2. Les bactéries pénètrent dans le cortex et dans le cordon d'infection.
3. et 4. Formation des nodules dans les zones infectées par division des cellules racinaires. Les bactéries envahissent les cellules du nodule de manière intracellulaire.

porte un plasmide, pRalta, de 550 kb comportant les gènes nécessaires à la mise en place de la symbiose : gènes de nodulation et gènes de fixation de l'azote. Ce plasmide a été introduit chez *R. solanacearum* créant une souche chimérique capable de produire les facteurs Nod, facteurs induisant la formation de nodules racinaires chez la plante hôte *M. pudica*. La mise en place de la symbiose nécessite la formation de cordons d'infection (IT pour infection threads). Ces cordons d'infection sont induits par des micro-colonies présentes dans des enroulements de poils racinaires appelés crosses de berger (Figure 23). Dans une seconde étape, les cordons d'infection se propagent dans les nodules émergents permettant aux bactéries de pénétrer dans les cellules végétales.

La souche chimérique de *R. solanacearum* transformée avec le plasmide symbiotique est capable de promouvoir la prolifération de poils racinaires et leur déformation en crosses de berger. Cependant elle n'est pas capable d'induire la formation de cordons d'infection, ni de promouvoir leur élongation. Cette souche chimérique a été inoculée de manière répétée sur des plantules de *M. pudica* (une plante non hôte de *R. solanacearum*) jusqu'à l'apparition de nodules racinaires. Les nodules représentent une sélection très stringente permettant d'isoler des bactéries capables d'induire la formation de nodules au sein d'une population n'ayant pas ces capacités. 3 à 4 semaines après inoculation, trois nodules sont apparus, permettant l'isolation de trois mutants de la souche chimérique. Le re-séquençage de ces trois mutants a révélé deux types de mutation adaptative : l'une dans le gène *hrcV*, inactivant le système de sécrétion de type III ; l'autre dans le gène régulateur *hrpG*.

L'inactivation du système de sécrétion de type III chez cette bactérie chimérique, via une mutation dans le gène *hrcV*, permet la formation de cordons d'infection ainsi que leur élongation à la différence de la souche chimérique. La formation de nodules présentant une structure typique mais avec une forme légèrement irrégulière a également pu être observée avec ce mutant. La capacité symbiotique de ce mutant de type III s'arrête à ce niveau et aucune invasion intracellulaire du nodule n'a pu être observée.

L'inactivation du gène régulateur *hrpG* permet d'avancer plus loin dans le processus symbiotique, puisque ce mutant (toujours dans la souche chimérique de *R. solanacearum*) est capable d'envahir les nodules de manière intracellulaire alors que *R. solanacearum* est une bactérie strictement extracellulaire. Ces résultats démontrent que le régulateur HrpG contrôle un ou plusieurs facteurs indépendants du système de sécrétion de type III qui sont impliqués dans l'entrée de la bactérie dans la cellule végétale et dans l'interaction entre la bactérie et les cellules eucaryotes (Marchetti *et al.*, 2010).

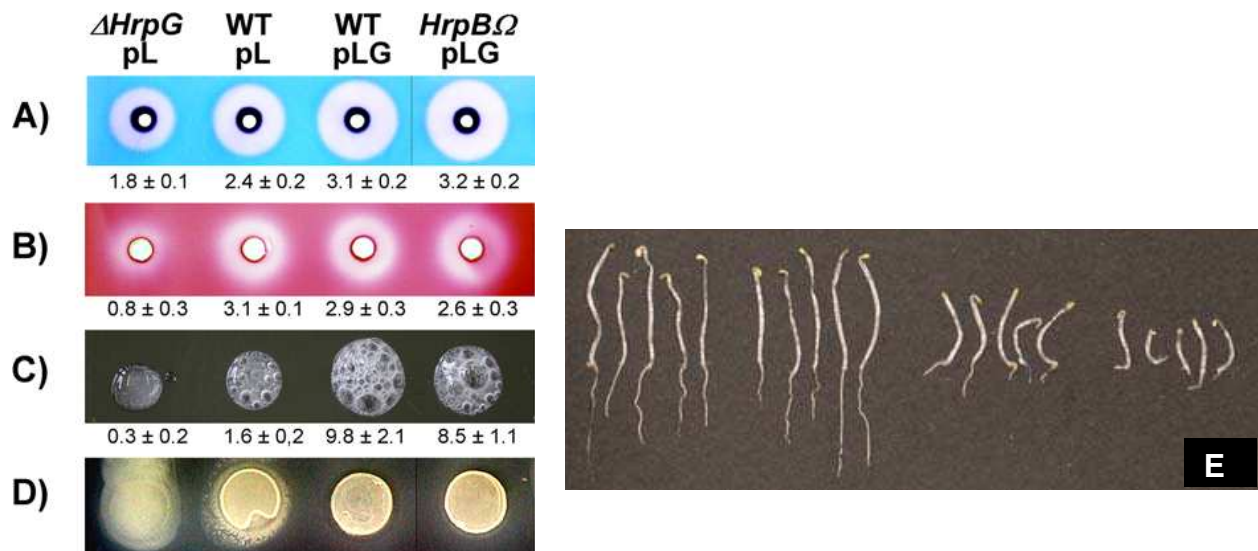


Figure 24. Validation biochimique de certaines fonctions de virulence régulées par HrpG

Les tests biologiques ont été effectués dans la souche délétée *hrpG* ($\Delta hrpG$) et la souche sauvage GMI1000 (WT), toutes deux portant un plasmide pLAFR6 vide, ainsi que dans la souche sauvage portant le plasmide pLG qui surexprime *hrpG* (WT pLG) et la souche disruptée pour *hrpB* et qui surexprime *hrpG* avec le plasmide pLG (*HrpB Ω* pLG).

Activités enzymatiques de : **A.** l'endoglucanase Egl ; **B.** la polygalacturonase PehB ; **C.** la catalase KatE ; **D.** la production d'exopolysaccharides. Les mesures avec les écart-types indiquent la surface du halo en cm² (**A** et **B**) ; la hauteur de la mousse en mm (**C**).

E. Induction de la triple réponse sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* par l'éthylène bactérien. Les phases gazeuses des cultures des souches présentées ont été récupérées et injectées dans des flacons contenant des plantules d'*A. thaliana*. La triple réponse se caractérise par (i) un enroulement du cotylédon, (ii) un raccourcissement de l'hypocotyl et (iii) une inhibition de la croissance racinaire. Photographie prise après 96h de croissance dans le noir.

(D'après Valls *et al.*, 2006)

1.3 *HrpG* régule des cibles spécifiques impliquées dans la virulence de la bactérie

Identification du régulon de *HrpG*

De manière à mieux évaluer le rôle de *HrpG* dans le pouvoir pathogène, des analyses transcriptomiques ont été réalisées pour déterminer l'intégralité des gènes contrôlés par ce régulateur central (Valls *et al.*, 2006). La comparaison du régulon de *HrpG* avec celui de *HrpB* qui avait également été déterminé par analyse transcriptomique (Occhialini *et al.*, 2005) ainsi que l'utilisation d'une souche surexprimant *HrpG* dans un fonds *hrpB* délété a permis d'identifier un ensemble de cibles spécifiquement contrôlées par *HrpG*.

Les résultats ont montré que *HrpG* module l'expression de 184 gènes qui sont indépendants du système de sécrétion de type III et indépendants de *HrpB*. Parmi ces gènes, 80 n'ont pas de fonctions attribuées, ni d'homologie avec des protéines de fonctions connues dans les banques de données. Parmi les autres gènes, de nombreuses fonctions associées à la virulence ont pu être identifiées :

- des enzymes de dégradation de la paroi végétale : l'exopolysaccharidase, PehB, et l'endoglucanase, Egl (Figure 24A et B) ;
- une catalase codée par le gène *katE* (Figure 24C), cette catalase pourrait être impliquée dans des mécanismes de défense de la bactérie pour se protéger contre les défenses de la plante telles que la production de formes actives de l'oxygène ;
- la synthèse d'exopolysaccharides est réprimée par *HrpG* puisque *HrpG* active l'expression du gène *epsR* codant pour un régulateur négatif de l'opéron *eps* (Figure 24D) ;
- la production de phytohormones telles que l'éthylène (Figure 24E), qui est perçu et induit chez la plante des réponses identiques à l'éthylène endogène ;
- les lectines codées par les gènes *rsI* sont induites par *HrpG* et pourraient être impliquées dans l'attachement de la cellule bactérienne à la cellule végétale.

La régulation de plusieurs de ces fonctions par *HrpG* a été vérifiée expérimentalement (Figure 24).

Finalement, *HrpG* contrôle l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme bactérien ainsi que de nombreux gènes codant pour des transporteurs, ces deux types de fonctions jouant sans doute un rôle dans l'adaptation du métabolisme bactérien *in planta*. Lors du processus infectieux la bactérie doit faire face à des conditions hostiles : *burst* oxydatif de la plante suite à la reconnaissance du pathogène, production de composés antimicrobiens, un environnement intercellulaire pauvre en nutriments. Plusieurs fonctions pouvant permettre à la bactérie de répondre à ces conditions sont donc

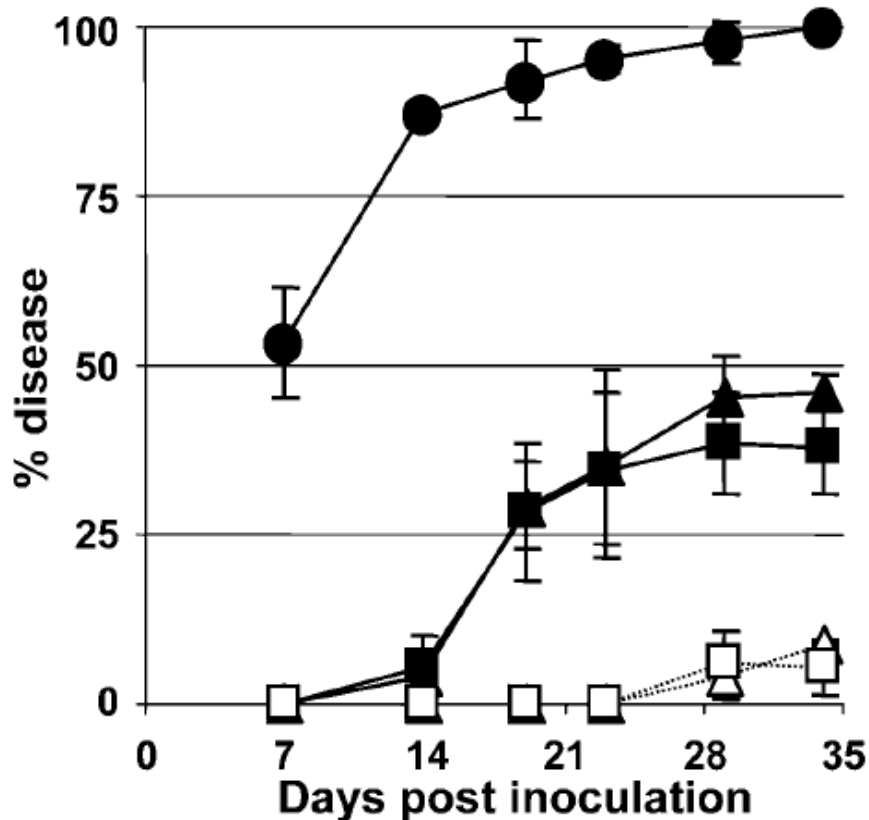


Figure 25. Le régulon spécifique de HrpG est indispensable au pouvoir pathogène de *R. solanacearum*

Tests de pouvoir pathogène sur tomate. Les triangles noirs représentent les souches exprimant *hrpB* sous contrôle du promoteur constitutif *Pkan*, les carrés noirs représentent les souches exprimant *hrpB* sous contrôle du promoteur inducible à l'IPTG *Ptac*. Dans ces souches la transcription du régulon HrpB est découplée de HrpG. Les triangles et les carrés blancs représentent respectivement les mêmes constructions mais dans un fonds génétique délété pour le gène *hrpG*. Les ronds noirs représentent la souche sauvage GMI1000. Chaque point représente la valeur moyenne de trois expériences et l'écart-type est indiqué.

(D'après Valls *et al.*, 2006)

vraisemblablement contrôlées par HrpG suggérant l'importance de ce régulateur dans le contrôle du pouvoir pathogène (par son action sur *hrpB* et la régulation spécifique de certaines fonctions de virulence) mais aussi dans l'adaptation de la bactérie aux conditions rencontrées *in planta*.

Les cibles *hrpB*-indépendantes de HrpG sont nécessaires à la virulence de *R. solanacearum*

Etant donné le large répertoire de gènes contrôlés par HrpG et le rôle collectif que pourraient présenter les gènes de ce régulon, il est peu probable que la délétion d'un gène induise un phénotype significatif de réduction de la virulence. Dans le but d'évaluer le rôle global des cibles régulées par HrpG indépendamment du système de sécrétion de type III, l'expression du régulon de HrpB a été découplée du reste de la cascade de régulation. Deux constructions ont été réalisées : l'une exprimant de manière constitutive le gène *hrpB* (*pkan ::hrpB*) et l'autre exprimant *hrpB* de manière inductible (*ptac ::hrpB*), dans ce deuxième cas, la souche est cultivée en présence d'IPTG pour induire l'expression de *hrpB*. Ces deux constructions ont été exprimées dans un fonds génétique sauvage et dans un fonds génétique délété pour le gène *hrpG*. La virulence de ces souches a été comparée sur la tomate.

Le pouvoir pathogène d'une souche exprimant de manière constitutive ou inductible *hrpB* est réduit de moitié par rapport au pouvoir pathogène de la souche sauvage ; cette différence s'explique sans doute par des niveaux d'activation transcriptionnelle inappropriés du système de sécrétion de type III. Cependant, les résultats montrent que la délétion de *hrpG* diminue très fortement l'agressivité de la bactérie par rapport à la souche exprimant de manière constitutive le régulon de HrpB (Figure 25). ; le régulon spécifique de HrpG est donc impliqué collectivement dans la mise en place et le succès du processus infectieux de *R. solanacearum* (Valls *et al.*, 2006).

Vers une meilleure définition du régulon contrôlé par HrpG

Le régulon de HrpG peut donc être divisé en deux voies principales. La première dépend de HrpB et contient les gènes du système de sécrétion de type III et des effecteurs associés. La seconde est indépendante de HrpB et contient des fonctions importantes pour la virulence et vraisemblablement pour la colonisation et l'adaptation de la bactérie *in planta*. Cette seconde voie régulée par HrpG compte au moins 184 gènes, parmi lesquels on trouve un minimum de douze gènes codant pour des protéines régulatrices. Il est en effet probable que d'autres gènes soient contrôlés par HrpG mais n'aient pas rempli les conditions nécessaires au

niveau des analyses transcriptomiques pour être retenus dans la liste des gènes régulés par HrpG établie par Valls *et al.*, 2006. Le régulon de HrpG contient donc certainement plus de gènes que les 184 identifiés. La détermination de la région promotrice reconnue par HrpG a donc pour objectif de pouvoir identifier l'intégralité des gènes régulés de manière directe par HrpG pour déchiffrer plus précisément la cascade de régulation contrôlée par HrpG indépendamment de HrpB. La détermination des cibles directes nous permettra certainement de définir des groupes fonctionnels dans le régulon de HrpG ainsi que d'établir une hiérarchie dans le contrôle de ce régulon. De plus, la définition fine du *cis* element reconnu par HrpG sera un pas important pour avancer dans notre compréhension de la mécanistique d'activation de ce programme complexe induit lors du processus infectieux.

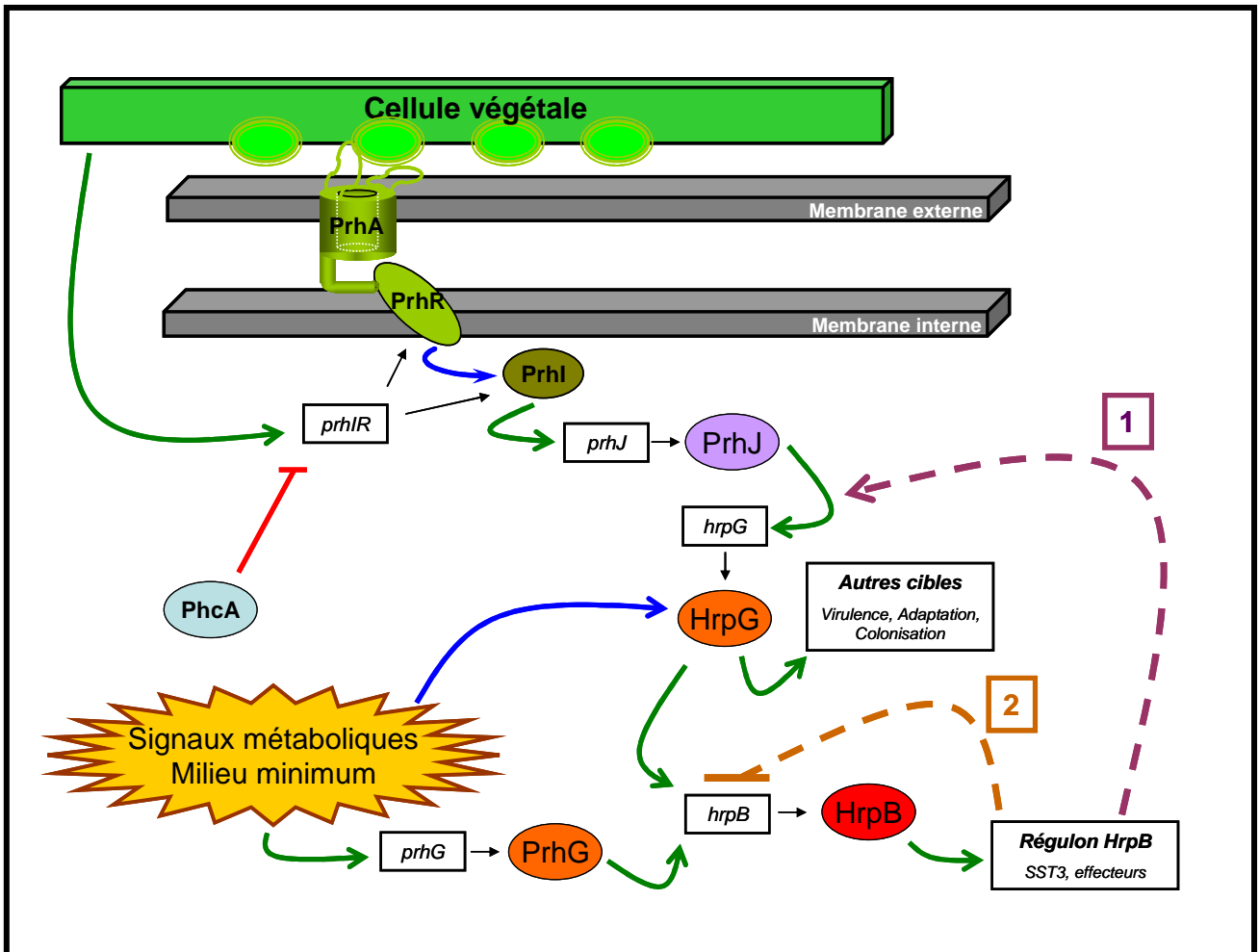


Figure 26. Schéma des boucles de rétrocontrôle positives et négatives sur la régulation de l'expression de *hrpB*

L'expression du gène *hrpB* est induite en présence de cellules végétales par la voie Prh et en milieu minimum par PrhG et HrpG. L'expression de *hrpB* est également induite par un facteur HrpB-dépendant en milieu minimum et en présence de cellules végétales. Cette induction a lieu en amont de *hrpG*, flèche 1 en pointillés. L'expression de *hrpB* est réprimée en présence de cellules végétales spécifiquement, flèche 2 en pointillés. La nature de ces deux rétrocontrôles est inconnue.

Les rectangles noirs représentent des gènes ou groupe de gènes, les autres formes représentent les protéines.

Les flèches noires représentent les produits des gènes, les flèches vertes représentent une induction transcriptionnelle, les flèches bleues une induction post-traductionnelle et les flèches rouges fermées une répression transcriptionnelle. Les flèches en pointillés représentent les rétrocontrôles dont le type d'action n'est pas encore déterminé.

Le code couleur pour les protéines régulatrices est le suivant : bleu clair = régulateur de type LysR, vert clair = protéines membranaires, vert foncé = facteurs sigmas, violet = régulateurs de type LuxR, orange = régulateurs de type OmpR et rouge = régulateurs de type AraC/XylS.

2. RESULTATS ET DISCUSSION : Mise en place d'un système d'expression hétérologue chez *Escherichia coli*

2.1 Nécessité de la mise en place d'un système d'expression hétérologue

Pour déterminer la séquence nucléotidique *cis*-régulatrice reconnue par HrpG, nous avons cherché à utiliser un modèle simplifié : l'expression hétérologue chez *Escherichia coli*. La mise en place de ce système simplifié a pour objectif de s'affranchir du contexte génomique de *Ralstonia solanacearum* pour nous permettre d'identifier des cibles directes de HrpG en s'affranchissant de la présence de régulateurs intermédiaires et pour s'affranchir également des mécanismes de rétrocontrôles potentiels qui ont été mis en évidence chez *R. solanacearum*.

L'existence de régulateurs intermédiaires

Nous avons vu que le régulon de HrpG comporte certainement plus de 184 gènes, parmi ces gènes au moins douze codent pour des régulateurs transcriptionnels : cinq gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels sont activés par HrpG et sept sont réprimés. Ces gènes régulateurs sont des relais intermédiaires probables entre HrpG et les gènes qu'il contrôle. Afin de faciliter l'identification de la séquence nucléotidique *cis*-régulatrice reconnue par HrpG, nous avons choisi dans un premier temps de mettre en évidence des gènes cibles directement régulés par HrpG.

Nous avons donc envisagé de recréer l'interaction entre le régulateur HrpG et ses promoteurs cibles chez *Escherichia coli*, une bactérie taxonomiquement éloignée de *R. solanacearum* et chez laquelle les régulateurs intermédiaires entre HrpG et ses cibles directes ne sont pas présents.

Les boucles de rétrocontrôles chez *R. solanacearum*

La régulation de l'expression des fonctions de virulence chez *R. solanacearum* répond à plusieurs facteurs environnementaux et de nombreuses boucles de régulation existent, compliquant les analyses fines d'expression de gènes. Cette régulation complexe est également vraie pour l'interaction entre HrpG et le promoteur du régulateur *hrpB*. Nous

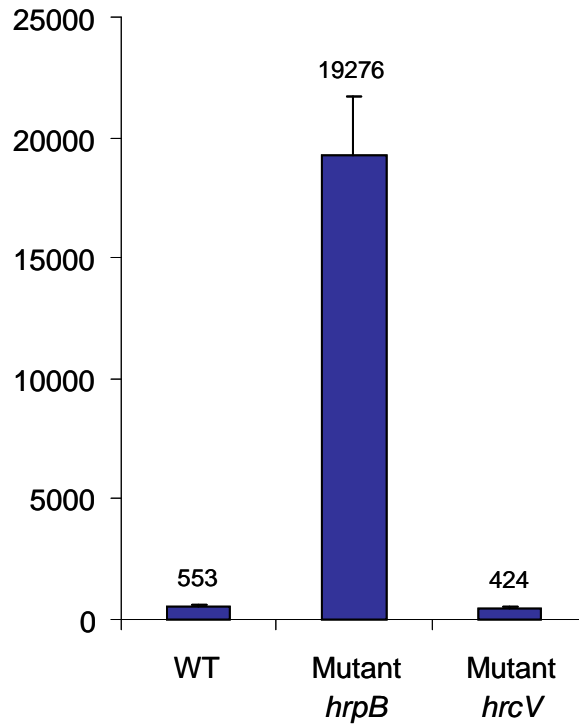


Figure 27. Rétro-contrôle négatif de l'expression de *hrpB* en présence de cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana*

Activité luciférase d'une construction *phrpB::luxCDABE* intégrée de manière stable dans le génome de *R. solanacearum* dans un fonds génétique sauvage (WT), dans un fonds génétique muté pour *hrpB* (Mutant *hrpB*) et dans un fonds génétique muté pour *hrcV* (Mutant *hrcV*) après co-culture des bactéries en présence de cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression de *hrpB* est induite dans le fonds génétique muté pour *hrpB* par rapport aux fonds génétiques sauvage et mutés pour *hrcV*. L'activité luciférase est exprimée en RLU/s/Unité de DO.

avons pu mettre en évidence au moins deux boucles de régulation engendrant un rétrocontrôle sur l'expression de *hrpB*.

La première boucle de rétrocontrôle identifiée induit la transcription de *hrpB* de manière HrpB-dépendante (Figure 26). Ce rétrocontrôle positif a été mis en évidence en utilisant une fusion entre le gène *hrpB* et un gène rapporteur. L'expression de cette fusion chez *R. solanacearum* en *trans* est plus faible dans un fonds génétique muté pour le gène *hrpB* que dans un fonds génétique sauvage (Genin *et al.* 1992). Ce rétrocontrôle n'agit pas de manière directe sur la transcription de *hrpB* puisque la transcription du gène *hrpG* (codant pour le régulateur transcriptionnel de *hrpB*) est également induite dans un fonds génétique muté pour le gène *hrpB* (Plener *et al.*, 2010). Le niveau d'intégration de ce rétrocontrôle dans la cascade de régulation PrhA-dépendante est donc situé en amont de *hrpG*, mais n'a pas été identifié plus précisément. Finalement, la manière dont ce rétrocontrôle est intégré dans la cascade PrhA-dépendante n'est pas connue, il peut s'agir de régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Figure 26).

La seconde boucle de rétrocontrôle est une boucle négative réprimant la transcription de *hrpB* en présence de cellules végétales de manière HrpB-dépendante. Ce rétrocontrôle négatif a été mis en évidence, de la même manière que précédemment, en utilisant une fusion entre le gène *hrpB* et un gène rapporteur, exprimée en *cis*. L'expression de cette fusion chez *R. solanacearum* (par intégration stable dans le chromosome) est fortement induite lorsque le rapporteur est exprimé dans un fonds muté pour le gène *hrpB* par rapport au fonds génétique sauvage (Figure 27). Ce rétrocontrôle négatif est spécifique à la co-culture des bactéries en présence de cellules végétales et n'a pas été mis en évidence en milieu complet ni en milieu minimum.

Contrairement au rétrocontrôle positif, l'induction de *hrpB* dans ces conditions n'est pas due à une induction de l'expression de *hrpG*. Cette boucle négative agit donc au niveau du promoteur de *hrpB* soit par modification post-transcriptionnelle du régulateur HrpG soit via un autre élément régulateur dont l'expression serait induite par HrpB (Figure 26). Finalement, l'expression de *hrpB* en *trans* et en présence de cellules végétales n'est pas induite dans un fonds génétique muté pour le gène *hrcV* par rapport au fonds génétique sauvage (Figure 27). Chez le mutant *hrcV*, le système de sécrétion de type III n'est pas fonctionnel. Ces résultats semblent montrer que ce rétrocontrôle négatif HrpB-dépendant ne nécessite pas un système de sécrétion de type III fonctionnel.

Cette boucle négative explique certainement pourquoi l'induction des gènes *hrp* en présence de cellules végétales est moins importante, par rapport au milieu minimum, que l'induction observée pour *hrpB* (Brito *et al.*, 1999). En effet, la souche rapportrice utilisée inactive le

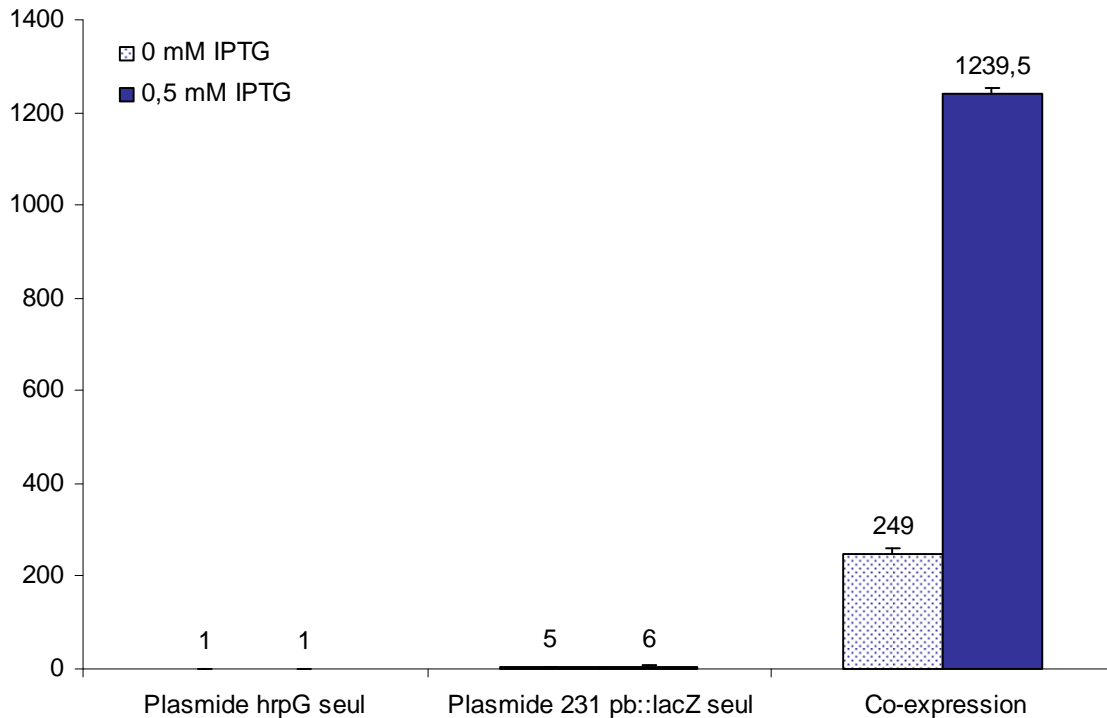


Figure 28. Reconstitution de l'interaction entre HrpG et le promoteur *hrpB* chez *Escherichia coli*

Deux constructions sont utilisées :

- un plasmide comprend le gène codant pour le régulateur HrpG sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Cette construction n'induit pas d'activité β -galactosidase quand elle est exprimée seule chez *E. coli* ;
- un plasmide comprend le promoteur de *hrpB* (ici, un fragment de 231 pb en amont de l'ATG de *hrpB*) fusionné au gène rapporteur *lacZ*. Cette construction n'induit pas d'activité β -galactosidase quand elle est exprimée seule chez *E. coli* ;

La co-expression de ces deux plasmides chez *E. coli* montre une induction de l'activité β -galactosidase lorsque l'expression de *hrpG* est induite par ajout d'IPTG dans le milieu de culture.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller.

régulateur HrpB abolissant donc ce rétrocontrôle, ce qui n'est pas le cas pour les fusions rapportrices dans les gènes *hrp* ou les gènes d'effecteurs.

2.2 Mise en place d'un système d'expression hétérologue chez *E. coli*

Dans un premier temps nous avons choisi de recréer l'interaction entre HrpG et le promoteur du régulateur HrpB. Le promoteur de *hrpB* a été cloné et fusionné au gène rapporteur *lacZ*, puis cette construction a été clonée dans le plasmide pLAFR6 qui contient des terminateurs de transcription de part et d'autre du site de clonage. Ce plasmide est dérivé du plasmide RK2 et possède une origine de réplication *ori_{RK2}* (Meyer and Helinski, 1977) et peut donc se répliquer chez *E. coli* et *R. solanacearum* à bas nombre de copies. Nous avons vérifié qu'exprimée seule chez *E. coli* cette construction *phrpB::lacZ* ne présente pas de transcription non contrôlée et qu'aucune activité β -galactosidase n'est mesurée (Figure 28). Le gène codant pour le régulateur HrpG a été cloné dans un autre plasmide et placé sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Ce plasmide, pLP52, possède une origine de réplication de type pMB1, différente de celle du pLAFR6, ce qui permet le maintien et la réplication des deux plasmides (plasmide portant *hrpG* et plasmide rapporteur) dans une même cellule. Une étiquette GST fusionnée à la partie N-terminale du régulateur HrpG permet la vérification de l'induction du régulateur. Nous avons vérifié que l'expression de ce plasmide et l'induction de l'expression de *hrpG* n'induisent pas d'activité β -galactosidase (Figure 28).

Les deux constructions sont ensuite introduites chez *E. coli* par co-transformation et l'activité β -galactosidase est mesurée en absence et en présence d'IPTG de manière à induire l'expression du régulateur HrpG (Figure 28). Les résultats obtenus montrent une forte augmentation de l'activité β -galactosidase (facteur cinq pour un fragment de 231 pb du promoteur *hrpB*) lorsque l'expression du régulateur est induite. En l'absence d'induction de l'expression du régulateur on observe que l'activité β -galactosidase est plus importante par rapport à ce qui est mesuré lorsqu'un seul des plasmides est présent. Cette induction est due à l'expression résiduelle de *hrpG* en l'absence d'IPTG.

Il est donc possible de recréer l'interaction entre HrpG et un de ses promoteurs cibles chez *E. coli*. Cette bactérie étant phylogénétiquement éloignée de *R. solanacearum*, il semble donc peu probable que des régulateurs intermédiaires présents dans le génome d'*E. coli* soient induits par HrpG et reconnaissent le promoteur de *hrpB* induisant ainsi l'expression de la fusion rapportrice *phrpB::lacZ*. Ces expériences suggèrent donc fortement que *hrpB* est une cible directe du régulateur HrpG.

Tableau 2. Résultats des analyses transcriptomiques pour les gènes *metE*, *metR*, le régulateur *rsp0983*, *katE* et *efe*

Quatre conditions sont présentées : expression dans un mutant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté $\Delta hrpG$ / WT) ; expression dans un mutant surexprimant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté *hrpG* surexp. / WT) ; expression dans un mutant *hrpB* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté *hrpB* :: Ω / WT) et expression dans un mutant *hrpB* surexprimant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté $\Delta hrpB$, *hrpG* surexp. / WT). Le résultat est exprimé en \log_2 du ratio des fluorescences (mutant/sauvage), la *p*-value a été calculée par test de Student à partir de six lames d'hybridation. Seules les valeurs ayant un ratio supérieur à 1,5 en valeur absolue et une *p*-value inférieure à 0,05 sont retenues comme significatives. Ces valeurs sont présentées en noir dans le tableau, les valeurs non retenues sont en gris.

(D'après Valls *et al.*, 2006)

Gène	Nom	$\Delta hrpG$ / WT		<i>hrpG</i> surexp. / WT		<i>hrpB</i> :: Ω / WT		$\Delta hrpB$, <i>hrpG</i> surexp. / WT	
		Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value
<i>rsp0676</i>	<i>metE</i>	-2,0	0,00	1,5	0,00	0,3	0,80	3,9	0,00
<i>rsp0677</i>	<i>metR</i>	0,3	0,46	1,7	0,01	-0,7	0,16	-1,1	0,43
<i>rsp0983</i>	régulateur	-3,5		3,7		0,7	0,10	2,4	0,02
<i>rsp1581</i>	<i>katE</i>	-2,0	0,00	2,0	0,00	0,3	0,40	2,7	0,00
<i>rsp1529</i>	<i>efe</i>	-1,2	0,01	1,2	0,09	-0,1	0,58	4,0	0,00

Ce système d'expression hétérologue peut être utilisé pour déterminer les cibles directes reconnues par le régulateur HrpG parmi les cibles identifiées en analyse transcriptomique mais aussi pour réaliser une étude fine du promoteur de *hrpB* dans le but d'identifier les résidus nucléotidiques nécessaires à la reconnaissance du promoteur *hrpB* par HrpG. En effet, les niveaux d'expression obtenus étant très élevés ils permettent d'envisager la détection de variations assez faibles, ce qui n'est pas le cas chez *R. solanacearum*.

2.3 Utilisation du système d'expression hétérologue pour identifier des cibles directes de HrpG

Dans le but de déterminer des promoteurs directement reconnus par HrpG, plusieurs promoteurs ont été choisis parmi les gènes du régulon HrpG. Les cibles choisies présentent toutes une fonction biologique connue et potentiellement impliquée dans la mise en place du pouvoir pathogène ou dans l'adaptation de la bactérie *in planta*. Ce sont les gènes *katE*, codant pour une catalase ; *efe*, codant pour une enzyme impliquée dans la formation de l'éthylène bactérien et *metE*, codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de la méthionine. Ces cibles ont également été choisies car elles présentent une forte régulation par HrpG au niveau des analyses transcriptomiques, c'est-à-dire que les valeurs absolues des ratios d'expression entre la souche sauvage et les souches mutantes (surexpression de *hrpG* et délétion de *hrpG*) sont élevées (Tableau 2). Nous nous sommes également intéressés à des gènes codant pour des régulateurs ; ces gènes ont en effet davantage de chances d'être des cibles directes de HrpG. Nous avons choisi un régulateur de type LuxR, codé par le gène *rsp0983* et le gène du régulateur *metR* qui code pour un régulateur impliqué dans le métabolisme de la méthionine. Ce dernier gène ne fait pas partie de la liste des gènes du régulon HrpG établie par Valls *et al.* (2006) mais il présente une augmentation de son expression dans la souche surexprimant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (Tableau 2). Le gène *metE* impliqué dans la biosynthèse de la méthionine étant induit par HrpG il est probable que ce contrôle se fasse via le régulateur MetR, permettant ainsi à HrpG de réguler tous les gènes contrôlés par MetR.

Pour chacun de ces gènes, un fragment de leur promoteur (1 kb en amont du codon ATG) a été cloné de manière à s'assurer que la séquence promotrice reconnue par HrpG soit présente dans le fragment étudié. Chaque promoteur a été ensuite fusionné au gène rapporteur *lacZ*, introduit dans le plasmide pLAFR6 et co-exprimé avec un plasmide portant *hrpG* sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Les résultats des dosages d'activité

Tableau 3. Résultats des co-expressions chez *E. coli* obtenus pour des gènes contrôlés par HrpG selon les analyses transcriptomiques

Les promoteurs des gènes *metE*, *metR*, *rsp0983*, *katE* et *efe* ont été clonés en amont du gène rapporteur *lacZ*. L'activité β -galactosidase de ces constructions seules, en présence et en absence d'IPTG, est rapportée.

La co-expression de ces constructions avec un plasmide portant le gène du régulateur HrpG sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG montre que les promoteurs des gènes *metR* et *efe* sont induits par l'induction de l'expression de *hrpG*.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller, les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types sur trois dosages. Les valeurs en gras montrent une induction de l'expression du rapporteur sur induction de l'expression du régulateur HrpG.

Gène	Nom	Taille promoteur (kb)	Plasmide rapporteur seul		Co-expression	
			0 mM IPTG	0,5 mM IPTG	0 mM IPTG	0,5 mM IPTG
<i>rsp0676</i>	<i>metE</i>	1,0	8,5 (0,4)	6,6 (0,4)	8,3 (0,4)	6,0 (0,0)
<i>rsp0677</i>	<i>metR</i>	1,0	4,0 (0,0)	3,0 (0,0)	6,0 (0,7)	70,0 (6,0)
		0,7	4,0 (0,4)	3,3 (0,0)	5,7 (0,4)	64,7 (3,1)
<i>rsp0983</i>	<i>régulateur</i>	1,0	7,0 (0,4)	5,0 (0,0)	8,3 (0,4)	7,0 (0,0)
<i>rsp1581</i>	<i>katE</i>	1,0	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)
<i>rsp1529</i>	<i>efe</i>	1,0	51,0 (0,4)	41,0 (0,0)	74,3 (0,4)	418,0 (15,3)
		0,5	48,5 (0,4)	36,3 (0,0)	69,1 (0,7)	389,3 (16,9)

β -galactosidase ont permis d'identifier les gènes *metR* et *efe* comme étant des cibles directes du régulateur de HrpG. En effet, l'expression des fusions *pmetR ::lacZ* et *pefe ::lacZ* est induite spécifiquement sur induction de l'expression du régulateur HrpG : l'expression de *pmetR ::lacZ* est induite d'un facteur 11 sur induction de l'expression de *hrpG* et celle de *pefe ::lacZ* d'un facteur 7 (Tableau 3). Des approches de restriction de la taille des promoteurs clonés ont permis d'identifier qu'un fragment de 700 pb du promoteur du gène *metR* est toujours reconnu par HrpG et qu'un fragment de 395 pb du promoteur du gène *efe* est également reconnu par HrpG avec des niveaux d'induction similaire à ceux observés pour les fragments des promoteurs de 1 kb (Tableau 3). Les gènes *metR* et *efe* sont donc des cibles directes de HrpG et la région reconnue par HrpG est située dans un fragment de 700 pb en amont de l'ATG de *metR* et de 395 pb en amont de l'ATG de *efe*.

Les sites d'initiation de la transcription n'étant pas connus et les fragments identifiés étant encore relativement grands, l'alignement des promoteurs n'a pas permis de mettre en évidence une séquence consensus claire. La suite de notre étude s'est focalisée sur l'étude plus fine d'un seul de ces promoteurs, celui de *hrpB*.

3. Détermination de la région nucléotidique du promoteur de *hrpB* reconnue par HrpG et PrhG

3.1 La structure du promoteur *hrpB* est très conservée au sein du complexe d'espèces *R. solanacearum*

Le gène du régulateur HrpB est situé dans le cluster *hrp* situé sur le mégaplasme. En amont de ce gène se trouve le gène *hrcT* codant pour un gène de structure du système de sécrétion de type III. La région intergénique située entre les gènes *hrpB* et *hrcT* comporte 133 pb chez la souche GMI1000. Le cluster *hrp* est très conservé au sein du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Les séquences de six souches de *R. solanacearum* réparties dans les quatre phylotypes du complexe d'espèces sont connues : les souches IPO1609, Molk2 et CFPB2957 du phylotype II, la souche CMR15 du phylotype III, la souche GMI1000 du phylotype I et la souche PSI07 du phylotype IV (Salabounat *et al.*, 2002 ; Remenant *et al.*, 2010). La séquence d'une souche de *Ralstonia syzygii*, souche proche du phylotype IV des souches de *R. solanacearum* a également été réalisée au laboratoire (C. Boucher, communication personnelle).

Nous avons utilisé la diversité génomique disponible pour étudier la séquence du promoteur *hrpB*. Les séquences de 200 pb en amont de l'ATG du gène *hrpB* de chacune de ces séquences contenant la région intergénique située entre *hrcT* et *hrpB* ainsi qu'une partie du gène *hrcT* ont été alignées (Figure 29). L'alignement obtenu révèle que la région intergénique est très conservée, même dans des souches de *R. solanacearum* les plus distantes phylogénétiquement. En effet, dans la région intergénique de 133 pb, seules six paires de base présentent des polymorphismes d'une souche à l'autre. Une insertion d'un résidu nucléotidique est également identifiée dans les souches PSI07 (phylotype IV) et *R. syzygii* (apparenté au phylotype IV) ainsi qu'une délétion dans les souches GMI1000 et CMR15 par rapport aux autres souches. Cependant cette insertion et cette délétion n'ont sans doute aucun impact sur la transcription du gène. En effet les études menées par Cunnac *et al.* (2004) ont permis d'identifier la boîte -10 reconnue par l'ARN polymérase chez *R. solanacearum*. Le consensus de cette boîte -10 (CYANNRT) a été localisé dans le promoteur de *hrpB*, il s'agirait de la séquence CTACGAT. Cette potentielle boîte -10 dans le promoteur *hrpB* est conservée chez toutes les souches. Elle est située en amont de l'insertion d'un résidu nucléotidique chez PSI07 et *R. syzygii* : cette insertion d'un nucléotide dans ces deux souches n'aurait donc aucun impact sur la transcription de *hrpB* chez PSI07

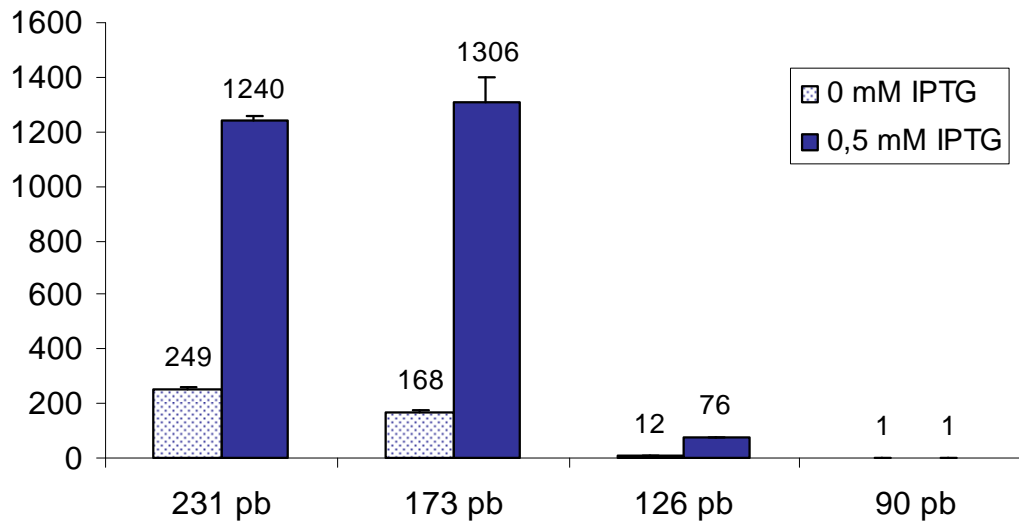


Figure 30. La région nucléotidique du promoteur *hrpB* reconnue par HrpG est située dans un fragment de 83 pb

Différents fragments de tailles décroissantes du promoteur de *hrpB* ont été clonés et fusionnés au gène rapporteur *lacZ*. Ces constructions ont été co-exprimées chez *E. coli* avec un plasmide portant le gène du régulateur HrpG sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. HrpG reconnaît un fragment de 173 pb du promoteur *hrpB* et induit l'expression du rapporteur *lacZ* de la même manière que pour le fragment de taille supérieure (231 pb). L'induction du rapporteur est très diminuée pour un fragment de 126 pb et abolie pour un fragment de 90 pb. Le site de reconnaissance du promoteur *hrpB* reconnue par HrpG est situé dans une région de 83 pb.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller.

et *R. syzygii*. Il en est de même pour la délétion dans les souches GMI1000 et CMR15 (Figure 29).

Finalement, cet alignement a permis d'identifier une insertion de 27 pb dans le promoteur de la souche MolK2. Cette insertion est en fait une duplication précise de cette région de 27 pb qui est présente une seule fois dans les autres souches mais deux fois dans la souche MolK2. La présence de cette duplication a été vérifiée par amplification PCR et re-séquençage par la méthode Sanger. Cette région de 27 pb est spécifique au promoteur de *hrpB* et n'a pas été identifiée ailleurs dans le génome de la souche MolK2.

3.2 Détermination de la zone du promoteur *hrpB* impliquée dans l'interaction avec le régulateur *HrpG*

Utilisation du système d'expression hétérologue pour déterminer la région promotrice de *hrpB* reconnue par *HrpG*

Nous avons utilisé le système d'expression hétérologue chez *E. coli* pour déterminer plus précisément la région promotrice de *hrpB* reconnue par *HrpG*. Plusieurs fragments de différentes tailles de la région promotrice de *hrpB* ont été clonés, fusionnés au gène rapporteur *lacZ* et co-exprimés chez *E. coli* avec le gène codant pour le régulateur *hrpG*. Les résultats obtenus ont permis de déterminer que la zone de reconnaissance du régulateur *HrpG* est située dans un fragment de 83 pb situé entre -173 pb et -90 pb en amont de l'ATG de *hrpB*. En effet, le clonage d'un fragment de -173 pb en amont du gène rapporteur *lacZ* présente le même niveau d'induction que des fragments de taille supérieure allant jusqu'à 231 pb après induction de l'expression du régulateur *HrpG* (Figure 30). Ce résultat suggère que si des résidus nucléotidiques situés en amont du fragment de -173 pb sont impliqués dans la reconnaissance du promoteur *hrpB* par *HrpG*, ces résidus ne sont pas indispensables à la liaison et à l'induction du promoteur par *HrpG*. En revanche le clonage d'un fragment de 90 pb en amont du gène rapporteur *lacZ* n'induit pas d'expression de la β -galactosidase après induction de l'expression du régulateur *HrpG*. Ces résultats indiquent que des résidus indispensables à la liaison de *HrpG* au promoteur de *hrpB* sont situés entre -173 pb et -90 pb. Cependant il est impossible d'exclure le fait que des résidus nécessaires à l'activation soient présents en aval de -90 pb.

Finalement, un fragment de 126 pb permet une très légère induction du rapporteur *lacZ* sur induction de l'expression du régulateur *HrpG*. L'interaction entre le fragment de 126 pb et le régulateur *HrpG* est fortement diminuée et ne permet pas une activation transcriptionnelle aussi forte que celle obtenue avec le fragment de 173 pb (induction d'un facteur dix de

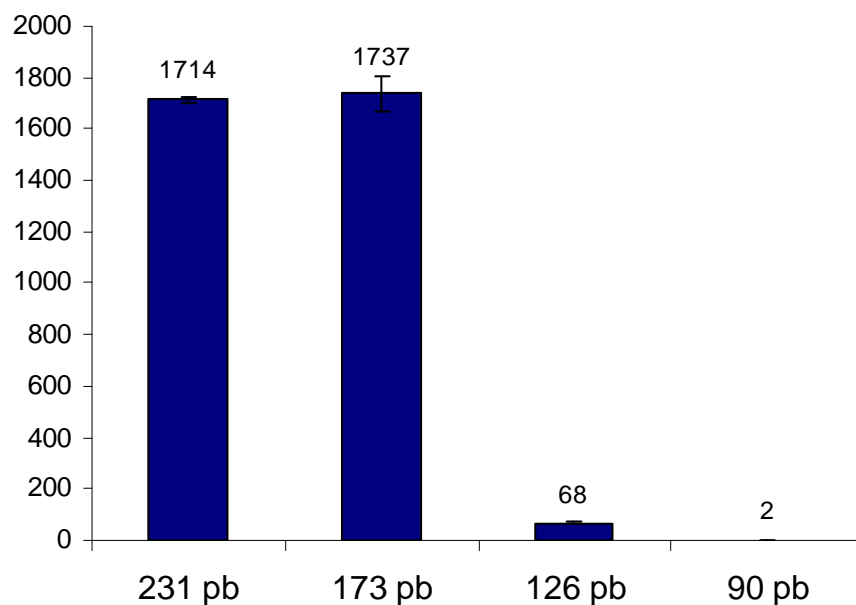


Figure 31. L'expression des plasmides rapporteurs chez *R. solanacearum* montre des résultats identiques à ceux obtenus chez *E. coli*

Les mêmes plasmides que ceux utilisés pour les analyses de co-expression chez *E. coli* ont été introduits chez *R. solanacearum* GMI1000. Les différentes souches ont été cultivées en milieu minimum. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus chez *E. coli* et indiquent que la région promotrice située entre 173 pb et 90 pb est essentielle à l'activation transcriptionnelle de *hrpB* chez *R. solanacearum*.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller.

l'expression du rapporteur sur induction de l'expression de HrpG). Cependant, ce fragment de 126 pb induit l'expression du rapporteur *lacZ* d'un facteur cinq, induction significativement différente par rapport au fragment de 90 pb. Des résidus nucléotidiques présents entre -126 et -90 pb sont donc nécessaires à l'induction complète de l'expression de *hrpB* par HrpG (Figure 30).

L'expression des différents plasmides rapporteurs chez *R. solanacearum* montrent des résultats identiques à ceux obtenus par co-expression chez *E. coli*

De manière à confirmer les résultats obtenus dans le système de co-expression hétérologue et valider l'utilisation de ce système, plusieurs des plasmides rapporteurs *phrpB::lacZ* utilisés pour les co-expressions chez *E. coli* ont été introduits par électroporation dans différentes souches de *R. solanacearum*. Cette étude est nécessaire pour confirmer les résultats obtenus dans le système hétérologue en ramenant les plasmides rapporteurs dans le contexte génétique de *R. solanacearum* et ainsi être en présence de tous les éléments impliqués dans l'activation transcriptionnelle de *hrpB*.

Les plasmides portant les fusions *lacZ* avec les fragments de 231 pb, 173 pb, 126 pb et 90 pb, utilisés dans les analyses de co-expression, ont été électroporés dans la souche sauvage GMI1000. Les différentes souches obtenues ont été cultivées en milieu minimum supplémenté avec du glutamate, milieu inducteur de l'expression de *hrpB*, et l'expression de chacun des plasmides rapporteurs a été mesurée par dosage d'activité β -galactosidase (Figure 31).

Les résultats obtenus montrent un profil d'induction similaire à celui observé avec le système d'expression hétérologue, c'est-à-dire une induction forte et identique avec des plasmides rapporteurs contenant les fragments de 231 pb et 173 pb du promoteur *hrpB*. Aucune activité β -galactosidase n'est détectée lorsque le gène *lacZ* est sous contrôle d'un fragment de 90 pb du promoteur *hrpB*. Finalement, une induction faible de l'activité β -galactosidase est détectée avec le fragment de 126 pb (Figure 31). Il semble donc que la région du promoteur *hrpB* située entre -173 pb et -90 pb soit essentielle à la transcription du gène dans le contexte génomique de *R. solanacearum*.

Ces plasmides rapporteurs ont été exprimés dans la souche sauvage GMI1000. Dans cette souche et en milieu minimum, les deux régulateurs HrpG et PrhG sont impliqués dans l'induction de l'expression de *hrpB*. Les résultats obtenus montrent des profils d'induction similaires entre les fragments de différentes tailles et la co-expression chez *E. coli* qui est réalisée uniquement en présence de HrpG. Ces résultats suggèrent donc que les deux régulateurs HrpG et PrhG requièrent la même région nucléotidique (entre -173 pb et -90 pb) du promoteur *hrpB* pour induire l'expression de ce gène. C'est pourquoi l'expression du gène

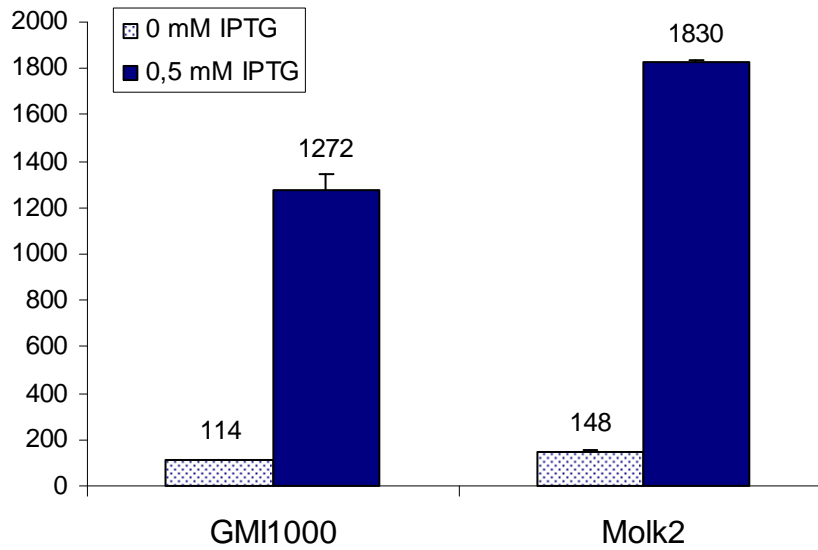


Figure 32. La duplication dans le promoteur *hrpB* de la souche MolK2 comprend des résidus nucléotidiques reconnus par HrpG

Un fragment de 200 pb du promoteur *hrpB* de la souche MolK2 a été cloné et fusionné au gène rapporteur *lacZ*. L'activité β -galactosidase de ce fragment co-exprimé avec HrpG a été comparée avec celle d'un fragment de 173 pb du promoteur *hrpB* de la souche GMI1000. L'induction de l'expression du régulateur HrpG entraîne une induction plus forte du fragment du promoteur *hrpB* de la souche MolK2 que celle obtenue avec le fragment du promoteur *hrpB* de la souche GMI1000.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller.

lacZ sous contrôle d'un fragment de 90 pb est nulle et que l'activité β -galactosidase des plasmides portant les fragments de 173 pb et 231 pb est identique.

La duplication dans le promoteur hrpB de la souche Molk2 comprend des résidus nucléotidiques reconnus par HrpG

L'alignement des promoteurs *hrpB* de plusieurs souches de *R. solanacearum* a révélé une duplication de 27 pb dans le promoteur *hrpB* de la souche Molk2. Cette duplication est unique à cette souche (Figure 29). Pour déterminer si cette duplication comprend une partie de la zone de reconnaissance du promoteur *hrpB* par HrpG, un fragment de 200 pb en amont de l'ATG du gène *hrpB* a été cloné et fusionné au gène rapporteur *lacZ*. Ce fragment de 200 pb correspond au fragment de 173 pb du promoteur *hrpB* de la souche GMI1000 sans la duplication de 27 pb. Les études précédentes ont montré que ce fragment de 173 pb contient les résidus nécessaires à l'activation du promoteur *hrpB* par HrpG.

La co-expression du fragment de 200 pb de la souche Molk2 avec le régulateur HrpG a montré une induction de l'activité β -galactosidase plus forte que celle obtenue avec le fragment de 173 pb de la souche GMI1000, ainsi qu'avec des fragments de tailles supérieures de cette souche (Figure 32). L'augmentation de l'induction obtenue entre les fragments des promoteurs *hrpB* de la souche Molk2 et de la souche GMI1000 correspond à un facteur 1,5. Ces résultats suggèrent qu'une partie des résidus nucléotidiques reconnus par HrpG et permettant l'activation de l'expression de *hrpB* sont présents dans cette duplication de 27 pb. En revanche, il est impossible d'exclure que des résidus impliqués dans l'interaction entre HrpG et le promoteur *hrpB*, mais non nécessaires à cette interaction, soient situés en dehors de cette duplication de 27 pb.

La signification biologique de cette duplication dans le promoteur de la souche Molk2 permettant une induction plus importante de *hrpB* par HrpG est inconnue. Il est, pour l'instant, difficile d'évaluer l'impact de cette duplication sur l'induction des gènes *hrp* chez la souche Molk2, ni d'un éventuel impact sur la pathogénie. La duplication de cette région requise pour la transcription de *hrpB* par HrpG chez la souche Molk2 ne se traduit donc sans doute pas forcément par deux fois plus de transcription de *hrpB* dans *R. solanacearum*, ni par conséquent par deux fois plus de transcription du système de sécrétion de type III. La régulation des gènes de pathogénie n'a pas été étudiée chez la souche Molk2, il est possible que certains éléments de régulation et niveaux de contrôle soient différents dans cette souche par rapport à ce qui est établi dans la souche GMI1000.

Réduction de la taille de la zone promotrice impliquée dans l'induction de hrpB par HrpG

Nous avons vu que la duplication présente dans le promoteur *hrpB* de la souche Molk2 est impliquée dans l'interaction entre HrpG et l'ADN cible du promoteur *hrpB*. Etant donné l'emplacement de cette duplication (entre -139 pb et -112 pb dans le génome de la souche GMI1000, Figure 35), nous avons décidé de comparer, par co-expression chez *E. coli*, l'induction obtenue avec un promoteur de 140 pb par rapport à celle obtenue avec un fragment de 173 pb. De la même manière que pour les expériences de co-expression réalisées précédemment, un fragment de 140 pb du promoteur *hrpB* a été cloné en amont du gène rapporteur *lacZ* et co-exprimé chez *E. coli* avec une construction portant le gène *hrpG* placé sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.

L'activité β -galactosidase mesurée lorsque le gène rapporteur est placé sous contrôle d'un promoteur de 173 pb est de 1 306 unités de Miller, après induction de l'expression de HrpG. Lorsque le gène rapporteur est placé sous contrôle d'un promoteur de 140 pb, l'activité β -galactosidase mesurée est de 1 311 unités de Miller. Les résultats obtenus montrent donc que lorsque l'expression de *hrpG* est induite, l'activité β -galactosidase mesurée est identique, que le gène rapporteur *lacZ* soit exprimé en aval d'un fragment de 140 pb ou en aval d'un fragment de 173 pb.

Ces résultats suggèrent que les résidus nucléotidiques nécessaires à HrpG pour induire l'expression de *hrpB* sont présents dans le fragment de 140 pb. Il reste possible que des résidus nucléotidiques situés entre -173 pb et -140 pb soient également impliqués dans cette interaction, mais ils ne sont pas nécessaires à l'activation transcriptionnelle de *hrpB* par HrpG chez *E. coli*.

3.3 Le régulateur PrhG reconnaît la même région nucléotidique que celle reconnue par HrpG, en co-expression chez E. coli

Le système d'expression hétérologue chez *E. coli* a également été utilisé pour déterminer si PrhG est un régulateur direct de *hrpB* et s'il reconnaît la même séquence, ou la même région nucléotidique, que celle reconnue par HrpG. De la même manière que pour HrpG, le gène du régulateur PrhG a été fusionné à la GST et cloné dans un plasmide sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Cette construction, pLP53, a été co-exprimée chez *E. coli* avec les différents plasmides portant des fragments du promoteur *hrpB* fusionné au gène rapporteur *lacZ*.

Tableau 4. Résultats des co-expressions chez *E. coli* obtenus avec le régulateur PrhG

Les différentes constructions *phrpB::lacZ* ont été co-exprimées avec le régulateur PrhG placé sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Les résultats obtenus montrent que PrhG reconnaît la même région de 50 pb que celle reconnue par HrpG dans le promoteur de *hrpB*.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller, les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types sur trois dosages. Les valeurs en gras montrent une induction de l'expression du rapporteur sur induction de l'expression du régulateur PrhG.

Souche	Taille promoteur (pb)	Co-expression	
		0 mM IPTG	0,5 mM IPTG
<i>GMI1000</i>	173	52,5 (14,5)	776,0 (8,0)
	140	59,0 (0,7)	599,0 (6,0)
	126	5,0 (0,4)	23,0 (0,0)
	90	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)
<i>Molk2</i>	200	53,5 (6,5)	1402,5 (4,5)

Les résultats obtenus montrent une induction forte du gène rapporteur après induction de l'expression du régulateur PrhG pour les constructions contenant les fragments de 173 pb et 140 pb du promoteur *hrpB*. Comme pour HrpG, une faible induction de l'activité β -galactosidase a été obtenue lorsque le gène *lacZ* est fusionné au fragment de 126 pb du promoteur *hrpB* et aucune induction n'est détectée pour le fragment de 90 pb. Finalement, le clonage du promoteur *hrpB* de la souche Molk2 en amont du rapporteur *lacZ* induit une activité β -galactosidase plus importante d'un facteur deux que celle obtenue avec le fragment du promoteur *hrpB* de la souche GMI1000 (Tableau 4). Les inductions d'activité β -galactosidase obtenues sur induction de l'expression de PrhG sont globalement plus faibles d'un facteur deux que celles obtenues avec les mêmes constructions rapportrices après induction de l'expression de HrpG ; ces données corréleront parfaitement avec les résultats obtenus chez *R. solanacearum* et suggèrent que l'affinité de PrhG pour le promoteur de *hrpB* est plus faible que l'affinité de HrpG pour ce promoteur.

Ces résultats montrent que le promoteur de *hrpB* est une cible directe de PrhG et que la même région de 50 pb est requise pour la régulation HrpG et PrhG-dépendante.

3.4 Expériences in vitro et corrélation entre les deux méthodes

Mise au point des expériences de gel retard

Dans l'objectif de montrer de manière plus directe la liaison du régulateur HrpG au promoteur de *hrpB* et pour mettre au point une méthode plus rapide pour déterminer l'intégralité des résidus nucléotidiques impliqués dans la reconnaissance et la liaison de HrpG au promoteur de *hrpB* des expériences de gel retard ont été entreprises. Les mêmes constructions que celles utilisées pour les expériences de co-expression ont été utilisées pour la purification de la protéine HrpG en utilisant l'étiquette GST fusionnée à l'extrémité N-terminale du régulateur. La protéine HrpG est fortement insoluble lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli* et les quantités éluées après purification sont très faibles.

Pour mettre au point la méthode, le fragment de 140 pb a été utilisé. Ce fragment a été identifié comme contenant le site de reconnaissance et de liaison de HrpG au promoteur de *hrpB* par les expériences de co-expression chez *E. coli*. La migration sur gel non dénaturant du mélange du fragment de 140 pb marqué à la biotine avec la protéine HrpG fait apparaître trois bandes différentes et retardées par rapport au contrôle ADN biotinylé + GST sans régulateur. Ce retard est dépendant de la quantité de protéines introduite dans le mélange : plus la concentration en protéine augmente plus l'intensité des bandes retardées augmente (Figure 33A). La présence de plusieurs bandes pourrait correspondre à plusieurs formes de

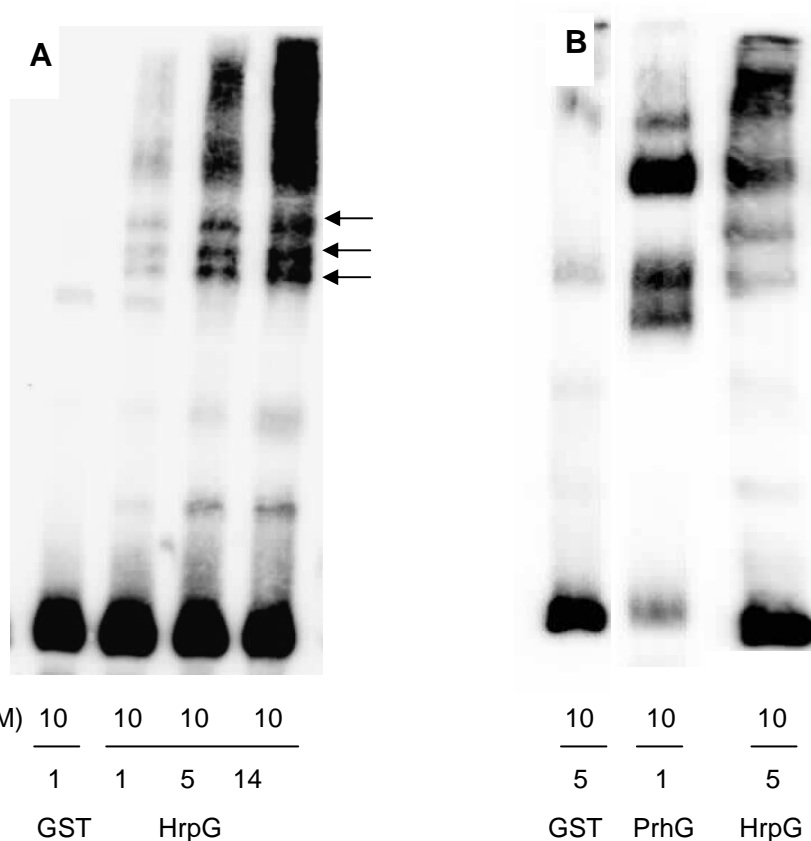


Figure 33. HrpG et PrhG se lient à un fragment de 140 pb du promoteur *hrpB*

Les expériences de gel retard réalisées avec les protéines GST::HrpG et GST::PrhG montrent que les deux régulateurs se lient à un fragment de 140 pb du promoteur *hrpB*. La liaison est beaucoup plus forte avec PrhG (B) qu'avec HrpG (A et B).

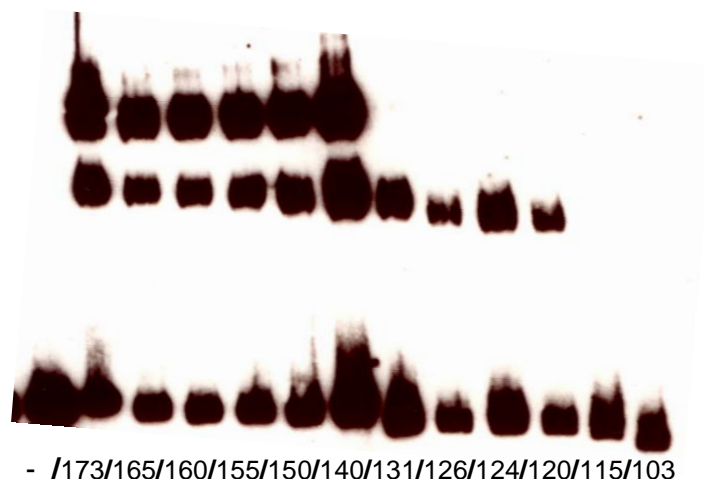


Figure 34. Les résultats obtenus en gel retard corrent avec les résultats précédemment obtenus en co-expression

Des fragments de différentes tailles du promoteur *hrpB* ont été analysés en gel retard : une partie du site de reconnaissance de PrhG est située entre 140 pb et 132 pb (deux bandes de retard visible), une autre partie est située entre 131 pb et 116 pb (une bande de retard visible). La taille des fragments étudiés est indiquée sous l'image en pb. La piste - correspond à l'ADN du fragment 173 pb sans protéine.

la protéine HrpG : monomère, dimère et trimère. Une autre hypothèse est l'instabilité du complexe ADN/protéine et des oligomères protéiques potentiellement impliqués dans ce complexe. La dissociation de ces complexes pourrait expliquer l'apparition de ces différentes bandes. Cependant, le signal obtenu est très faible, il est donc nécessaire d'améliorer les conditions de purification ou les conditions utilisées pour le gel retard afin de pouvoir vraiment identifier et de stabiliser les différentes formes protéiques mises en jeu dans l'interaction entre HrpG et l'ADN cible.

Parallèlement des expériences similaires ont été réalisées en utilisant le régulateur PrhG purifié de la même manière que HrpG, c'est-à-dire via son étiquette GST. Le régulateur PrhG s'est révélé moins insoluble que HrpG et les quantités de protéines purifiées sont plus importantes. Le retard obtenu après migration sur un gel non dénaturant du mélange ADN biotinylé + PrhG est plus intense que celui obtenu avec HrpG pour le même fragment d'ADN et très peu d'ADN libre est visible (Figure 33B). Il semble que la liaison entre l'ADN et PrhG mette en jeu essentiellement des formes dimériques de PrhG, puisqu'on observe principalement deux bandes dans les différentes expériences de gel retard réalisées.

Cette différence est assez surprenante si on considère les résultats obtenus précédemment qui tendent à montrer que HrpG présente une meilleure affinité pour le promoteur *hrpB* par rapport à PrhG en co-expression chez *E. coli*. Une des explications possibles réside dans le fait que la purification de la protéine HrpG a un moins bon rendement que celle de la protéine PrhG. Il est également possible qu'après purification la protéine HrpG ne soit pas dans une conformation idéale pour interagir avec son ADN cible puisque nous avons pu constater que pour des quantités de protéines équivalentes le retard obtenu avec la protéine HrpG est beaucoup plus faible que celui obtenu avec PrhG.

Utilisation de la technique de gel retard pour déterminer les résidus nucléotidiques importants dans le promoteur *hrpB*

Etant donné les résultats préliminaires obtenus en co-expression qui montrent que (1) HrpG et PrhG requièrent la même région de 50 pb de l'ADN du promoteur de *hrpB* pour induire l'expression de *hrpB*, et que (2) la liaison de PrhG sur le promoteur de *hrpB* en gel retard est meilleure que celle obtenue avec HrpG, nous avons préféré poursuivre notre étude en utilisant PrhG pour déterminer les résidus nucléotidiques essentiels à l'interaction avec le promoteur de *hrpB*.

Dans les expériences de co-expression le fragment du promoteur *hrpB* est cloné dans un plasmide, il n'est donc pas exclu que l'induction du gène rapporteur *lacZ* ne soit pas uniquement due à la reconnaissance du fragment cloné en amont du gène rapporteur par le régulateur mais que le régulateur reconnaisse également des résidus nucléotidiques du

ACTCCA **CAGTGAGGATTGTT**CAGGGCAAGGCGCAGCTTTGTTGAGATTATTTT
 140 131 126 115
 TCCGGCATTTTT**CTACGAT**GACTCCAGGCAGTTTGATTGATGCGGCCTGCATG
 90
 TCGCGGGCTGGTTCGACTGACGCTTCAGGAGCATTGCC**ATG**

Figure 35. Positionnement des éléments impliqués dans la reconnaissance du promoteur *hrpB* par les régulateurs HrpG et PrhG dans le promoteur de *hrpB* de la souche GMI1000

Le codon stop (TGA) de *hrcT* et le codon d'initiation de *hrpB* sont indiqués en gras. Les différents fragments indiqués correspondent à ceux étudiés en gel retard. La boîte -10 identifiée est présentée en bleu. Le motif TTGTT étudié en co-expression et en gel retard est présenté en vert et la région dupliquée dans le promoteur *hrpB* de la souche Molk2 est surlignée en jaune.

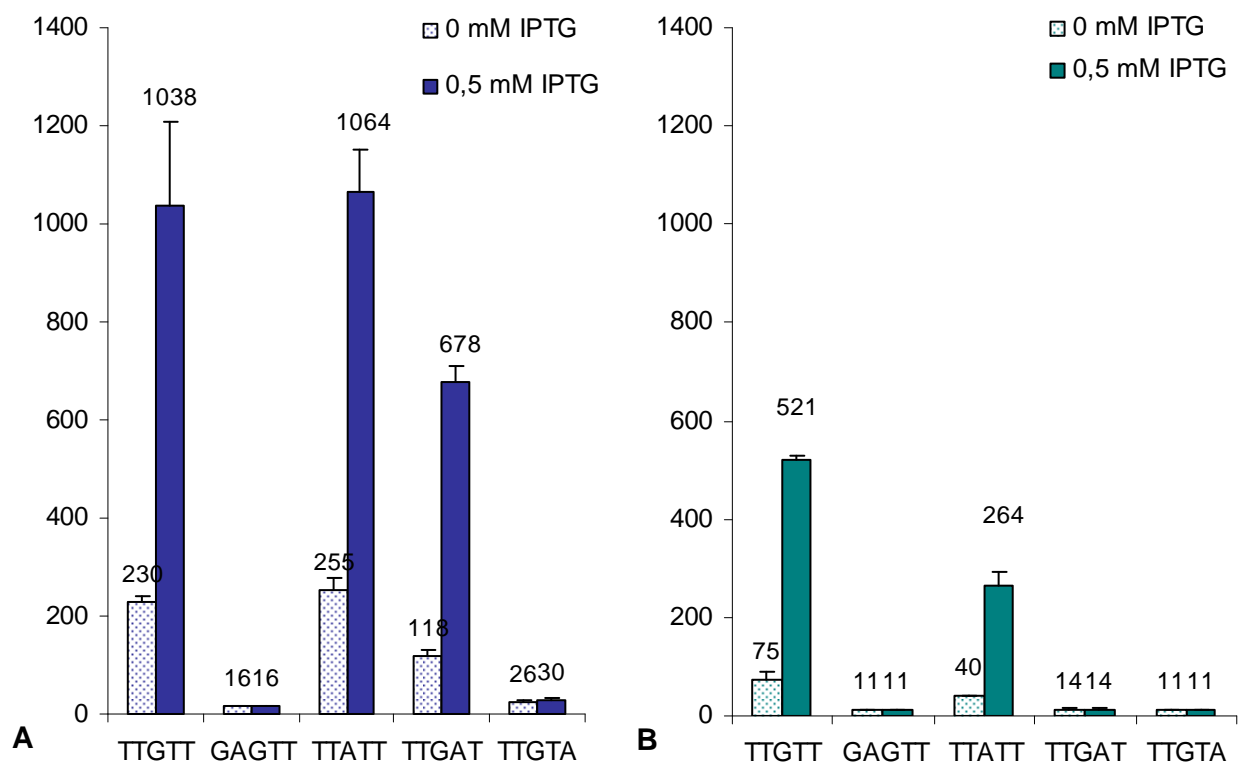


Figure 36. Etude du motif TTGTT et de son implication dans la reconnaissance du promoteur *hrpB* par HrpG et PrhG par co-expression chez *E. coli*

Les différentes constructions *phrpB* ::*lacZ* ont été co-exprimées avec le régulateur HrpG (A) et PrhG (B) placés sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Les mutations étudiées sont indiquées sous la figure et sont introduites dans le fragment de 140 pb. Les résultats obtenus montrent que le motif TTGTT est impliqué dans la reconnaissance du promoteur de *hrpB* par HrpG et PrhG, PrhG reconnaît plus de nucléotides que HrpG. Les activités sont exprimées en unités de Miller.

plasmide en amont ou au niveau du site de clonage. Pour exclure tout rôle du contexte génétique dans lequel le fragment est cloné dans la reconnaissance du promoteur par le régulateur, des fragments de taille supérieure au fragment de 140 pb et de taille inférieure ont été utilisés. Le retard obtenu pour des fragments de 173 pb, 165 pb, 160 pb, 155 pb, 150 pb, 140 pb, 131 pb, 126 pb, 124 pb, 120 pb, 115 pb et 103 pb a été étudié (Figure 34). Les résultats obtenus montrent que deux bandes de retard sont observées avec le régulateur PrhG pour les fragments de 173 pb à 140 pb, une seule bande de retard est observée pour les fragments de 131 pb à 120 pb et aucun retard n'est observé pour les bandes inférieures à 115 pb (Figure 34). Il semble donc qu'un fragment de 140 pb permette la liaison d'un dimère de PrhG alors qu'un fragment de 131 pb ne permet que la liaison d'un monomère de PrhG et que ce deuxième site de liaison est situé entre 115 pb et 130 pb puisque qu'aucun retard n'est observé pour un fragment de 115 pb. Ainsi l'intégralité de la région reconnue par PrhG est située entre 140 pb et 116 pb ; cette région correspond à la région dupliquée dans le promoteur de *hrpB* de la souche Molk2 (Figure 35).

Evaluation du rôle du motif TTGTT du promoteur de *hrpB*

Nous avons déjà pu mettre en évidence une bonne corrélation entre ces deux méthodes avec l'étude des fragments de différentes tailles. Les deux méthodes montrent que le site de reconnaissance de PrhG sur le promoteur de *hrpB* est présent en entier dans le fragment de 140 pb et qu'une partie de ce site est également présente dans un fragment de 126 pb permettant d'obtenir une bande de retard et une faible induction du gène rapporteur *lacZ* cloné en aval du fragment de 126 pb sur induction du régulateur.

La répétition du motif TTGTT dans le promoteur de 140 pb nous a amenés à effectuer des mutations de ce motif (Figure 35). Quatre mutations de ce motif situé entre 125 et 129 pb en amont de l'ATG de *hrpB* ont été étudiées : mutation de TTGTT en **GAGTT**, **TTATT**, **TTGAT** et **TTGTA**. Les différents fragments de 140 pb mutés ont été clonés en amont du gène rapporteur *lacZ* et co-exprimés avec les plasmides portant HrpG ou PrhG.

Les résultats obtenus montrent que HrpG n'induit pas l'expression du rapporteur *lacZ* lorsque celui-ci est cloné en aval des fragments portant les mutations **GAGTT** et **TTGTA** (Figure 36). Ces résidus semblent donc être nécessaires à la reconnaissance du promoteur de *hrpB* par HrpG. Les fragments portant les autres mutations permettent une reconnaissance du promoteur de *hrpB* par HrpG peu différente de celle obtenue avec le fragment non muté.

Les résultats obtenus sur induction du régulateur PrhG sont un peu différents puisque les fragments portant les mutations **GAGTT**, **TTGAT** et **TTGTA** ne sont pas reconnus par PrhG et aucune induction du gène rapporteur *lacZ* n'est mesurée. La mutation **TTATT** réduit de



Figure 37. Etude du motif TTGTT et de son implication dans la reconnaissance du promoteur *hrpB* par PrhG par gel retard

La piste 1 est le contrôle négatif, c'est-à-dire le fragment de 173 pb marqué à la biotine sans protéine. Les pistes 2, 3, 4, 5 correspondent respectivement à des fragments de 173 pb, 140 pb, 131 pb et 115 pb déjà présentés dans la figure 33. La piste 6 contient le fragment de 140 pb portant la mutation **GAGTT** et la piste 7 contient le fragment de 140 pb portant la mutation **TTGAG**. La comparaison du retard obtenu avec ces fragments mutés par rapport au fragment de 140 pb sauvage (piste 3) montre la disparition d'une bande de retard. Ces résultats confirment que le motif TTGTT est impliqué dans l'interaction de PrhG avec le promoteur *hrpB*.

manière non négligeable la reconnaissance du promoteur de *hrpB* par PrhG, diminuant de moitié la transcription du gène *lacZ* par rapport au fragment sauvage (Figure 36).

La reconnaissance du promoteur de *hrpB* par les régulateurs HrpG et PrhG implique donc quelques nucléotides en commun : les nucléotides reconnus par HrpG sont également nécessaires à la reconnaissance du promoteur par PrhG. Cependant le site de reconnaissance de PrhG sur le promoteur de *hrpB* nécessite plus de nucléotides que celui de HrpG. Il semble donc que la régulation HrpG-dépendante requière une région nucléotidique plus dégénérée que celle requise pour la régulation PrhG-dépendante. Ce résultat pourrait expliquer pourquoi HrpG et PrhG ne partagent pas de cibles communes à part les gènes *hrpB* et *rsp0201* : la régulation transcriptionnelle par PrhG nécessite un site plus conservé qui ne serait pas présent dans les autres cibles régulées directement par HrpG, empêchant leur co-régulation par PrhG.

Finalement, le motif TTGTT a également été étudié par la technique de gel retard en utilisant le régulateur PrhG. Deux mutations ont été étudiées : **GAGTT** et **TTGAG**. Ces mutations ont été générées par PCR en utilisant des amorces portant les mutations. Les fragments amplifiés sont, hormis la mutation, identiques au fragment de 140 pb. Les expériences réalisées ont montré que lorsque PrhG est mis en présence des fragments promoteurs mutés, une seule bande de retard est obtenue. En revanche, en présence du fragment sauvage de 140 pb, deux bandes de retard sont observées (Figure 37). La présence d'une bande de retard avec les fragments mutés suggère que PrhG est toujours capable d'interagir avec les fragments mutés mais la mutation empêche la formation de dimères protéiques. Ainsi, seul un monomère de PrhG serait capable de se fixer sur les séquences mutées entraînant la disparition d'une bande de retard.

Corrélation entre la technique de gel retard et les co-expressions chez *E. coli*

Les résultats obtenus sur l'étude du motif TTGTT confirment que les deux méthodes, co-expression chez *E. coli* et gel retard, apportent des résultats identiques. La méthode de gel retard est plus rapide puisqu'elle ne nécessite pas les étapes de clonage nécessaires aux co-expressions chez *E. coli*. Cette méthode permet également de mieux décrypter le mode d'interaction entre le régulateur et l'ADN du promoteur cible puisqu'elle permet de mettre en évidence la formation de dimères protéiques lors de l'interaction entre le régulateur et l'ADN. Actuellement, la technique de gel retard est utilisée pour étudier l'effet de mutations ponctuelles sur chacun des nucléotides présents dans la zone de 34 pb identifiée comme étant nécessaire à l'interaction entre PrhG et le promoteur de *hrpB*. Cependant, il est possible d'envisager que la mutation d'un nucléotide n'entraîne pas de changement dans les retards observés. En effet, plusieurs résidus nucléotidiques sont impliqués dans l'interaction

entre le régulateur et l'ADN, il est donc possible que la mutation d'un seul nucléotide n'empêche pas la fixation du régulateur et que des combinaisons de mutations soient nécessaires à l'abolition du retard. Pour cette raison la méthode de co-expression peut se révéler plus sensible. En effet cette technique permet non seulement d'évaluer la fixation du régulateur à l'ADN, mais également le bon positionnement de celui-ci sur le promoteur de manière à ce qu'il puisse interagir avec l'ARN polymérase pour induire l'expression du rapporteur. Cette différence est mise en évidence à travers l'étude du motif TTGTT : les expériences de gel retard montrent que PrhG peut toujours se fixer sur les fragments mutés ; en revanche son positionnement sur le promoteur ne lui permet pas d'interagir avec l'ARN polymérase puisqu'aucune transcription du gène rapporteur n'est détectée dans les expériences de co-expression avec ces mêmes fragments.

Finalement, les complexes protéiques et les complexes ADN-protéines formés lors de l'interaction sont relativement labiles, l'intensité des retards obtenus et la stœchiométrie entre les deux bandes de retard obtenues peuvent donc être relativement variables ; ainsi l'étude des mutations ponctuelles et l'interprétation des résultats obtenus seront délicates. Par exemple, si la mutation a pour effet de déstabiliser l'interaction entre la protéine et l'ADN ou l'interaction entre deux monomères protéiques, cet effet sera difficilement identifiable et quantifiable par la technique de gel retard. Il semble donc nécessaire de continuer les deux techniques en parallèle puisque les résultats apportés par ces deux techniques sont complémentaires.

Tableau 5. Expression des plasmides portant les fusions rapportrices *phrpB ::lacZ* dans différentes souches de *R. solanacearum*

Trois constructions *phrpB ::lacZ* ont été exprimées dans différentes souches de *R. solanacearum*. pLP103 porte le fragment de 140 pb sans mutation, pLP104 porte le fragment de 140 pb avec une mutation empêchant l'activation transcriptionnelle par PrhG uniquement et pLP84 porte le fragment de 140 pb avec une mutation empêchant l'activation transcriptionnelle par PrhG et HrpG.

L'activité β -galactosidase est exprimée en unités de Miller, les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types sur trois dosages. *N.D.* note une condition non testée.

Fonds génétiques	Plasmides rapporteurs <i>phrpB::lacZ</i>		
	pLP103	pLP104	pLP84
WT	290,0 (2,8)	126,5 (16,3)	49,5 (0,5)
Δ <i>hrpG</i>	179,5 (4,9)	63,5 (2,1)	35,0 (1,4)
Δ <i>prhG</i>	79,0 (4,2)	67,5 (3,5)	46,0 (2,8)
Δ <i>hrpG\Delta</i> <i>prhG</i>	31,5 (0,7)	29,5 (2,1)	<i>N.D.</i>

4. Expression des plasmides rapporteurs *phrpB::lacZ* chez *R. solanacearum*

De la même manière que précédemment, les plasmides rapporteurs utilisés en système hétérologue ont été introduits chez *R. solanacearum* pour confirmer les résultats obtenus en co-expression. En se basant sur les données d'expression en système hétérologue, trois plasmides ont été choisis pour être étudiés chez *R. solanacearum* :

- pLP103, plasmide portant le fragment de 140 pb non muté ;
- pLP104, plasmide portant un fragment de 140 pb muté dans le motif TTGTT ; selon les données de co-expression chez *E. coli*, ce fragment permet une induction du gène rapporteur *lacZ* par HrpG mais pas par PrhG,
- pLP84, plasmide portant un fragment de 140 pb muté dans le motif TTGTT ; ce fragment ne permet pas d'induction du gène rapporteur *lacZ* par HrpG ni par PrhG chez *E. coli*.

Analyses de l'expression des différents plasmides rapporteurs dans la souche GMI1000

Ces trois plasmides ont été introduits dans la souche sauvage GMI1000 par électroporation. Les souches obtenues ont ensuite été cultivées en milieu minimum supplémenté avec du glutamate et l'activité β -galactosidase a été mesurée dans chacune des souches (Tableau 5).

La souche exprimant le plasmide pLP103 est celle qui présente l'expression la plus forte, ce plasmide porte le fragment de 140 pb non muté. La souche exprimant le plasmide pLP84 présente une induction réduite d'un facteur six par rapport à la souche portant le fragment non muté (pLP103). Finalement, la souche exprimant le plasmide pLP104 présente une induction intermédiaire : réduite d'un facteur deux par rapport au plasmide pLP103 mais plus importante d'un facteur trois par rapport au plasmide pLP84. Les résultats obtenus dans la souche GMI1000 sont donc relativement similaires à ce qui a été observé chez *E. coli*.

L'expression du gène rapporteur du plasmide pLP84 (fragment de 140 pb muté TTGTT>TTGAG) n'est induite ni par HrpG, ni par PrhG en co-expression chez *E. coli*. Il est donc attendu que ce plasmide présente l'induction la plus faible chez *R. solanacearum*. L'activité β -galactosidase mesurée, dans une souche exprimant ce plasmide, correspond donc au bruit de fond.

Les résultats de co-expression chez *E. coli* ont montré que la mutation TTGTT>TTGAT portée par le plasmide pLP104 abolit l'induction de l'expression du rapporteur par le régulateur PrhG mais pas par le régulateur HrpG. Chez *R. solanacearum*, l'induction obtenue pour ce plasmide est intermédiaire. Dans la souche GMI1000 et en milieu minimum, les deux régulateurs HrpG et PrhG sont actifs et induisent l'expression de *hrpB*. L'observation d'une induction intermédiaire du plasmide rapporteur pLP104 suggère qu'un seul des deux régulateurs est capable d'induire l'expression de ce plasmide rapporteur. Selon les résultats obtenus en système hétérologue, l'hypothèse la plus probable est donc que seul HrpG est capable d'induire l'expression de ce plasmide rapporteur. Cependant, il n'est pas exclu que les deux régulateurs soient impliqués dans l'induction de ce plasmide rapporteur mais que la mutation limite l'activation transcriptionnelle ce qui expliquerait la diminution de l'activité β -galactosidase de ce plasmide rapporteur.

Certains résidus nucléotidiques requis pour l'induction de l'expression du gène hrpB semblent être situés entre -173 pb et -140 pb

Nous avons vu précédemment qu'un plasmide portant un fragment de 173 pb présentait une activité β -galactosidase de 1 737 unités de Miller équivalente à l'activité mesurée pour un plasmide de 231 pb (1 714 unités de Miller, Figure 31). L'activité β -galactosidase induite par l'expression d'un plasmide portant un fragment de 140 pb du promoteur *hrpB* n'est mesurée qu'à 290 unités de Miller. Ce résultat est assez surprenant si on considère que les données de co-expression chez *E. coli* montrent que les plasmides portant les fragments de 173 pb et 140 pb permettent d'obtenir des activités β -galactosidase identiques sur induction de l'expression de *hrpG* ou de *prhG*.

Selon les travaux menés chez *R. solanacearum*, des résidus nucléotidiques situés entre -173 pb et -140 pb seraient donc nécessaires à l'induction de l'expression de *hrpB*. Ces travaux ont été menés dans la souche GMI1000 dans un milieu inducteur des gènes *hrp*. Dans ces conditions, les deux régulateurs, HrpG et PrhG, sont impliqués dans l'induction de l'expression de *hrpB*. Il est possible que les résidus nucléotidiques situés entre -173 pb et -140 pb ne soient pas nécessaires aux deux régulateurs mais uniquement à l'un des deux. Dans l'objectif d'essayer de déterminer si un seul des régulateurs ou les deux sont impliqués dans l'interaction entre cette région de -173 pb et -140 pb du promoteur *hrpB*, il a été décidé d'étudier et comparer l'expression de ces plasmides dans des fonds génétiques mutés pour les gènes *hrpG*, *prhG* et dans le double mutant *hrpGprhG*.

Analyses de l'expression des différents plasmides rapporteurs chez les mutants $\Delta hrpG$, $\Delta prhG$ et $\Delta hrpG\Delta prhG$

Les trois plasmides utilisés dans la souche GM11000 ont été introduits dans les mutants $\Delta hrpG$ (GMI1755), $\Delta prhG$ (GRS445) et $\Delta hrpG\Delta prhG$ (GRS491). De la même manière que précédemment, l'activité β -galactosidase induite par chacune de ces constructions a été mesurée après culture des différentes souches en milieu minimum supplémenté avec du glutamate (Tableau 5).

Les résultats obtenus montrent que l'expression du plasmide pLP103 dans le mutant $\Delta hrpG$ représente 61% de l'activité mesurée dans le fonds génétique sauvage alors qu'elle ne représente que 30% de cette activité dans le fonds génétique $\Delta prhG$. Au cours de travaux précédents, il avait déjà été mis en évidence que l'impact de la délétion de *prhG* sur la transcription de *hrpB* était plus important que celui de la délétion de *hrpG* (Plener *et al.*, 2010). Cependant, cette différence observée entre les deux régulateurs est plus importante que ce qui avait été observé précédemment et l'activité du plasmide rapporteur dans le fonds génétique $\Delta hrpG$ reste relativement élevée. Il est donc possible de penser que les résidus nucléotidiques nécessaires à l'activation transcriptionnelle de *hrpB* et situés entre -173 pb et -140 pb soient spécifiques à HrpG. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi la délétion de *hrpG* a un effet relativement mineur sur l'expression du plasmide rapporteur contenant le fragment de 140 pb.

L'étude des souches exprimant le plasmide pLP84 (plasmide ne permettant pas l'induction du rapporteur par HrpG ni par PrhG chez *E. coli*) montre que l'expression de ce plasmide dans tous les fonds génétiques étudiés est faible, et proche du seuil de bruit de fond. L'activité β -galactosidase mesurée dans ces conditions peut être expliquée par une faible transcription de *hrpB* qui resterait possible dans ces conditions, malgré les mutations réalisées.

Finalement, l'étude des souches portant le plasmide pLP104 concorde également avec les données observées lors de l'étude en système hétérologue. La mutation portée par le plasmide pLP104 réduit d'un facteur trois l'induction du rapporteur en comparaison au fragment non muté (pLP103) dans le fonds génétique $\Delta hrpG$. Dans ce fonds génétique, c'est donc le régulateur PrhG qui est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de *hrpB*. A l'inverse, dans le fonds génétique $\Delta prhG$, c'est le régulateur HrpG qui est responsable de l'induction de *hrpB*. Dans cette condition, l'expression du rapporteur n'est diminuée que d'un facteur 1,2 par rapport au plasmide pLP103. Ces données tendent à confirmer que la mutation portée par le plasmide pLP104 est davantage impliquée dans l'activation transcriptionnelle de *hrpB* par PrhG que par HrpG.

Corrélation entre le système d'expression hétérologue et l'expression des plasmides rapporteurs chez *R. solanacearum*

De manière générale, les résultats obtenus en co-expression chez *E. coli* pour l'étude de l'importance du motif TTGTT dans l'interaction entre le promoteur *hrpB* et ses régulateurs sont confirmés par les résultats obtenus chez *R. solanacearum*. En effet, les deux méthodes indiquent que le motif TTGTT est en partie requis pour l'activation transcriptionnelle de *hrpB* par HrpG et PrhG. Le résidu nucléotidique G est nécessaire à l'activation transcriptionnelle par PrhG mais pas par HrpG. A l'inverse, les deux derniers T de ce motif sont nécessaires à la fois pour l'activation transcriptionnelle par HrpG et par PrhG.

En revanche, l'étude des plasmides rapporteurs chez *R. solanacearum* a permis de mettre en évidence que le fragment de 140 pb ne contient sans doute pas tous les résidus nucléotidiques requis pour l'activation transcriptionnelle de *hrpB*. Il est possible que les résidus situés entre -173 pb et -140 pb soient uniquement impliqués dans l'interaction entre HrpG et le promoteur *hrpB* mais pas entre PrhG et le promoteur *hrpB*. Cette hypothèse est soutenue par les données établies en gel retard qui montrent qu'un fragment de 140 pb interagit de manière identique avec PrhG qu'un fragment de 173 pb. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être confirmée en exprimant davantage de constructions *phrpB::lacZ* dans les différents fonds génétiques de *R. solanacearum*.

Cette différence entre les deux systèmes soulève néanmoins la question de la pertinence des résultats obtenus dans le système hétérologue. Il est important de noter que l'utilisation du système hétérologue nous a permis de mettre en évidence l'importance du motif TTGTT dans l'interaction entre le promoteur *hrpB* et les régulateurs HrpG et PrhG. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer pourquoi le système hétérologue n'a pas permis de mettre en évidence des différences d'induction du rapporteur lorsque celui-ci est placé sous contrôle du fragment de 173 pb par rapport à celui de 140 pb. Tout d'abord, le système d'expression utilisé ne permet pas de respecter la stœchiométrie entre le régulateur et l'ADN du promoteur cible, il est donc possible que des effets de saturation du promoteur par le régulateur empêchent d'obtenir une induction maximale du rapporteur. Il est également possible de penser que chez *E. coli*, les régulateurs ne soient pas dans une conformation idéale ou que des modifications post-transcriptionnelles nécessaires à la potentialisation de leur activité inductrice ne puissent pas avoir lieu chez cette bactérie.

Il est en effet possible que chez *R. solanacearum* un changement d'état (telle que la phosphorylation) de la protéine HrpG induise sa dimérisation lui permettant d'interagir avec deux motifs de l'ADN cible : l'un situé en amont de 140 pb et l'autre situé en aval. Ainsi, chez *E. coli*, si ce changement d'état ou de conformation de la protéine n'a pas lieu alors l'activation transcriptionnelle du rapporteur par HrpG est identique en présence d'un seul site

ou en présence des ces deux sites. Cette hypothèse concorde avec les données d'activité β -galactosidase obtenues pour les fragments de 173 pb, 140 pb et 140 pb muté (pLP84) chez *R. solanacearum*. En effet, ces données montrent une induction similaire entre (1) le fragment de 173 pb par rapport à 140 pb (induction d'un facteur six) et (2) entre le fragment de 140 pb non muté par rapport au fragment de 140 pb muté (induction d'un facteur six également). Ces résultats peuvent donc suggérer l'existence de deux motifs : l'un en amont de 140 pb et l'autre en aval qui seraient tous deux impliqués dans l'activation transcriptionnelle de *hrpB*. Il sera nécessaire de mieux évaluer le rôle de la région promotrice située entre -173 pb et -140 pb en étudiant cette région directement chez *R. solanacearum*.

Finalement, le système d'expression hétérologue permet de dramatiser les effets des mutations puisque les différences d'induction obtenues entre les fragments mutés et les fragments non mutés sont plus importantes lorsque les plasmides sont co-exprimés chez *E. coli* par rapport à leur expression chez *R. solanacearum*. Cette augmentation de l'effet observé peut être expliquée par le fait que les complexes ADN/protéine formés chez *E. coli* sont moins stables que chez *R. solanacearum*, les protéines n'étant peut-être pas dans une conformation idéale pour interagir avec l'ADN cible. Ainsi, une mutation dans le promoteur de l'ADN cible déstabilise davantage le complexe formé chez *E. coli* par rapport à chez *R. solanacearum*. Cette amplification des effets induits par les mutations pourra s'avérer utile pour identifier des résidus, qui sont impliqués dans l'interaction entre les régulateurs et le promoteur cible, mais dont le rôle n'est pas essentiel. Il est possible de penser que la mutation de ces résidus chez *R. solanacearum* n'induit qu'une variation mineure et non significative de l'expression du rapporteur.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Compréhension des mécanismes d'activation transcriptionnelle impliquant le régulateur HrpG

Mécanismes de co-régulation de l'expression de *hrpB* par HrpG et PrhG

Les travaux effectués sur le promoteur *hrpB* ont pour objectif de déterminer la séquence nucléotidique *cis*-régulatrice nécessaire à l'induction de l'expression du gène par HrpG et PrhG. Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre comment ces deux régulateurs se partagent le contrôle de l'expression de *hrpB*. Les premiers résultats obtenus suggèrent qu'une région de 34 pb contient une partie des résidus nucléotidiques nécessaires à l'interaction entre HrpG et l'ADN cible ainsi qu'entre PrhG et l'ADN cible. Etant donné la très forte homologie entre les deux régulateurs et plus particulièrement entre les domaines Hélice-Tour-Hélice, domaines de reconnaissance et de liaison à l'ADN, il n'est pas surprenant que les deux régulateurs requièrent des résidus nucléotidiques communs pour interagir avec l'ADN promoteur. Nos données suggèrent également que l'interaction entre PrhG et le promoteur de *hrpB* fait intervenir davantage de nucléotides que l'interaction entre HrpG et le promoteur de *hrpB*. Cette différence pourrait expliquer pourquoi HrpG contrôle davantage de gènes cibles que PrhG. Pour confirmer ces hypothèses, il serait nécessaire d'étudier par la technique de gel retard des fragments d'autres promoteurs, notamment ceux des gènes *metR* et *efe* qui ont été identifiés comme étant des cibles directes de HrpG et de vérifier qu'aucune interaction n'existe entre ces promoteurs et le régulateur PrhG.

Actuellement, aucune condition étudiée ne nous a permis de reconstituer *in vitro* l'interaction entre HrpG et le promoteur de *hrpB* de manière stable. Des essais sont en cours pour changer les conditions utilisées en gel retard et les conditions de purification. Il semblerait que la protéine HrpG ne soit pas, lorsqu'elle est produite chez *E. coli*, dans une conformation idéale pour former un complexe protéine/ADN stable. Une des alternatives envisagées est la purification de HrpG chez *R. solanacearum*.

Pour déterminer les résidus nucléotidiques impliqués dans la séquence *cis*-régulatrice de *hrpB*, nous utilisons donc la protéine PrhG qui présente une interaction plus forte *in vitro* avec l'ADN cible. Cette approche est basée sur l'hypothèse que HrpG et PrhG requièrent les mêmes nucléotides et que HrpG se fixe sur une séquence cible dont le motif est plus dégénéré que celui reconnu par PrhG. Les premiers résultats obtenus avec le motif TTGTT tendent à confirmer cette première hypothèse. L'identification de l'intégralité des nucléotides nécessaires à l'activation du promoteur par PrhG et la comparaison de cette séquence aux

promoteurs des gènes *metR* et *efe*, nous permettra peut-être d'identifier les résidus nucléotidiques nécessaires à l'activation par HrpG.

Nous avons vu qu'une partie des résidus nucléotidiques nécessaires à l'induction de l'expression de *hrpB* par HrpG et PrhG semble commune aux deux régulateurs. Or ces deux régulateurs induisent l'expression de *hrpB* dans une même condition : le milieu minimum supplémenté avec du glutamate. Au cours des travaux menés sur la caractérisation du régulateur PrhG, aucune coopération entre HrpG et PrhG n'avait été mise en évidence pour l'induction de l'expression de *hrpB*. Etant donné que les séquences *cis*-régulatrices reconnues par HrpG et PrhG sont en partie communes ou chevauchantes et que ces deux régulateurs sont actifs en milieu minimum, la possibilité de phénomènes de compétition ou de coopération entre ces régulateurs ne peut pas être exclue. Il est important de noter que les expériences de complémentation réalisées pour déterminer l'existence ou non de coopération entre les deux régulateurs ont été effectuées avec une souche portant une fusion génomique *lacZ* dans le gène *hrpB*, donc dans un fonds génétique muté pour le gène *hrpB*. La mise en évidence de boucles de rétro-contrôle suggère un contrôle très strict de l'expression de *hrpB*, il est donc possible d'envisager qu'un élément du régulon de HrpB vienne également modifier les interactions entre HrpG, PrhG et le promoteur de *hrpB*. L'expression des fusions rapportrices dans différentes souches de *R. solanacearum* et notamment la comparaison des expressions obtenues dans les souches $\Delta hrpG$, $\Delta prhG$ par rapport à celles obtenues dans leurs dérivés portant la disruption du gène *hrpB*, nous permettra peut-être d'identifier certains mécanismes de coopération ou au contraire de compétition entre les deux régulateurs. Il est également envisageable d'utiliser à la fois HrpG et PrhG dans les expériences de gel retard pour vérifier, par exemple, si la présence d'un régulateur stabilise la présence de l'autre régulateur.

Finalement, l'activation transcriptionnelle de *hrpB* induite par HrpG semble nécessiter une région plus grande que celle nécessaire à l'activation transcriptionnelle par PrhG. Pour établir le rôle de cette région, située entre -173 pb et -140 pb, des études chez *R. solanacearum* seront nécessaires dans l'objectif de déterminer quels sont les résidus nucléotidiques et quels sont les mécanismes impliqués dans l'interaction entre HrpG et cette région cible.

Rôle de la phosphorylation de HrpG dans les mécanismes d'activation transcriptionnelle

Il n'est pas exclu que la séquence *cis*-régulatrice nécessaire à l'induction par HrpG ne soit pas identique dans le promoteur *hrpB* par rapport aux autres cibles directes contrôlées par

HrpG. En effet, *hrpB* est une des rares cibles communes mises en évidence par les analyses transcriptomiques entre HrpG et PrhG. Il est possible que la régulation de l'expression de ce gène soit originale et différente des autres gènes contrôlés directement par HrpG. HrpG, ainsi que PrhG, sont des régulateurs de systèmes à deux composants orphelins ; c'est-à-dire qu'aucune kinase n'est associée au niveau génomique à ces régulateurs. Une modification post-traductionnelle commune à de nombreux régulateurs de TCSTs est la phosphorylation au niveau d'un résidu aspartate conservé dans le domaine receveur du régulateur. HrpG et PrhG contiennent tous les deux une aspartate (D51) correspondant à l'aspartate conservée et phosphorylée de cette famille de régulateurs. Dans l'hypothèse où HrpG serait capable de reconnaître et de se fixer à deux types de séquences *cis*-régulatrices, la phosphorylation de l'aspartate pourrait permettre au régulateur d'interagir avec deux séquences nucléotidiques *cis*-régulatrices différentes. C'est-à-dire qu'en l'absence de phosphorylation, HrpG interagirait avec un type de promoteurs, par exemple le promoteur de *hrpB*, alors qu'après phosphorylation HrpG interagirait avec les autres gènes cibles en se fixant à une séquence *cis*-régulatrice différente de celle présente dans le promoteur *hrpB*. Les analyses transcriptomiques réalisées sur HrpG ont montré que ces deux types de cibles sont contrôlés par HrpG dans une même condition : le milieu minimum. Cette hypothèse implique donc que les deux formes de HrpG, phosphorylée et non phosphorylée, co-existent et soient présentes dans une même condition de culture.

La phosphorylation de HrpG et de PrhG n'a pas encore été étudiée dans l'équipe. Concernant HrpG, sa phosphorylation a été étudiée par Yoshimochi et ses collaborateurs en 2009. Ces auteurs ont étudié un mutant sur le résidu aspartate conservé et ont montré que ce résidu est nécessaire, au moins partiellement, à l'induction de l'expression de *hrpB* en milieu minimum et en présence de cellules végétales mais pas en milieu complet. Selon cette étude, la forme phosphorylée de HrpG permettrait une meilleure induction de l'expression de *hrpB* et de son régulon en milieu minimum et en présence de cellules végétales par rapport au milieu complet. Cependant, cette étude a été menée sur la souche OE1-1 de *R. solanacearum* et les résultats présentés diffèrent de ce qui a été observé chez la souche GMI1000 de *R. solanacearum*. Ces différences résident notamment dans l'intégration de différents signaux par le senseur PrhA et par d'autres senseurs membranaires non identifiés, ainsi que dans les profils d'expression des différents gènes de la cascade PrhA-dépendante, dont *hrpG* et *hrpB*. Il n'est pas impossible que la régulation de l'expression de *hrpB* chez la souche OE1-1, utilisée par ces auteurs, ne soit pas identique à celle mise en place chez la souche GMI1000.

Yoshimochi et collaborateurs montrent que les deux formes de HrpG, phosphorylée et non-phosphorylée, interagissent avec le promoteur *hrpB* et induisent, de manière plus ou moins

forte, l'expression de ce gène. La phosphorylation de HrpG ne permettrait donc pas au régulateur de se fixer à deux types de séquence *cis*-régulatrices différentes, mais plutôt de moduler son interaction avec une même cible et donc de moduler l'induction des gènes contrôlés par ce régulateur. Cependant, étant donné les différences existant entre la régulation de l'expression de *hrpB* dans la souche OE1-1 et la souche GMI1000, il est probable que les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle agissant sur HrpG, telle que la phosphorylation, soient également différents entre ces deux souches. Il sera donc nécessaire d'étudier la phosphorylation de HrpG dans la souche GMI1000.

La détermination de la séquence *cis*-régulatrice nécessaire à l'activation transcriptionnelle par HrpG a pour objectif de nous permettre de mieux décrypter le régulon HrpG en discriminant les cibles directes des cibles non directes de ce régulateur. En plus de cet objectif, les études menées pour parvenir à l'identification de cette séquence nous permettent et nous permettront sans doute encore de mieux comprendre la régulation fine à laquelle est soumise le gène *hrpB*, ainsi que d'appréhender les mécanismes mis en jeu pour exercer ce(s) contrôle(s).

Tableau 6. Souches et plasmides utilisés dans le Chapitre II des Résultats

Souche/Plasmide	Génotype	Référence/Source
<i>E. coli</i>		
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697</i>	Invitrogen
BL21 DE3 (pLysS)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(<i>cm^R</i>)</i>	
<i>R. solanacearum</i>		
GMI1000	Souche sauvage	Salanoubat <i>et al.</i> , 2002
GMI1425	GMI1000 avec insertion Tn5-B20 dans le gène <i>hrpG</i> , Km ^R	Brito <i>et al.</i> , 1999
GMI1525	GMI1000 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R	Genin <i>et al.</i> , 1992
GMI1535	GMI1425 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R Km ^R	Genin <i>et al.</i> , 1992
GMI1694	GMI1000 avec insertion Ω dans le gène <i>hrcV</i> , Sp ^R	Cunnac <i>et al.</i> , 2004
GMI1755	GMI1000 Δ <i>hrpG</i>	Valls <i>et al.</i> , 2006
GRS445	GMI1000 Δ <i>prhG</i>	Plener <i>et al.</i> , 2010
GRS491	GMI1000 Δ <i>hrpG</i> , Δ <i>prhG</i>	Plener <i>et al.</i> , 2010
GRS500	GMI1000 <i>phrpB::luxCDABE</i> , Gm ^R	M. Valls, non publié
GRS507	GMI1525 <i>phrpB::luxCDABE</i> , Sp ^R Gm ^R	Cette étude
GRS509	GMI1755 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R	Cette étude
GRS510	GRS445 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R	Cette étude
GRS511	GRS491 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R	Cette étude
Plasmide		
pBluescript KS(+)	Vecteur de clonage, Ap ^R	Stratagene
pCZ205	Vecteur dérivé de pUC18 utilisé pour réaliser les fusions rapportrices <i>lacZ</i> , Ap ^R	Lavie <i>et al.</i> , 2002
pLAFR6	pLAFR1 avec des terminateurs de transcription, Tc ^R	Brito <i>et al.</i> , 1999
pLP52	Vecteur dérivé du pET26B(+) portant une construction <i>GST::hrpG</i> inducible à l'IPTG, Km ^R	Cette étude
pLP53	Vecteur dérivé du pET26B(+) portant une construction <i>GST::prhG</i> inducible à l'IPTG, Km ^R	Cette étude

6. MATERIELS ET METHODES

6.1 Matériels

Matériel microbien et conditions de croissance

Les souches et les plasmides utilisés au cours de cette étude sont décrits dans les tableaux 6 et 7. Le matériel microbien et les conditions de culture utilisées sont présentés dans la publication précédente. Brièvement, les cellules d'*Escherichia coli* sont cultivées à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (Extraits de levure 5 g/L, Bactotryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L). Les souches de *Ralstonia solanacearum* sont cultivées à 28°C dans le milieu complet B (Bacto-peptone 10 g/L, casaminoacides 1 g/L, extraits de levure 1 g/L) ou dans du milieu minimum MP ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,25 \times 10^{-4}$ g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L, KH_2PO_4 3,4 g/L) supplémenté avec 20 mM de glutamate. Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline 100 mg/L, gentamycine 10 mg/L, spectinomycine 40 mg/L, tétracycline 10 mg/L, kanamycine 25 pour *E. coli* ou 50 pour *R. solanacearum* mg/L.

Matériel végétal et co-cultures cellules végétales/bactéries

Les suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana* At-202 (accession Col-0) sont cultivées dans du milieu Gamborg B5 (Flow laboratories). Pour les co-cultures cellules végétales/bactéries, 10 mL de cellules d'*Arabidopsis* sont inoculées avec *R. solanacearum*. Après 16 h de co-culture à 28°C les cellules bactériennes sont récupérées par filtration.

6.2 Constructions génétiques

Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes standards de biologie moléculaire sont utilisées (Ausubel *et al.*, 1998). Les plasmides sont introduits dans *E. coli* et *R. solanacearum* par électroporation. Les intégrations stables en *trans* dans le génome de *R. solanacearum* se font par double recombinaison homologue dans une région neutre du génome (collaboration M. Valls). Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) et sont analysées sur un séquenceur automatique à capillaires de type ABI3730.

Tableau 7. Amorces utilisées pour générer les différents fragments des promoteurs *hrpB*, *metR*, *katE*, *rsp0983*, *metE* et *efe*

Lorsque les fragments sont utilisés en co-expression, le nom du plasmide correspondant est indiqué. Les sites de restrictions ajoutés dans les amorces PCR sont indiqués en rouge et les résidus nucléotidiques mutés sont indiqués en gras.

Amorce	Séquence (5' vers 3')	Description	Plasmide correspondant	Référence
hrpB rev biotin	GCGAGGCCTGAGGCCAGG	amorce anti-sens marquée à la biotine pour gel retard		Cette étude
oLP63	GCTCTAGAGCGAGGCCTGAGGCCAGG	amorce anti-sens pour clonage (XbaI)		Cette étude
oLP29	GCT AAGCTT CAGGTCAAGGCTAG	amorce sens pour le fragment de 231 pb (HindIII)	pLP37	Cette étude
oLP64	GCT AAGCTT GGGTGACGGCACGTCG	amorce sens pour le fragment de 173 pb (HindIII)	pLP66 (GMI1000) et pLP67 (Molk2)	Cette étude
oLP125	GGCACGTGCGCCAAAAGCGAA	amorce sens pour le fragment de 165 pb		Cette étude
oLP124	GTCGCCAAAAGCGAAAATC	amorce sens pour le fragment de 160 pb		Cette étude
oLP123	CAAAAGCGAAAATCCACAG	amorce sens pour le fragment de 155 pb		Cette étude
oLP111	GCGAAAATCCACAGTGAGG	amorce sens pour le fragment de 150 pb		Cette étude
oLP138	CACAGTGAGGATTGTTTACG	amorce sens pour le fragment de 140 pb		Cette étude
oLP133	GATTGTTTCAAGGCAAGGCGC	amorce sens pour le fragment de 131 pb		Cette étude
oLP126	TTCAGGGCAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment de 126 pb		Cette étude
oLP127	CAGGGCAAGGCGCAGCTTTG	amorce sens pour le fragment de 124 pb		Cette étude
oLP134	GCAAGGCGCAGCTTTGTTG	amorce sens pour le fragment de 120 pb		Cette étude
oLP135	GCGCAGCTTTGTTGAGATT	amorce sens pour le fragment de 115 pb		Cette étude
oLP137	GAGATTATTTTTCCGGCAT	amorce sens pour le fragment de 103 pb		Cette étude
oLP65	GCT AAGCTT CAGGGCAAGGCGCAGCT	amorce sens pour le fragment de 126 pb (HindIII)	pSC11	S. Cunnac, Non publié
B1	AAGCTT CCGGCATTTTTCTACGAT	amorce sens pour le fragment de 90 pb (HindIII)	pSC12	S. Cunnac, Non publié
oLP79	GCT AAGCTT CACAGTGAGGATTGTTTCAAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment de 140 pb (HindIII)	pLP103	Cette étude
oLP80	GCT AAGCTT CACAGTGAGGAG A GTTTCAAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP82	Cette étude
oLP81	GCT AAGCTT CACAGTGAGGATT A TTTCAAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP83	Cette étude
oLP82	GCT AAGCTT CACAGTGAGGATT G AGCAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP84	Cette étude
pLP85	GCT AAGCTT CACAGTGAGGATT G ATCAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP104	Cette étude
oLP86	GCT AAGCTT CACAGTGAGGATT T ACAGGCAAGGC	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP105	Cette étude
oLP88	GCT AAGCTT CACAG A GAGGATTGTTTCAAGG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP107	Cette étude
oLP89	GCT AAGCTT CACA A TGAGGATTGTTTCAAGG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP108	Cette étude
oLP94	GCT AAGCTT A ACAGTGAGGATTG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP143	Cette étude
oLP95	GCT AAGCTT C GAGTGAGGATTG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP144	Cette étude
oLP96	GCT AAGCTT C AAAGTGAGGATTG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP145	Cette étude
oLP97	GCT AAGCTT C ACGGTGAGGATTG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP146	Cette étude
oLP98	GCT AAGCTT C ACAG A AGGATTG	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP147	Cette étude
oLP99	GCT AAGCTT C ACAG T CGGATTGTT	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP148	Cette étude
oLP100	GCT AAGCTT C ACAG T GAAGATTGTT	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP149	Cette étude
oLP101	GCT AAGCTT C ACAG T GAG A ATTGTT	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP150	Cette étude
oLP102	GCT AAGCTT C ACAG T GAG G CTTGT	amorce sens pour le fragment muté de 140 pb (HindIII)	pLP151	Cette étude
oLP140	TT A AGGGCAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP141	TT C GGGGCAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP142	TTCATGGCAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP143	TTCAGTGC A AGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude

Génération des plasmides rapporteurs

Les plasmides rapporteurs contenant des fragments du promoteur de *hrpB* sont réalisés de la manière suivante : amplification du fragment voulu avec ajout des sites de restriction HindIII (en amont) et XbaI (en aval), l'enzyme utilisée est la Taq polymérase ; clonage dans un plasmide pGEM-T Easy Vector ® (Promega) et séquençage ; clonage du fragment promoteur en HindIII / XbaI en amont du gène rapporteur *lacZ* dans le plasmide pCZ205 (Lavie *et al.*, 2002) ; clonage de la fusion *phrpB::lacZ* en HindIII / Acc65i dans le plasmide pLAFR6.

Les mutations ponctuelles sont introduites par PCR en utilisant des amorces portant les mutations voulues (Tableau 7).

Le plasmide portant la fusion *phrpB::luxCDABE* contient un fragment de 231 pb du promoteur de *hrpB*. Ce plasmide contient des zones d'homologie avec une partie du chromosome de *R. solanacearum* pour permettre sa recombinaison stable et mono-copie dans le génome de la bactérie (F.Monteiro et M. Valls, données non publiées).

Génération des plasmides pLP52 et pLP53

Les gènes *hrpG* et *prhG* ont été clonés par la technologie Gateway (Invitrogen). Les produits PCR sont tout d'abord amplifiés avec des amorces spécifiques du gène à cloner puis avec les amorces universelles attB1 et attB2. L'enzyme utilisée est la *phusion* (Finnzymes). Le produit PCR encadré des sites *attB* est ensuite recombiné dans le vecteur donneur pDONR207 (Invitrogen) pour créer un vecteur d'entrée avec les sites *attL*. Cette réaction appelée BP est catalysée par l'intégrase du bactériophage λ (*BP ClonaseTM enzyme mix* – Invitrogen). Les inserts clonés dans les vecteurs d'entrée sont séquencés puis recombinaisonnés dans les vecteurs destinataires au cours d'une réaction appelée LR catalysée par l'intégrase et l'excisionase du bactériophage λ (*LR ClonaseTM enzyme mix* – Invitrogen). De cette manière les gènes *hrpG* et *prhG* ont été introduits dans le pDEST15 portant l'étiquette GST (Glutathion S-Transférase) en amont du site de clonage. Les constructions *gst::hrpG* et *gst::prhG* ont ensuite été introduites en NdeI / HindIII dans le plasmide pSC205 (dérivé du pET26b+, Novagen) en amont d'un promoteur inductible à l'IPTG.

Tableau 7. (Suite)

Amorce	Séquence (5' vers 3')	Description	Plasmide correspondant	Référence
oLP144	TTCAGGTCAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP145	TTCAGGGTAAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP146	TTCAGGGCGAGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP147	TTCAGGGCAGGGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP148	TTCAGGGCAATGCGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLP149	TTCAGGGCAAGTGCAGCTT	amorce sens pour le fragment muté de 126 pb		Cette étude
oLB003	TAAAGCTTCGTGACCACGCCGGC	amorce sens pour le fragment de 1 kb de <i>pmetR</i> (HindIII)		Cette étude
oLB004	TATCTAGAGAGATGGCGGATTTGAG	amorce anti-sens pour le fragment de <i>pmetR</i> (XbaI)		Cette étude
oLB005	TAGGATCCGGAACGGGAGGGGA	amorce sens pour le fragment de 1 kb de <i>pkatE</i> (HindIII)		Cette étude
oLB006	TATCTAGACAAGTTTCGACGGC	amorce anti-sens pour le fragment de <i>pkatE</i> (XbaI)		Cette étude
oLB012	TAAAGCTTCGCGGCGTAGGCCG	amorce sens pour le fragment de 0,7 kb de <i>pmetR</i> (HindIII)		Cette étude
oLB007	TAAAGCTTAATCTCGTACGCCGCGC	amorce sens pour le fragment de 1 kb de <i>pefe</i> (HindIII)		Cette étude
oLB008	TATCTAGAGAATGTCGTCAGATCGGTC	amorce anti-sens pour le fragment de <i>pefe</i> (XbaI)		Cette étude
oLB013	TAAAGCTTGGCAGCCATCCTGGCTA	amorce sens pour le fragment de 0,4 kb de <i>pefe</i> (HindIII)		Cette étude
oLB009	TATCTAGAGAGGGTATGGATGGTCGT	amorce sens pour le fragment de 1 kb de <i>pmetE</i> (HindIII)		Cette étude
oLB010	TAAAGCTTCGGTCTCGATGAAATCCTG	amorce anti-sens pour le fragment de <i>pmetE</i> (XbaI)		Cette étude
oLB018	TAAAGCTTGAAGCCTTCGGCACCATC	amorce sens pour le fragment de 1 kb de <i>prsp0983</i> (HindIII)		Cette étude
oLB019	TATCTAGAGGATCGCGTTCATCCAT	amorce anti-sens pour le fragment de <i>prsp0983</i> (XbaI)		Cette étude

6.3 Mesures d'activité luciférase et β -galactosidase

Mesures d'activité luciférase

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de milieu minimum supplémenté avec 20 mM de glutamate sur la nuit. 4 mL de cultures bactériennes sont centrifugés à 12 000 g et resuspendus dans 2 mL d'eau distillée. La DO_{600} est mesurée à partir d'un 1/10 de la suspension bactérienne. 20 mL de culture (milieu minimum ou co-culture en présence de cellules végétales) sontensemencés de manière à avoir 0,1 UDO finale. 6 h après ensemencement, 1 mL de culture bactérienne est récupéré et utilisé pour la lecture de la DO_{600} et la mesure d'activité luciférase. Dans le cas des co-cultures, 4 mL sont prélevés et filtrés avant de réaliser les deux mesures. L'activité luciférase est mesurée avec un luminomètre (Berthold) sur une durée de 15 s. La valeur moyenne de cette acquisition est utilisée puis ramenée à la quantité bactérienne. Les valeurs sont exprimées en RLU/s/UDO.

Mesures d'activité β -galactosidase

Les bactéries sont cultivées sur la nuit et récupérées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,5$ à $0,8$). Les bactéries cultivées en présence de cellules végétales sont préalablement filtrées. 100 μ L de suspensions bactériennes sont dilués dans 900 μ L de tampon Z (Miller, 1972). Les cellules sont perméabilisées avec 100 μ L de chloroforme et 100 μ L de SDS 0,1% (sodium dodecyl sulfate). La réaction commence avec l'ajout de 200 μ L d'ONPG (orthonitrophényl- β -galactoside, à 4 mg/mL) ; elle est arrêtée par 500 μ L de Na_2CO_3 (1M). Les activités sont calculées et exprimées en Unités de Miller.

6.4 Co-expression chez *Escherichia coli*

Les deux plasmides (plasmide rapporteur et plasmide portant le régulateur) sont électroporés en même temps dans des cellules d'*E. coli* Top10 (Invitrogen). Les doubles transformants sont sélectionnés et la présence des deux plasmides est vérifiée.

Les bactéries sont cultivées sur la nuit dans 10 mL de milieu LB à 37°C. 100 μ L de culture sont utilisés pour ensemencer 5 mL de milieu LB. Pour chaque souche, deux cultures de 5 mL sontensemencées à partir de la même pré-culture. Les bactéries sont ensuite cultivées à 28°C. Lorsque la DO_{600} atteint 0,4 à 0,5, de l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) à 0,5 ou 0,1 mM final. 3 h après induction de l'expression du régulateur les bactéries sont récupérées pour doser l'activité β -galactosidase. Le dosage est réalisé comme décrit ci-dessus.

6.5 Purification des protéines HrpG et PrhG

Culture et induction de l'expression des protéines

4 mL d'une pré-culture sur la nuit sont utilisés pour ensemer 200 mL de milieu LB en erlen de 1 L à 37°C. Lorsque la DO_{600} atteint 0,6, l'IPTG est ajouté au milieu à une concentration finale de 1 mM. Après deux heures d'induction de l'expression des protéines, les cultures bactériennes sont centrifugées par aliquots de 50 mL, 10 min à 6 000 g. Les culots séchés peuvent être conservés à -20°C.

Purification des protéines

Pour un culot produit à partir de 50 mL de culture bactérienne, les purifications sont réalisées de la manière suivante. Les bactéries sont lysées par resuspension du culot dans du tampon BugBuster (Novagen) à raison de 5 mL / g de culot. Les culots sont incubés 10 à 20 mn à température ambiante sur un agitateur rotatif. Les lysats obtenus sont centrifugés à 20 000 g, à 4°C pendant 20 mn. Les surnageants sont filtrés à travers une membrane PES (polyethersulfone) de 0,22 µm.

50 µL de billes de glutathion sépharose 4B (Roche) sont utilisés par culot. Les billes sont lavées trois fois avec du PBS (phosphate buffered saline) par centrifugation à 500 g, à 4°C pendant 5 mn.

Les surnageants filtrés sont mis en contact avec les billes pendant 30 mn à température ambiante. Le lavage des billes et l'élution sont réalisés sur colonne (BioRad). Les lavages sont effectués de la manière suivante : 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH8,8 avec 150 mM NaCl ; 1 mL de Tris-HCl 50 mM à pH8,8 avec 0,1% Triton ; 1 mL de Tris-HCl à pH8,8. Les billes sont finalement incubées à température ambiante avec 50 µL de glutathion (GSH, Sigma) réduit dans du Tris-HCl 50 mM à pH8,8, après 10 mn d'incubation un premier éluat est récupéré. Deux fois 25 µL sont à nouveau ajoutés aux billes. Les trois éluats sont récupérés dans un même tube, pour un volume final de 100 µL.

Les protéines sont concentrées en utilisant des Microcon® YM-30 (Amicon). Le volume final est ramené à 50 µL dans du Tris-HCl à pH8,8 avec 10% de glycérol. Les protéines peuvent être conservées plusieurs jours à 4°C.

6.6 Gel retard

Les fragments marqués à la biotine sont générés par PCR à partir d'une amorce anti-sens située en amont du gène *hrpB* elle-même marquée à la biotine. Les mutations étudiées sont introduites en utilisant des amorces sens portant les mutations voulues (Tableau 7). L'enzyme utilisée est la Taq polymérase. Les fragments amplifiés et utilisés en gel retard sont purifiés directement à partir du produit PCR en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR (Promega) et finalement séquencés. La quantité d'ADN utilisé est équilibrée d'un échantillon à l'autre à partir de visualisation sur gel d'agarose 1,5 %.

Les expériences de gel retard sont réalisées avec le kit LightShift® Chemiluminescent EMSA kit (Pierce) selon les instructions du fournisseur. Les mélanges réactionnels contiennent : 2 µL de tampon de liaison 10x ; 5 mM de MgCl₂ ; 5% de glycérol ; 0,05 mg de poly dI·dC ; 1 nM d'ADN marqué à la biotine ; la quantité de protéine est ajustée en fonction de la purification ; le volume réactionnel est ajusté à 20 µL avec de l'eau ultra-pure. Les mélanges réactionnels sont incubés 30 mn à température ambiante ; après incubation 5 µL de tampon de charge sont ajoutés à chaque échantillon et 15 µL du volume total sont utilisés pour la migration. La migration est effectuée dans du tampon TBE 0,5x (Tris Borate EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)) dans une cuve MiniProtean (BioRad). Un gel à 8% de poly-acrylamide est utilisé, le gel est équilibré par une pré-migration pendant 45 mn avant migration des échantillons à température ambiante.

Après migration le transfert sur membrane de nylon Hybond™ -N⁺ (Amersham) est réalisé à froid et sous agitation dans du TBE 0,5x. Les nucléotides sont fixés en posant la membrane sur un transilluminateur équipé d'ampoules émettant à 312 nm. La détection de l'ADN marqué à la biotine est réalisée en utilisant de la streptavidine conjuguée à la peroxydase. Les lavages sont effectués suivant les instructions du fournisseur. L'acquisition de la chimioluminescence est obtenue, après incubation avec le substrat, en utilisant un système d'imagerie à fluorescence et chimioluminescence G :Box (Syngene).

CHAPITRE III.

**Vers une vision intégrative du contrôle des
fonctions de virulence et d'adaptation *in planta***

CHAPITRE III.

**Vers une vision intégrative du contrôle des
fonctions de virulence et d'adaptation *in planta***

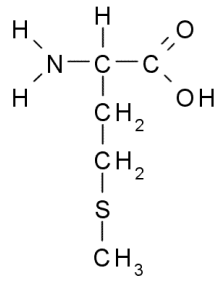


Figure 38. Formule semi-développée de la méthionine

La méthionine est un acide aminé comportant un atome de soufre. Cet acide aminé est impliqué dans de nombreux processus cellulaires.

CHAPITRE III.

Vers une vision intégrative du contrôle des fonctions de virulence et d'adaptation *in planta*

Les approches d'analyses transcriptomiques et l'identification de la séquence consensus reconnue par HrpG vont nous permettre d'obtenir une vision plus intégrative de la régulation des fonctions de virulence et des fonctions d'adaptation contrôlées par HrpG. Ces approches nous ont déjà permis d'identifier la voie de biosynthèse de la méthionine comme étant un processus impliqué dans le pouvoir pathogène de la bactérie, cette voie métabolique répondant à une régulation complexe que nous avons essayé de décrypter.

1. Biosynthèse et rôle de la méthionine

1.1 *La biosynthèse de la méthionine chez les bactéries*

La méthionine est un acide aminé à base de soufre (Figure 38) dérivé d'un autre acide aminé : l'aspartate. Les trois premières réactions de la production de la méthionine transforment l'aspartate en homosérine. Ces trois réactions sont communes avec d'autres voies métaboliques. Les autres réactions sont spécifiques à la biosynthèse de la méthionine (Figge, 2006) (Figure 39).

La dernière étape de la biosynthèse de la méthionine consiste en la transformation de L-homocystéine en L-méthionine par méthylation. Cette méthylation peut être catalysée par deux enzymes différentes : la méthionine synthase cobalamine-indépendante, MetE (EC 2.1.1.14) et la méthionine synthase cobalamine-dépendante, MetH (EC 2.1.1.13). MetE catalyse directement le transfert du groupement méthyl du donneur à l'homocystéine pour former de la méthionine, alors que MetH utilise la cobalamine comme un porteur intermédiaire du groupement méthyl (Figge, 2006). En fonction de la concentration intracellulaire en méthionine, des transporteurs sont impliqués dans l'import ou l'export de méthionine pour assurer un niveau constant de cet acide aminé dans la cellule bactérienne.

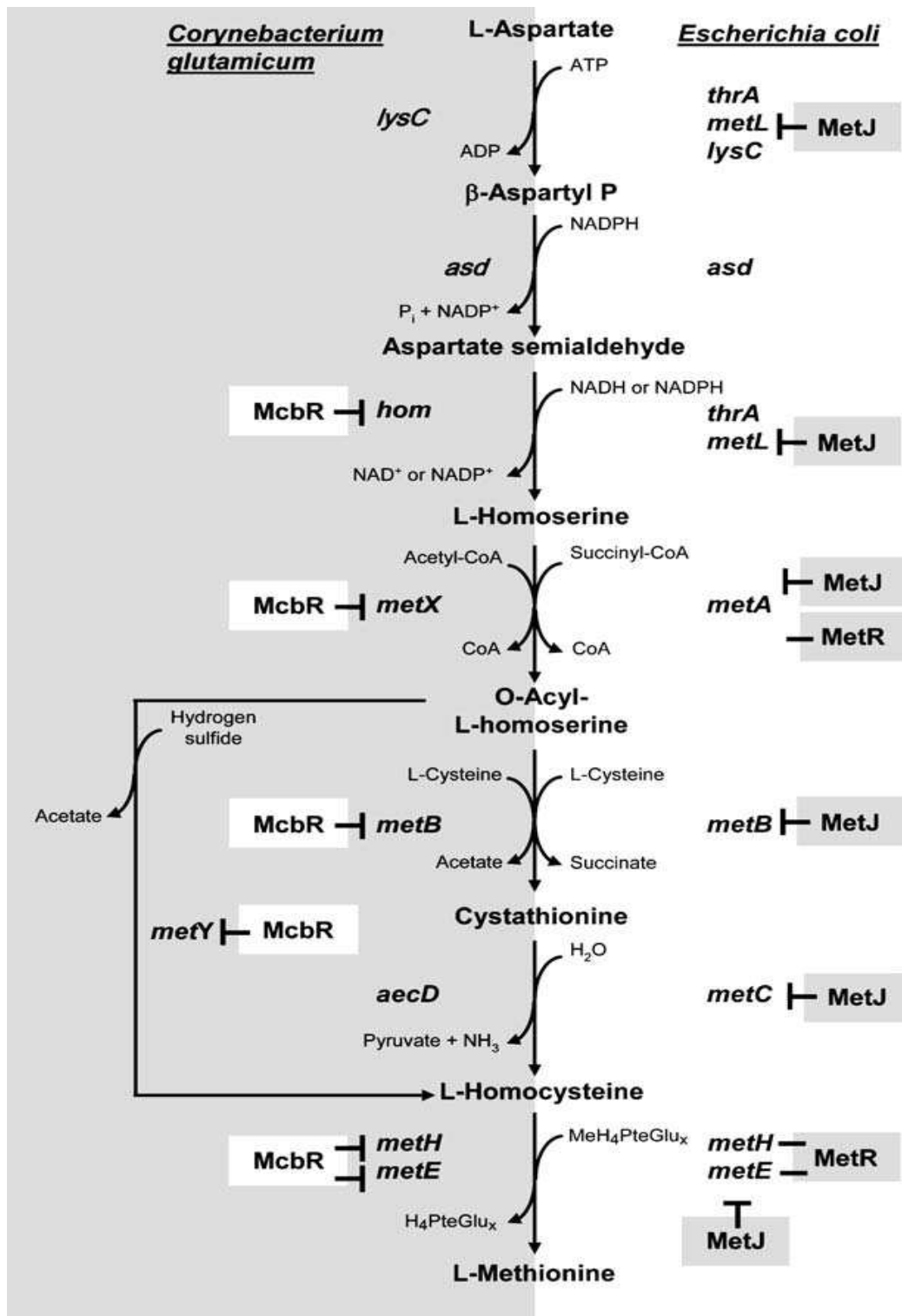


Figure 39. Voie de biosynthèse de la méthionine chez *Corynebacterium glutamicum* et *Escherichia coli*

Voie de biosynthèse de la méthionine chez *Corynebacterium glutamicum* (à gauche en grisé) et chez *Escherichia coli* (à droite en blanc). Les régulations transcriptionnelles par McbR, MetJ et MetR sont indiquées. Abréviation : $MeH_4PteGlu_x$: N_5 -Methyl-tétrahydropteroyl avec x molécules de glutamate liées.

(D'après Figge, 2006)

La régulation de la biosynthèse de la méthionine a été particulièrement étudiée chez *Escherichia coli* et *Corynebacterium glutamicum* (Figge, 2006). Deux régulateurs transcriptionnels de cette voie de biosynthèse ont ainsi été identifiés :

- MetJ est un répresseur contrôlant l'expression d'enzymes impliquées dans de nombreuses étapes de la biosynthèse de la méthionine : chez *E. coli*, MetJ réprime la transcription de *metL*, *metA*, *metB* et *metC* (Figure 39) ;
- MetR est un activateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de deux étapes de la biosynthèse de la méthionine : chez *E. coli*, MetR induit l'expression de *metA*, *metE* et *metH* ; ces deux derniers gènes codent pour les enzymes catalysant la dernière réaction de la voie de biosynthèse de la méthionine (Figure 39).

Le régulateur MetR est co-activé par l'homocystéine, le substrat de la dernière réaction de la biosynthèse de la méthionine. La séquence consensus reconnue par MetR a été identifiée : TGAannt/anntTCA (Byerly, 1991). L'expression de *metE* et *metH* dépend de la présence de MetR mais la présence d'homocystéine module différemment ces deux expressions : la présence d'homocystéine stimule fortement l'expression de *metE* alors qu'elle n'a aucun effet ou réprime légèrement la transcription de *metH* (Urbanowski and Stauffer, 1989, Cai *et al.*, 1989). L'expression du gène *metE* est également contrôlée par de nombreux autres facteurs (changements des conditions de cultures anaérobiques à aérobiques, disponibilité du soufre...) et par la présence de vitamine B12 (ou cobalamine) qui entraîne une diminution de la transcription de *metE*. Cette inhibition de la transcription de *metE* en présence de cobalamine est inhérente à l'enzyme MetH même si le mécanisme exact régissant cette inhibition n'est pas encore clairement défini (Urbanowski *et al.*, 1987 ; Figge, 2006). Chez *E. coli*, l'expression de *metR* est contrôlée principalement par le répresseur MetJ mais MetR réprime également sa propre transcription (Cai *et al.*, 1989).

1.2 La méthionine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires

La méthionine est un acide aminé très utilisé et indispensable à la biosynthèse des protéines puisque c'est l'acide aminé initiant la traduction.

La méthionine est également le précurseur de la SAM (S-adénosyl-méthionine), le donneur principal de groupement méthyl du métabolisme cellulaire. La synthèse de la SAM est catalysée par la SAM synthase MetK (EC 2.5.1.6) (Figure 40). Lors du transfert du groupement méthyl, la SAM est convertie en S-adénosylhomocystéine (SAH) qui peut être

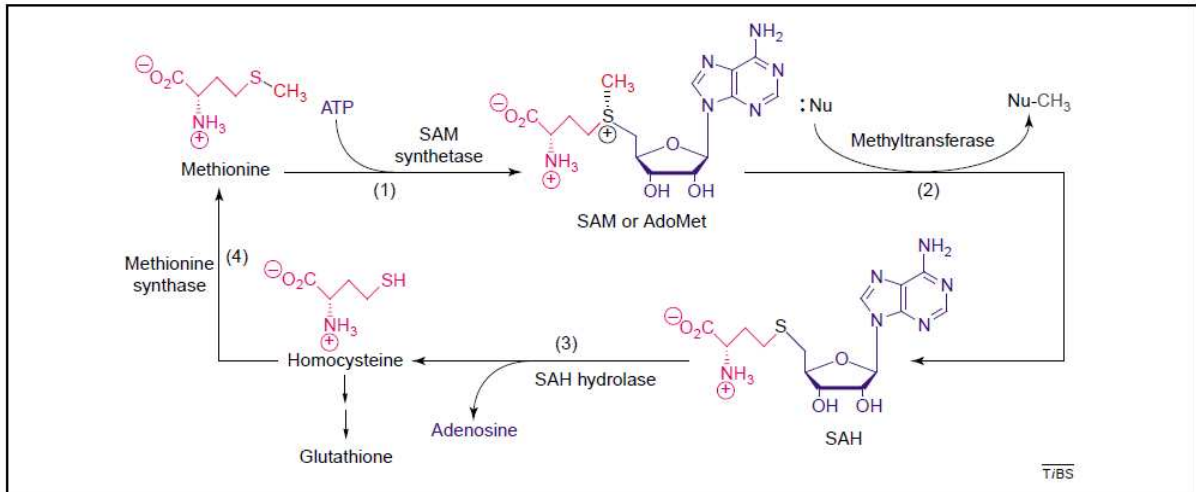


Figure 40. Cycle de la S-adénosylméthionine (SAM)

Nu⁻ représente un substrat nucléophile des méthyltransférases. La SAM est formée à partir de méthionine et d'ATP. Cette réaction est catalysée par la SAM synthase (MetK chez *Escherichia coli* et *Ralstonia solanacearum*) (1) ; des méthyltransférases catalysent le transfert du groupement méthyl de la SAM à des substrats nucléophiles (2) ; la méthionine est régénérée à partir de S-adénosyl-homocystéine par hydrolyse (3) et méthylation de l'homocystéine. Cette méthylation est catalysée par les méthionine synthases MetE ou MetH (4).

(D'après Fontecave *et al.*, 2004)

hydrolysée par la SAH hydrolase en adénosine et homocystéine. L'homocystéine peut alors être de nouveau méthylée pour refaire de la méthionine (Figure 40).

Les processus de méthylation médiés par la SAM sont essentiels chez tous les organismes vivants : la méthylation de l'ADN est cruciale à la régulation de l'expression des gènes et à la réparation de l'ADN après réplication (Low and Casadesús, 2008 ; Marinus and Casadesús, 2009). Le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de gènes impliqués dans la virulence a été particulièrement étudié chez la bactérie entérique *Salmonella enterica*. Il a été montré que chez cette bactérie, l'expression de l'îlot de pathogénie 1 est régulée par méthylation de l'ADN. Il s'agirait en fait d'un contrôle indirect dans lequel la méthylation de l'ADN module l'expression de certains facteurs qui ont pour rôle de stabiliser l'ARN messager de régulateurs transcriptionnels codés par cet îlot de pathogénie (López-Garrido and Casadesús, 2010).

Le rôle de la SAM n'est pas uniquement de fournir des groupements méthyles mais c'est également un donneur d'une grande variété de groupements chimiques. La SAM est notamment un précurseur de la biosynthèse de l'éthylène ou de polyamines telles que la spermine ou la spermidine qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Les polyamines sont capables de se lier à l'ADN et à l'ARN et leur accumulation est nécessaire à la croissance cellulaire et tissulaire (Bachrach, 2010). Chez les plantes, les polyamines sont impliquées dans la résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, dans des processus développementaux (maturation des fruits, développement vasculaire) ou encore dans les mécanismes de défense et la mise en place de la réponse hypersensible (Walters, 2003 ; Vera-Sirera *et al.*, 2010 ; Handa and Mattoo, 2010). La SAM est également impliquée dans des mécanismes de quorum sensing de type AHL, puisqu'elle sert de précurseurs à certains auto-inducteurs (Xavier and Bassler, 2003).

Finalement, la réduction de la concentration intracellulaire en SAM induit une augmentation de l'expression de nombreux gènes *met* et notamment de *metR* (Lamonte and Hughes, 2006). Cette répression est médiée par MetJ (Augustus *et al.*, 2010).

Un lien plus direct entre la biosynthèse de la méthionine et la mise en place de la pathogénie a été mis en évidence chez la bactérie pathogène des animaux, *Pseudomonas aeruginosa*. Chez cette bactérie, la motilité est un élément majeur dans le processus infectieux. Une mutagenèse aléatoire a été réalisée chez *P. aeruginosa* dans le but d'identifier des bactéries non motiles. Cette étude a montré que MetR est impliqué dans le contrôle de la motilité par swarming. De même, un mutant *metH* chez cette bactérie présente une motilité fortement réduite par rapport à la souche sauvage. Pour mieux caractériser le rôle de la biosynthèse de la méthionine et surtout du régulateur MetR, des analyses transcriptomiques ont été effectuées et ont montré que MetR module l'expression de nombreux gènes, dont certains

impliqués dans la virulence et dans le système de sécrétion de type III (Yeung *et al.*, 2009). Il semble donc que le régulateur MetR soit impliqué de manière directe ou indirecte dans de nombreux processus cellulaires et dans le contrôle de certaines fonctions de virulence chez cette bactérie.

L'étude du pouvoir pathogène de mutants auxotrophes pour un acide aminé a souvent supporté l'hypothèse de Garber selon laquelle une déficience nutritionnelle entraîne une perte de la virulence des mutants étudiés (Garber, *et al.*, 1956). En 1974, Coplin et ses collaborateurs ont étudié la virulence de mutants auxotrophes de la bactérie *R. solanacearum*. Leur étude est principalement basée sur la caractérisation d'un mutant auxotrophe pour le tryptophane, mais ils ont également étudié un mutant auxotrophe pour la méthionine et un mutant auxotrophe pour la leucine. Ces trois mutants présentent un pouvoir pathogène très limité sur la tomate par rapport à la souche sauvage. Les résultats sont plus contrastés sur le tabac où seul le mutant auxotrophe pour le tryptophane est très affecté dans sa virulence sur cette plante hôte alors que les mutants auxotrophes pour la méthionine et pour la leucine ne présentent qu'un léger retard dans l'apparition des symptômes. Les auteurs ont corrélé ces phénotypes avec la disponibilité des différents acides aminés dans le xylème de ces deux plantes hôtes expliquant les phénotypes observés par la carence nutritionnelle rencontrée par ces mutants *in planta* (Coplin *et al.*, 1974).

Tableau 8. Identification des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine chez *R. solanacearum*

Les gènes connus chez *E. coli* et *C. glutamicum* comme impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine ont été identifiés chez *R. solanacearum*. Seul le régulateur MetJ ne semble pas avoir d'homologue chez *R. solanacearum*.

Fonction de la protéine	<i>Escherichia coli</i>		<i>Ralstonia solanacearum</i>	
	Gène	Taille (aa)	Gène	Taille (aa)
Homosérine déshydrogénase	<i>metL</i>	810	<i>rsc1327</i>	439
Homosérine o-acétyltransférase	<i>metA</i>	309	<i>rsc0027 (metX)</i>	403
Cystathionine- γ -synthase	<i>metB</i>	386	<i>rsp0781 (metB)</i>	513
O-acétylhomosérine sulfhydrylase	(*)	-	<i>rsc1562</i>	444
Cystathionine- β -lyase	<i>metC</i>	395	<i>rsc1639 (metC)</i>	404
Méthionine synthase B ₁₂ -dépendante	<i>metH</i>	1227	<i>rsc0295 (metHa)</i>	346
			<i>rsc0294 (metHb)</i>	905
Méthionine synthase B ₁₂ -indépendante	<i>metE</i>	753	<i>rsp0676 (metE)</i>	776
5,10 méthylène tetrahydrofolate réductase	<i>metF</i>	296	<i>rsc0091 (metF)</i>	276
S-adenosylméthionine synthase	<i>metK</i>	384	<i>rsc0134 (metK)</i>	396
Activateur de transcription	<i>metR</i>	317	<i>rsp0677 (metR)</i>	304
Répresseur de transcription	<i>metJ</i>	105	-	-

(*) pas d'homologue chez *Escherichia coli* connu, mais homologue à *metY* chez *Corynebacterium glutamicum*

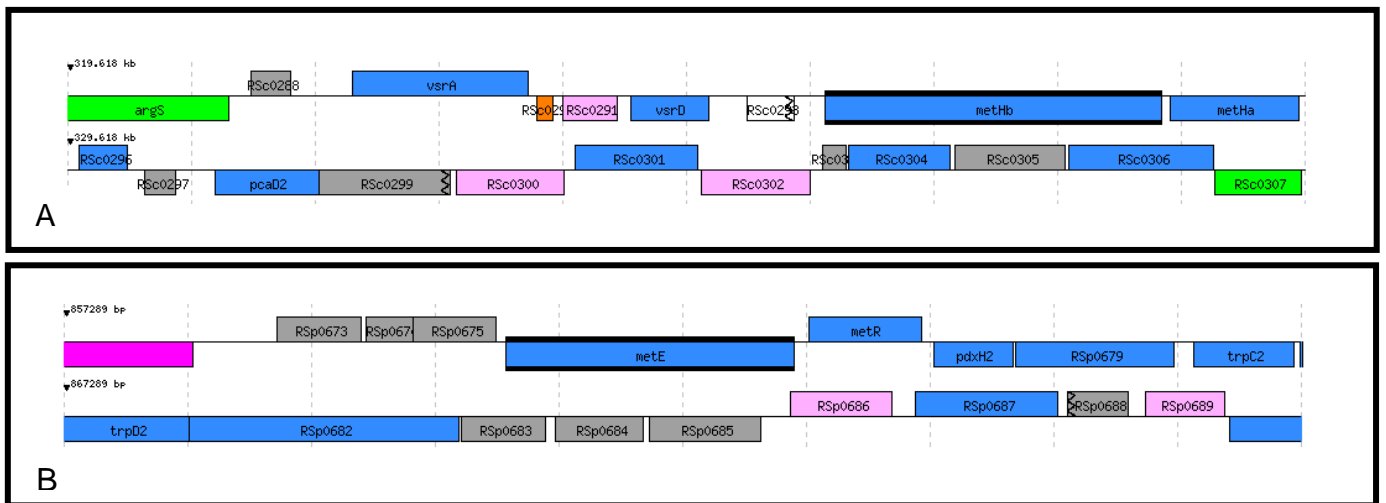


Figure 41. Identification des gènes impliqués dans la dernière réaction de la biosynthèse de la méthionine chez la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*

Les gènes *metHa* et *metHb* (A) codent pour l'enzyme MetH, méthionine synthase cobalamine-dépendante, ils forment un opéron situé sur le chromosome de la souche GMI1000.

Le gène *metE* (B) code pour l'enzyme MetE, méthionine synthase cobalamine-indépendante. Il est situé sur le mégaplasmide de la souche GMI1000. Ce gène est localisé à côté du gène *metR* codant pour le régulateur MetR, régulateur de *metH* et *metE* chez *Escherichia coli*. Ces deux gènes sont transcrits de manière opposée et partagent la même région intergénique. Cette organisation est retrouvée chez *Escherichia coli*.

2. RESULTATS ET DISCUSSION : La biosynthèse de la méthionine chez *Ralstonia solanacearum* : une fonction associée au pouvoir pathogène

2.1 Identification des gènes impliqués dans la biosynthèse de la méthionine chez *Ralstonia solanacearum*

Les différents gènes impliqués dans la biosynthèse de la méthionine et présentés précédemment ont été identifiés dans le génome de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* (Tableau 8). Seul le régulateur MetJ n'a pas d'homologue chez *R. solanacearum*.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la dernière réaction spécifique à la biosynthèse de la méthionine et à sa régulation. Cette dernière étape est catalysée par les enzymes MetE et MetH. De même que chez *E. coli*, le gène codant pour l'enzyme MetE et le gène codant pour le régulateur MetR sont situés côte à côte dans le génome et sont transcrits de manière opposée. C'est donc la même région intergénique qui contient les promoteurs de *metE* et de *metR* (Figure 41). L'enzyme MetH est codée par deux gènes : *metHa* et *metHb* ; ces deux gènes forment un opéron situé sur le chromosome de *R. solanacearum* (Figure 41).

La fonctionnalité de ces gènes et leur rôle dans la biosynthèse de la méthionine ont été vérifiés. Des simples mutants *metE*, *metH* et *metR* ont été générés ainsi que le double mutant *metEmetH*. Seul le double mutant *metEmetH* est auxotrophe pour la méthionine (Figure 42). Ces résultats prouvent que *metE* et *metH* sont impliqués dans la biosynthèse de la méthionine et que ces deux enzymes sont fonctionnellement redondantes et catalysent la même réaction puisque les simples mutants ne sont pas auxotrophes pour la méthionine. Un mutant *metR* n'est pas non plus auxotrophe pour la méthionine, suggérant que le contrôle des gènes *metE* et *metH* par ce régulateur n'est pas total. Ces résultats diffèrent de ce qui est connu chez d'autres bactéries et notamment chez *E. coli*, bactérie chez laquelle un mutant dans le gène *metR* est auxotrophe pour la méthionine (Urbanowski *et al.*, 1987). Il semble donc que le contrôle exercé par MetR sur l'expression des gènes *metE* et *metHab* chez *R. solanacearum* ne soit pas aussi stringent que celui exercé chez *E. coli*, permettant une transcription basale de *metE* ou *metHab* dans un mutant *metR* suffisante pour abolir l'auxotropie pour la méthionine chez ce mutant.

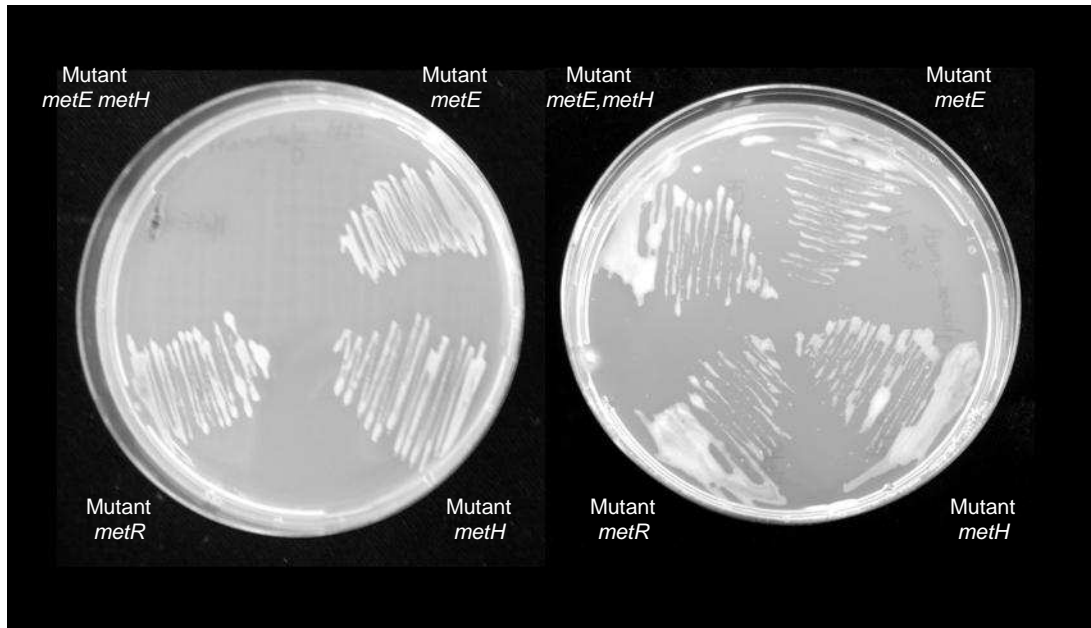


Figure 42. Les gènes *metE* et *metH* sont impliqués dans la biosynthèse de la méthionine chez *Ralstonia solanacearum*

La croissance des mutants simples dans les gènes *metE*, *metH* et *metR* et du double mutant *metEmetH* a été évaluée sur milieu minimum supplémenté avec du glutamate sans méthionine (à gauche) et avec ajout de méthionine à 25 μ M (à droite). Seul le double mutant *metEmetH* est auxotrophe pour la méthionine. L'ajout de méthionine au milieu minimum restaure la croissance de la souche auxotrophe.

Tableau 9. Résultats des analyses transcriptomiques pour les gènes *metR*, *metE*, *metHa* et *metHb*.

Quatre conditions sont présentées : expression dans un mutant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté $\Delta hrpG$ / WT) ; expression dans un mutant surexprimant *hrpG* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté *hrpG* surexp. / WT) ; expression dans un mutant *hrpB* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté *hrpB* :: Ω / WT) et expression dans un mutant surexprimant *hrpB* par rapport à la souche sauvage GMI1000 (noté *hrpB* surexp. / WT). Le résultat est exprimé en \log_2 du ratio des fluorescences (mutant/sauvage), la *p*-value a été calculée par test de Student à partir de six lames d'hybridation. Seules les valeurs ayant un ratio supérieur à 1,5 en valeur absolue et une *p*-value inférieure à 0,05 sont retenues comme significatives. Ces valeurs sont présentées en noir dans le tableau, les valeurs non retenues sont en gris.

(D'après Valls *et al.*, 2006)

Gène	Nom	$\Delta hrpG$ / WT		<i>hrpG</i> surexp. / WT		<i>hrpB</i> :: Ω / WT		<i>hrpB</i> surexp. / WT	
		Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value	Ratio	<i>p</i> -value
<i>rsp0677</i>	<i>metR</i>	0,3	0,46	1,7	0,01	-0,7	0,16	-0,4	0,39
<i>rsp0676</i>	<i>metE</i>	-2,0	0,00	1,5	0,00	0,3	0,80	-0,8	0,00
<i>rsc0294</i>	<i>metHb</i>					1,2	0,06	-0,4	0,13
<i>rsc0295</i>	<i>metHa</i>	0,5	0,60	0,5	0,94	0,4	0,01	-0,4	0,05

2.2 Les gènes *metE* et *metH* sont régulés par *HrpG* via *MetR*

L'expression des gènes *metE* et *metH* est modulée par *HrpG*

Les analyses transcriptomiques effectuées pour déterminer l'intégralité des gènes sous contrôle du régulateur *HrpG* ont montré que le gène *metE* est régulé de manière positive par *HrpG* (Valls *et al.*, 2006). Ce gène est effectivement moins exprimé dans une souche délétée pour le gène *hrpG* par rapport à la souche sauvage et il est nettement induit dans une souche surexprimant le gène *hrpG*. Ce contrôle est indépendant de *HrpB*, puisque dans un mutant disrupté dans le gène *hrpB* l'expression de *metE* est identique à celle mesurée dans la souche sauvage. *metE* fait donc partie des cibles de *HrpG* dont la régulation est *hrpB*-indépendante. Les résultats des analyses transcriptomiques obtenus pour les gènes *metHa*, *metHb* et *metR* sont moins évidents. Les gènes *metHa* et *metHb* ne présentent pas d'expression différentielle entre les souches mutantes pour *HrpG* ou *HrpB* par rapport à la souche sauvage. Le gène *metR* présente une expression différentielle uniquement dans une des conditions étudiées (la surexpression), il n'a donc pas été retenu comme cible de *HrpG* dans la liste établie par Valls *et al.* (2006) (Tableau 9).

Le contrôle des gènes *metE*, *metHa* et *metHb* par *HrpG* a été vérifié par dosage d'activité β -galactosidase. Des fusions *metE* ::*lacZ* et *metH* ::*lacZ* ont été générées et rapportées par recombinaison génomique dans différents fonds génétiques. L'expression de ces gènes a ensuite été mesurée après culture des bactéries en milieu minimum supplémenté avec du glutamate, milieu inducteur de l'activité de *HrpG*. Les résultats obtenus confirment que l'expression de *metE* est contrôlée par *HrpG* indépendamment de *HrpB* puisque l'expression de *metE* dans le fonds génétique disrupté pour *hrpB* est identique à celle mesurée dans le fonds génétique sauvage, alors que dans un mutant Δ *hrpG* l'expression de *metE* est diminuée d'un facteur 10 (Figure 43). L'expression de l'opéron *metH* est également modulée par *HrpG*, puisqu'on observe une diminution d'un facteur trois de l'expression de *metH* dans le mutant *hrpG* par rapport au fonds génétique sauvage. L'expression des deux gènes codant pour les enzymes catalysant la dernière réaction de la biosynthèse de la méthionine est donc contrôlée par *HrpG*.

HrpG* régule l'expression de *metR* qui à son tour module l'expression de *metE* et *metH

L'expression de ces deux enzymes étant contrôlée par le régulateur *MetR* chez de nombreuses bactéries, un mutant de disruption du gène *metR* a été généré et cette mutation a été introduite dans les souches portant les fusions rapportrices dans les gènes *metE* et *metH*. Lorsque les différentes souches sont cultivées en milieu minimum supplémenté avec

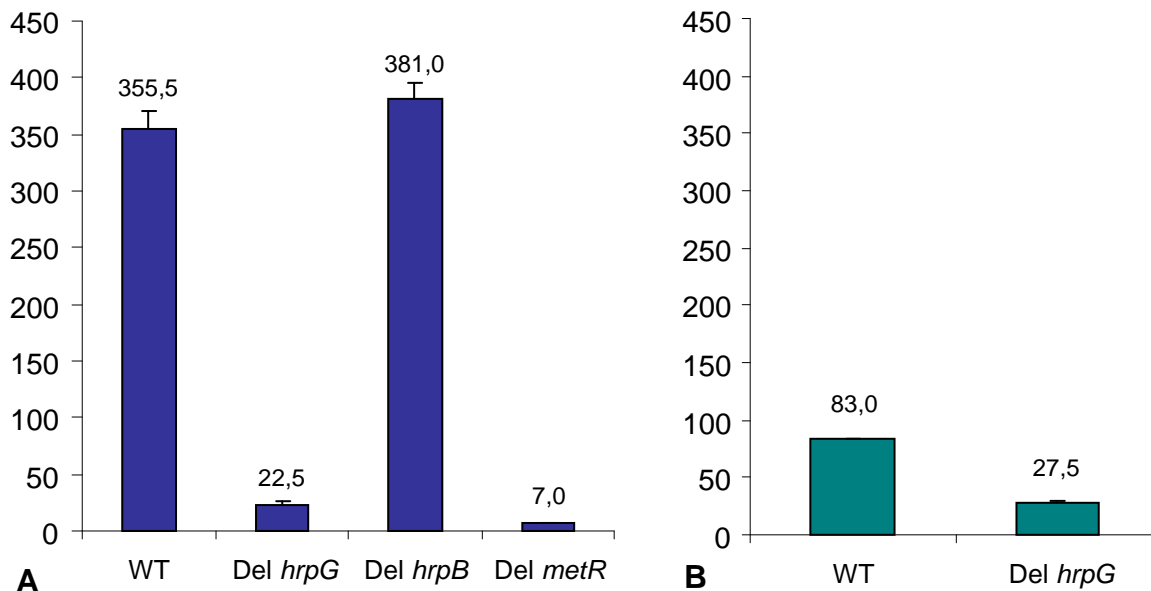


Figure 43. L'expression des gènes *metE* et *metH* est contrôlée par HrpG via MetR chez *Ralstonia solanacearum* en milieu minimum

Des fusions génomiques avec le gène rapporteur *lacZ* ont été générées dans les gènes *metE* (A) et *metH* (B). Ces fusions ont été introduites dans différents fonds génétiques : sauvage (WT), muté pour le gène *hrpG* (Del *hrpG*), muté pour le gène *hrpB* (Del *hrpB*) et muté pour le gène *metR* (Del *metR*). Les différentes souches ont été cultivées en milieu minimum supplémenté par du glutamate et l'activité β -galactosidase de chaque souche a été mesurée. Les résultats sont exprimés en unités de Miller.

A. Mesure de l'activité β -galactosidase pour la fusion rapportrice dans le gène *metE*. L'expression de *metE* est diminuée d'un facteur 10 dans les fonds génétiques mutés pour les régulateurs *hrpG* et *metR*.

B. Mesure de l'activité β -galactosidase pour la fusion rapportrice dans les gènes *metH*. L'expression de l'opéron est diminuée d'un facteur 2 dans les fonds génétiques mutés pour le régulateur *hrpG*. La souche *metH::lacZ* et muté pour le gène *metR* étant auxotrophe pour la méthionine, elle ne peut pas être étudiée en milieu minimum.

<p>GCAGAATA TGAATTCAA TTCAACATTTCTCCAATAATATCATTTGATTCATGGCAGGC CGTCGCCCATCATCGCAGCACTTTCTAAACCGACCGGCATCATGACGACCATCCATACC</p>
<p>GCAGTTGCA TGATTGCA TCAACGTGAGGGGGTGATTGCAATTATAGGAGCGCGGCTCCC GGCAATGCCGTCAAGTCCTTGATGCGACTGGTAAAATTCGCCTTTGGCCGCAAATTCGA TCGCTTGCCCGGCCAACCTATCGGAGTCCTCCATGACCGCGCCCCTGCCCTACACCCGT</p>

Figure 44. Identification de la séquence promotrice reconnue par MetR dans les promoteurs de *metE* et *metH*

La séquence promotrice reconnue par le régulateur MetR a été identifiée chez *E. coli* : TGAannt/anntTCA. Cette séquence est retrouvée dans le promoteur du gène *metE* (encadré supérieur) et une séquence dégénérée est retrouvée dans le promoteur de l'opéron *metH* (encadré inférieur). La séquence codante est présentée en gras.

du glutamate, on observe un même profil de transcription qu'avec le mutant *hrpG*, c'est-à-dire une diminution d'un facteur 16 pour l'expression de *metE* (Figure 43). En revanche un double mutant *metHmetR* est auxotrophe pour la méthionine, il est donc impossible de déterminer l'impact de MetR sur le contrôle de l'expression de *metH* en milieu minimum. La région promotrice reconnue par MetR a été identifiée dans le promoteur de *metE* et un motif dégénéré a été identifié dans le promoteur de *metH*, cependant sa fonctionnalité n'a pas été vérifiée (Figure 44). Ces résultats montrent également que *metE* est exprimé plus fortement que *metH* en milieu minimum et que le contrôle exercé par MetR sur ce gène est très important. Le fait qu'un double mutant *metHmetR* soit auxotrophe pour la méthionine alors qu'un simple mutant *metR* ne l'est pas suggère que l'expression de *metH* n'est que partiellement contrôlée par MetR et que l'expression de *metH* dans un mutant *metR* est suffisante pour abolir l'auxotrophie de ce mutant pour la méthionine.

Finalement, les analyses de co-expression chez *E. coli* présentées précédemment ont permis de montrer que le gène *metR* est une cible directe de HrpG, ce qui n'est pas le cas du gène *metE*. HrpG régule donc de manière directe et indépendamment de HrpB l'expression de *metR*; MetR régule sans doute directement l'expression de *metE*. Il est très probable que MetR soit également le régulateur de *metH* puisque l'expression de *metH* est modulée par HrpG et que HrpG régule directement l'expression de *metR*, suggérant donc que la modulation de l'expression de *metH* est sans doute médiée par MetR.

L'induction de l'expression du gène metE en présence de cellules végétales ne dépend que partiellement de HrpG

De manière assez surprenante, l'étude de l'expression des gènes *metE* et *metH* en présence de cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana* ne montre qu'une influence partielle de HrpG sur l'expression de ces gènes (Figure 45). Pourtant, HrpG étant induit et actif en présence de cellules végétales, l'expression de *metE* et *metH* dans un mutant *hrpG* devrait être fortement réduite en présence de cellules végétales par rapport à leur expression dans un fonds génétique sauvage. En fait on observe bien une induction de l'expression de ces gènes en présence de cellules végétales par rapport au milieu minimum puisque la transcription de *metE* est induite d'un facteur 3 par rapport au milieu minimum (356 unités de Miller en milieu minimum pour 837 en présence de cellules végétales), mais cette induction en présence de cellules végétales n'est pas uniquement due à l'induction de HrpG : l'expression de *metE* dans un mutant $\Delta hrpG$ en présence de cellules végétales reste relativement élevée (203 unités de Miller). En revanche l'expression de *metE* est entièrement abolie dans un fonds génétique disrupté pour le gène *metR* par rapport au fonds génétique sauvage (Figure 45).

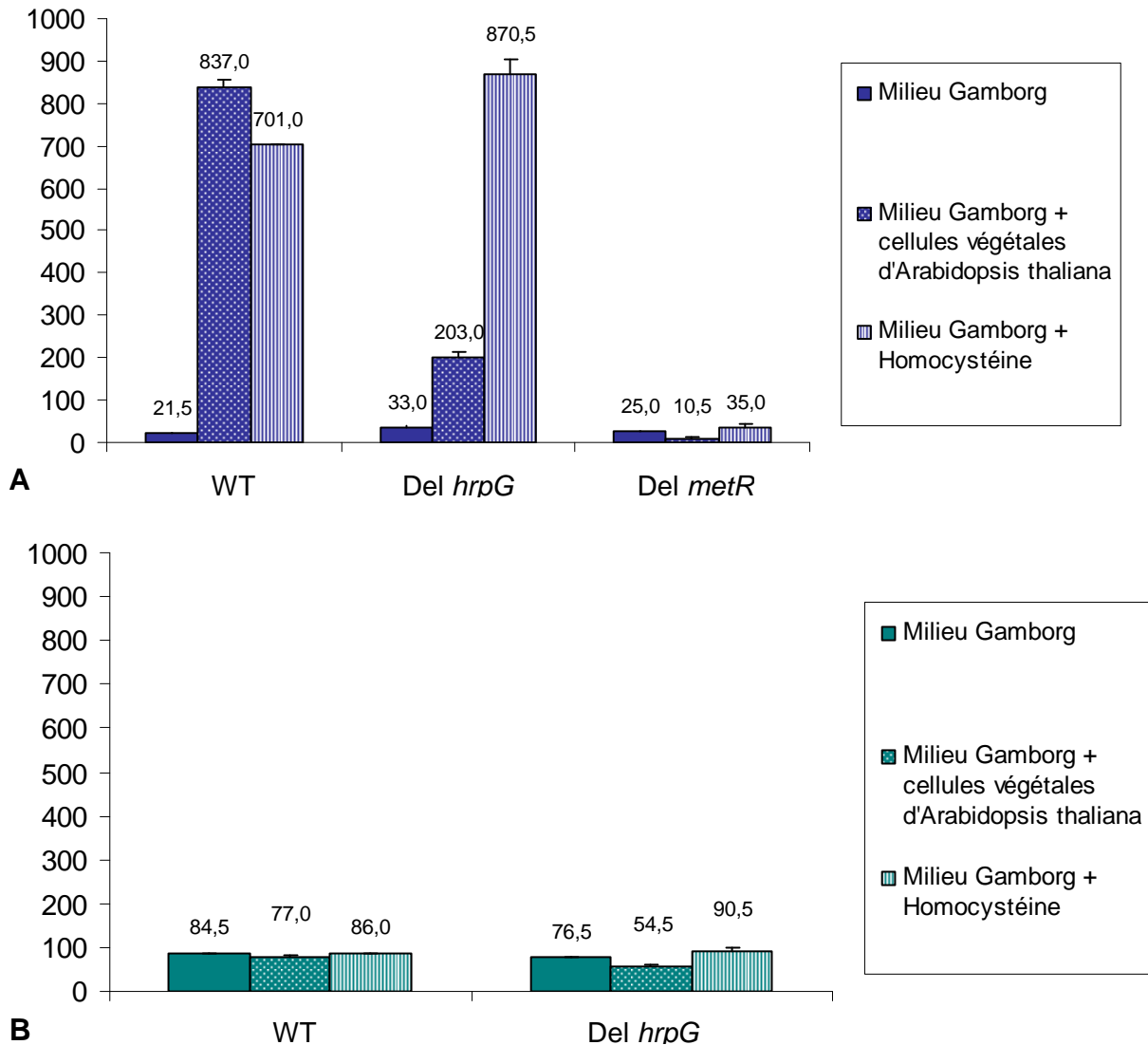


Figure 45. MetR constitue un nœud de régulation intégrant les signaux perçus par HrpG mais également d'autres signaux tels que l'homocystéine

Les souches portant des fusions rapportrices dans les gènes *metE* et *metHab* ont été cultivées en milieu Gamborg (milieu de culture des cellules végétales), en milieu Gamborg contenant des cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana* et en milieu Gamborg supplémenté avec de l'homocystéine à une concentration finale de 100 μ M. L'activité β -galactosidase de chaque souche cultivée dans chaque milieu a été mesurée. Les résultats sont exprimés en unités de Miller.

A. Mesure de l'activité β -galactosidase pour la fusion rapportrice dans le gène *metE*. L'expression de *metE* est induite par la présence de cellules végétales et par l'addition d'homocystéine au milieu de culture. L'intégration de ces deux signaux est réalisée par MetR.

B. Mesure de l'activité β -galactosidase pour la fusion rapportrice dans les gènes *metHab*. L'expression de l'opéron n'est pas modulée significativement par la présence de cellules végétales ni par l'addition d'homocystéine dans le milieu de culture.

Concernant l'expression de l'opéron *metHab*, très peu d'effets sont observés entre les différents fonds génétiques et les différents milieux.

MetR constitue par conséquent un autre nœud de régulation capable d'intégrer différents signaux. MetR intègre les deux signaux apportés par HrpG : l'induction en réponse au signal métabolique du milieu minimum et l'induction en réponse au signal plante. Les données d'expression obtenues en présence de cellules végétales indiquent que d'autres signaux sont intégrés par MetR.

MetR intègre le signal « homocystéine » à la régulation du gène *metE*

L'homocystéine est un co-activateur connu de MetR pour l'expression de *metE* (Urbanowski and Stauffer, 1989). Nous avons vérifié que l'homocystéine induit bien l'expression de *metE* et que cette induction est médiée par MetR indépendamment de HrpG. Les résultats obtenus indiquent que les niveaux d'expression de *metE* en présence de cellules végétales et dans le milieu de culture des cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana* (milieu Gamborg) supplémenté avec de l'homocystéine sont identiques et présentent des profils similaires : l'expression de *metE* est induite en présence de cellules végétales et en présence d'homocystéine. Cette induction est indépendante de HrpG mais dépend intégralement de MetR (Figure 45). Il semble donc que les cellules végétales produisent de l'homocystéine induisant encore d'avantage l'expression de *metE*.

Ces résultats concordent avec les données de la littérature : l'expression du gène *metH* est peu sensible à la présence ou non d'homocystéine, et c'est pourquoi l'expression de ce gène est identique dans les trois milieux étudiés : milieu Gamborg, Gamborg supplémenté avec de l'homocystéine et Gamborg avec des cellules végétales d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 45B). Finalement ces données concordent également avec les observations d'auxotrophie sur les différents mutants. En effet, ces résultats expliquent le fait que seul le double mutant *metEmetH* soit auxotrophe pour la méthionine : bien que MetR contrôle l'expression des deux gènes, l'expression de *metH* n'est sans doute que partiellement modulée par MetR ; ainsi, dans un mutant *metR*, l'expression de *metH* n'est pas entièrement abolie, cette expression résiduelle est suffisante pour qu'un mutant *metR* ne soit pas auxotrophe pour la méthionine. En revanche la double mutation de *metR* et *metH* entraîne l'auxotrophie de la bactérie pour la méthionine puisque le contrôle de l'expression de *metE* par MetR est très stringent. L'expression de *metE* dans un mutant *metR* étant entièrement abolie, un double mutant *metHmetR* est ainsi équivalent à un double mutant *metEmetH*. Par ailleurs, le fait que le double mutant *hrpGmetH* ne soit pas auxotrophe pour la méthionine suggère que le contrôle de HrpG sur *metR* n'est pas total et que l'expression de ce régulateur répond à d'autres facteurs non déterminés.

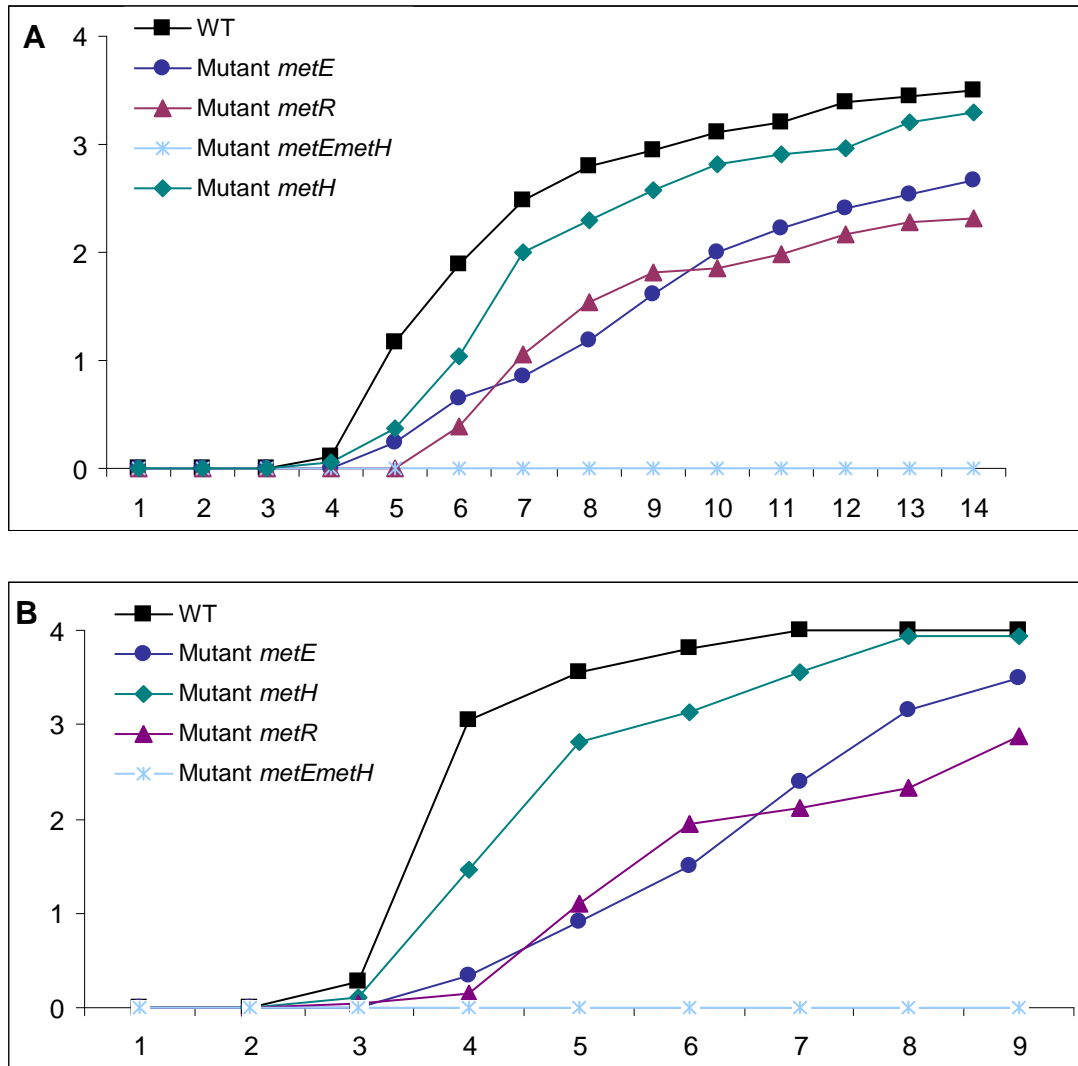


Figure 46. Les gènes de biosynthèse de la méthionine sont impliqués dans la mise en place du processus infectieux de *R. solanacearum*

Des tests de pouvoir pathogène sur tomate *Lycopersicon esculentum* cv. Marmande ont été effectués avec des souches mutantes dans les gènes *metE*, *metH*, *metR*, et le double mutant *metEmetH*. Les données sont représentatives de trois tests indépendants.

A. Test de pouvoir pathogène par arrosage. Pour chaque souche 24 plants de 4 semaines ont été utilisés, chaque plant est arrosé avec 50 mL d'une solution bactérienne à 10^7 CFU/mL.

B. Test de pouvoir pathogène par injection dans la tige. Pour chaque souche 12 plants de 4 semaines ont été utilisés, 20 μ L d'une suspension bactérienne à 10^6 CFU/mL ont été injectés dans la tige de chaque plant de tomate.

Dans les deux cas, l'apparition des symptômes est évaluée par une note de 0 à 4 (0 en l'absence de symptômes et 4 pour un plant entièrement flétri). Les graphiques représentent la moyenne des notes des plants pour chaque souche, en fonction des jours après infection. Les deux types de tests effectués montrent que seul le double mutant *metEmetH* est entièrement avirulent. Les mutants *metE* et *metR* présentent une agressivité réduite par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *metH* est le moins affecté dans son pouvoir pathogène.

Nous avons confirmé que la dernière étape de la biosynthèse de la méthionine est contrôlée par HrpG, le régulateur central de la virulence chez *R. solanacearum* par activation transcriptionnelle du régulateur MetR. Nous avons également montré que l'expression des gènes *metE* et *metH* répond à un contrôle complexe intégrant plusieurs signaux. Plusieurs de ces signaux sont inhérents à la présence de cellules végétales : le signal plante médié par HrpG et la présence d'homocystéine perçue au niveau du régulateur MetR. Nous avons donc voulu évaluer ensuite le rôle et l'impact de la biosynthèse de la méthionine dans la mise en place du processus infectieux.

2.3 Implication des gènes *metE* et *metH* dans le pouvoir pathogène

Les différents mutants dans les gènes *metE*, *metHab* et *metR* ainsi que le double mutant *metEmetH* ont été testés pour leur capacité à induire la maladie. Des tests de pouvoir pathogène ont été réalisés sur la tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Marmande, par arrosage et par injection directement dans la tige d'une suspension bactérienne des différents mutants.

La biosynthèse de la méthionine est nécessaire pour la virulence complète de la bactérie

Les résultats obtenus par arrosage et par injection présentent des profils similaires (Figure 46). Le simple mutant *metHab* n'est que faiblement atténué dans son pouvoir pathogène alors que chez les mutants *metE* et *metR*, le retard dans l'apparition des symptômes est plus important et leur intensité est plus fortement diminuée par rapport à ceux induits par la souche sauvage. Finalement, le double mutant *metEmetH* est entièrement avirulent.

Ces résultats concordent avec les données de régulation établies précédemment. Le gène *metE* est plus fortement exprimé que les gènes *metHab* ce qui peut expliquer la différence de phénotypes observés entre les deux simples mutants. De plus, l'expression du gène *metE* est fortement induite en présence de cellules végétales et par l'homocystéine, ce qui n'est pas le cas des gènes *metHab*. Finalement, MetH est une méthionine synthase cobalamine-dépendante, contrairement à MetE qui est une méthionine synthase cobalamine-indépendante. La cobalamine (également appelée vitamine B12) n'est pas naturellement présente chez les végétaux (Oltean and Banerjee, 2003), il n'y a donc pas d'induction particulière de l'activité de l'enzyme MetH dans la plante. La cobalamine est également

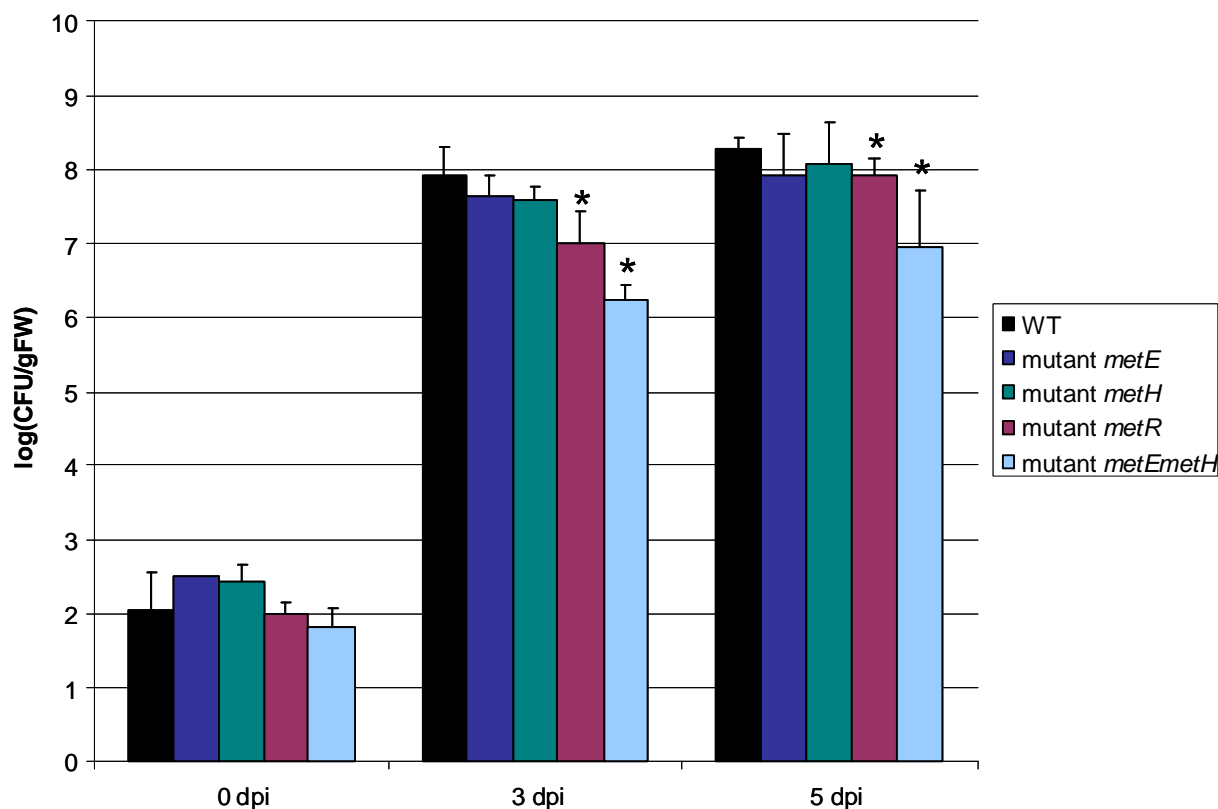


Figure 47. Croissance *in planta* des mutants dans les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine

Détermination de la croissance bactérienne *in planta* des simples mutants *metE*, *metH*, *metR*, du double mutant *metEmetH* et de la souche sauvage GMI1000 (WT). Des plants de tomate *Lycopersicon esculentum* cv. Marmande ont été inoculés avec les différentes souches par injection dans la tige de 20 μ L d'une suspension bactérienne à 10^6 CFU/mL. Les tiges ont été coupées 0, 3 et 5 jours après infection (DPI) et les bactéries ont été récupérées par diffusion. Des étalements et dénombrements bactériens ont permis d'estimer la quantité de bactéries présentes dans la plante. Les résultats sont exprimés en Log_{10} du nombre de colonies par gramme de matière fraîche ($\text{log}(\text{CFU/gFW})$) ; ils représentent la moyenne des résultats obtenus sur trois plants indépendants. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les mesures obtenues pour ces trois plants. Les étoiles représentent les valeurs significativement différentes de la valeur obtenue pour la souche sauvage selon un Test de Student (p -value < 0,05).

connue pour inhiber la transcription de *metE* (Weissbach and Brot, 1991) ; il semble donc que dans la plante plusieurs éléments soient réunis pour induire l'expression de l'enzyme MetE par rapport à MetH contribuant à la différence de phénotypes observés entre les mutants *metE* et *metH*.

Pour le régulateur MetR, celui-ci contrôle l'expression de *metE* et seulement en partie des gènes *metHab*, ces données peuvent expliquer son phénotype comparable à celui du mutant *metE*, aussi bien en injection dans la tige que par arrosage (Figure 46). Enfin le phénotype avirulent du double mutant *metEmetH* peut être expliqué, dans le cas des tests de pouvoir pathogène par arrosage, par l'auxotrophie de cette souche pour la méthionine. Il est en effet probable que dans la terre la méthionine ne soit pas suffisamment disponible pour que cette souche puisse se développer et atteindre efficacement les racines de la plante, pouvant ainsi expliquer l'absence totale de symptômes de flétrissement.

L'absence de croissance bactérienne in planta n'explique pas la diminution de l'agressivité des mutants *metE* et *metR*

La concentration en méthionine dans l'apoplaste de la tomate a été déterminée à 24,9 μM (Rico and Preston, 2008). Nous avons vérifié qu'*in vitro*, en milieu minimum, l'ajout de 24,9 μM de méthionine dans le milieu permet de restaurer la croissance du double mutant *metEmetH* (Figure 42). Cependant, très peu de données sont disponibles concernant la composition du xylème et la concentration en méthionine dans ce milieu n'est pas connue. Le xylème est décrit comme un environnement relativement pauvre en nutriments (Bialczyk and Lechowski, 1995) mais la multiplication de *R. solanacearum* dans ce tissu est extrêmement forte. Nous avons, par conséquent, cherché à déterminer si la bactérie est capable de se développer dans ce milieu pour exclure totalement le rôle de l'auxotrophie dans l'absence de symptômes. La croissance bactérienne *in planta* a été évaluée après injection de 20 μL d'une suspension bactérienne à 10^6 CFU/mL dans des tiges de tomate *Lycopersicon esculentum* cv. Marmande. Les bactéries ont ensuite été récupérées à différents temps après l'inoculation et des étalements sur milieu complet nous ont permis de déterminer la croissance des bactéries *in planta* (Figure 47). Ces résultats montrent que toutes les souches sont capables de se développer dans la plante.

Des tests statistiques ont permis de mettre en évidence que la croissance du mutant *metH* dans la plante n'est pas significativement différente de celle mesurée pour la souche sauvage. De la même manière la croissance d'un mutant *metE* est identique à la croissance de la souche sauvage dans la plante. Seul le mutant *metR* et le double mutant *metEmetH* montre une croissance significativement différente de celle mesurée avec la souche sauvage GMI1000. Nous avons vu précédemment que le pouvoir pathogène des souches mutantes

metE et *metR* sont très proches. Pourtant la croissance de ces deux mutants *in planta* n'est pas identique et la croissance d'un mutant *metR* est affectée par rapport à celle d'un mutant *metE*. Cette différence peut s'expliquer par le fait que *metR* régule l'expression de *metE* et partiellement de *metH*. La biosynthèse de la méthionine dans le mutant *metR* est donc plus affectée que dans le mutant *metE*. Cette différence de croissance entre les mutants *metE* et *metR* n'est cependant pas suffisante pour avoir une influence notable sur la cinétique d'apparition des symptômes mesurée par les tests de pouvoir pathogène. Finalement, la croissance du double mutant *metEmetH* est celle qui présente le retard le plus important. Cependant, les résultats obtenus montrent que ce double mutant, en dépit de son auxotrophie pour la méthionine, est capable de se développer dans la plante, indiquant que le taux de méthionine dans les tissus conducteurs n'est pas en concentration limitante. Il semble donc peu probable que l'absence totale de l'apparition de symptômes provoquée par ce mutant, lorsqu'il est injecté dans la tige, soit entièrement imputable à son auxotrophie.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : Vers la détermination fonctionnelle du rôle de la méthionine dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*

La méthionine est un acide aminé impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Chez *R. solanacearum*, la biosynthèse de cet acide aminé est modulée par le régulateur central de la pathogénie, HrpG. Ce lien direct entre un activateur central du T3SS et une voie métabolique n'a pas encore été décrit chez les bactéries phytopathogènes et suggère que la méthionine est impliquée dans la mise en place du pouvoir infectieux de *R. solanacearum*. De plus, d'après les analyses transcriptomiques, HrpG ne contrôle pas l'expression d'autres voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse d'acides aminés.

Les études précédentes menées chez *R. solanacearum* et chez d'autres bactéries phytopathogènes ont porté principalement sur des souches bactériennes auxotrophes pour un acide aminé. Tous ces travaux concordent pour expliquer que l'avirulence de ces souches bactériennes sur leurs hôtes respectifs est due à une carence nutritionnelle *in planta* où la disponibilité en acide aminé n'est pas suffisante pour abolir l'auxotrophie de ces mutants et permettre une croissance bactérienne chez l'hôte suffisante pour la mise en place du processus infectieux. Dans ses travaux de 1974, Coplin et ses collaborateurs ont mis en évidence que des mutants de *R. solanacearum* auxotrophes pour la méthionine et d'autres pour la leucine sont capables de se multiplier dans la tomate lorsqu'ils sont injectés directement dans la tige. Ces mutants sont également capables de coloniser la plante au-delà du point d'infection. Cependant les auteurs expliquent quand même l'hypoagressivité de ces mutants par une carence nutritionnelle en méthionine et en leucine dans la plante. Dans notre cas, le double mutant *metEmetH* est le seul mutant auxotrophe dont le pouvoir pathogène a été étudié. Les données obtenues montrent que ce mutant est totalement avirulent, cependant la croissance bactérienne de ce mutant *in planta* n'est pas nulle mais présente un retard par rapport à la souche sauvage GMI1000 ; ce retard de croissance semble néanmoins peu satisfaisant pour expliquer l'avirulence complète de cette souche.

De plus l'étude de mutants impliqués dans la voie de biosynthèse de la méthionine mais non auxotrophes pour la méthionine tels que les mutants *metE*, *metH* et *metR* apporte des informations supplémentaires par rapport à l'étude de Coplin et ses collaborateurs, qui avaient étudiés uniquement des mutants auxotrophes. Nos résultats montrent qu'en dépit d'une croissance bactérienne identique à celle de la souche sauvage GMI1000, le mutant *metE* est affecté dans son pouvoir pathogène. L'hypoagressivité de ce mutant ne peut pas

être expliquée par une inhibition de la croissance *in planta* due à une carence en méthionine dans la plante.

Le rôle précis de la méthionine et de la dernière étape de la biosynthèse de la méthionine dans la mise en place du processus infectieux n'est pas encore défini et plusieurs hypothèses peuvent être considérées.

La dernière étape de la biosynthèse de la méthionine consiste en la méthylation de l'homocystéine ; l'homocystéine est un co-activateur du régulateur MetR. Lorsque cette dernière étape ne peut pas avoir lieu ou a lieu de manière limitée, c'est-à-dire lorsque les gènes codant pour les enzymes MetE ou MetH sont délétés, l'homocystéine est accumulée dans la cellule bactérienne. Il a été démontré chez *E. coli* que l'homocystéine présente un effet toxique et inhibe la croissance bactérienne. Cette toxicité est due à une perturbation de la biosynthèse des acides aminés ramifiés (Tuite *et al.*, 2005). Les mutants de la voie de biosynthèse de la méthionine chez *R. solanacearum* ont une croissance similaire à celle de la souche sauvage *in vitro*. Il semble donc que la concentration intracellulaire en homocystéine ne soit pas assez élevée pour présenter un effet toxique chez les mutants *metE*, *metH* ou *metR*. Peu de données sont connues quant à la concentration en homocystéine dans la plante. Il est possible que si cette concentration est élevée, les mutants *metE* et *metR* ne puissent pas détoxifier suffisamment l'homocystéine d'où leur retard dans la mise en place de la maladie. Cependant, les résultats de croissance bactérienne *in planta* ne soutiennent pas cette hypothèse puisque le mutant *metE* présente une croissance comparable à celle de la souche sauvage. Ainsi même si l'homocystéine est présente dans la plante, sa toxicité ne semble pas être la cause des phénotypes observés.

Le retard dans l'apparition des symptômes provoqués par les mutants *metE*, *metH* et *metR* n'étant pas uniquement due à une inhibition de la croissance *in planta*, il est possible que la méthionine soit impliquée dans des processus de mise en place de la virulence. Nous avons vu que la méthionine est un acide aminé important et impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Une hypothèse à soulever dans le cas de *R. solanacearum* est son rôle de précurseur dans la biosynthèse d'éthylène bactérien. Les analyses transcriptomiques effectuées sur HrpG ont montré que le gène, *efe*, codant pour l'enzyme impliquée dans la synthèse de l'éthylène est également contrôlé par ce régulateur (Valls *et al.* 2006). Nous avons de plus montré que ce contrôle de HrpG sur *efe* est un contrôle direct. La co-régulation de *metR* et *efe* par HrpG peut ainsi suggérer un lien entre ces deux voies. Des dosages d'éthylène produit par des mutants *metE* et *metR* nous permettront de déterminer si ces mutants sont affectés dans la biosynthèse d'éthylène. Cependant, même si le lien entre la biosynthèse de la méthionine et celle de l'éthylène est vérifié, il est fort probable que la

méthionine soit également impliquée dans d'autres processus de virulence puisqu'un mutant dans le gène *efe* n'est pas affecté dans son pouvoir pathogène sur *Arabidopsis thaliana* et sur la tomate (Valls *et al.*, 2006). Cependant, des analyses plus fines de compétition entre souches co-inoculées *in planta* ont montré récemment que le gène *efe* contribue à l'aptitude parasitaire de *R. solanacearum* sur aubergine (Macho *et al.*, 2010).

La méthionine est également un précurseur pour la biosynthèse de polyamines et certaines enzymes de la voie de biosynthèse des polyamines sont également induites par HrpG ; il se peut donc que des mutants *metE* et *metR* soient également affectés dans leur capacité de biosynthèse de polyamines. En revanche le rôle des polyamines bactériennes dans la mise en place du pouvoir pathogène ou dans l'adaptation *in planta* n'a pas été mis en évidence.

D'autres hypothèses sont également envisageables. Il a été montré que la méthionine via la SAM (S-adénosyl-méthionine) est impliquée dans des mécanismes de quorum-sensing de type AHL (Xavier and Bassler, 2003). Chez *R. solanacearum*, la dernière étape de la biosynthèse du 3-OH-PAME, molécule du quorum sensing endogène de *R. solanacearum*, est catalysée par PhcB, une méthyltransférase SAM-dépendante. Il est donc possible qu'un mutant *metE* soit affecté également dans ses capacités de communication intercellulaire.

De manière originale, la biosynthèse de la méthionine est partiellement contrôlée par le régulateur central de la pathogénie chez *R. solanacearum*, suggérant un lien entre la mise en place de la maladie et la biosynthèse de la méthionine. La biosynthèse de la méthionine est la seule voie de biosynthèse d'acides aminés contrôlée par HrpG selon les analyses transcriptomiques (Valls *et al.*, 2006). Nous avons effectivement pu montrer que des mutants *metE* et *metR* sont affectés dans leur capacité à induire des symptômes de flétrissement sur tomate et nous avons montré que cette hypoagressivité n'est pas due à une diminution de la croissance bactérienne *in planta*. La détermination du rôle de cette voie de biosynthèse permettra sans doute de mettre en évidence des fonctions d'adaptation de la bactérie aux conditions végétales ou des fonctions plus directement impliquées dans le processus infectieux.

Tableau 10. Souches et plasmides utilisés dans le Chapitre III des Résultats

Nom	Génotype	Référence/Source
<i>E. coli</i>		
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ</i></i>	Invitrogen
<i>R. solanacearum</i>		
GMI1000	Souche sauvage	Salanoubat <i>et al.</i> , 2002
GMI1525	GMI1000 avec insertion Ω dans le gène <i>hrpB</i> , Sp ^R	Genin <i>et al.</i> , 1992
GMI1690	GMI1000 avec fusion rapportrice <i>lacZ</i> dans l'opéron <i>metHab</i> , Gm ^R	Cette étude
GMI1754	GMI1000 avec fusion rapportrice <i>lacZ</i> dans le gène <i>metE</i> , Gm ^R	Cette étude
GMI1755	GMI1000 Δ <i>hrpG</i>	Valls <i>et al.</i> , 2006
GMI1780	GMI1000 avec insertion Tn5 dans l'opéron <i>metHab</i> , Km ^R	Cette étude
GMI1781	GMI1000 avec insertion Ω dans le gène <i>metE</i> , Sp ^R	Cette étude
GMI1782	GMI1780 avec insertion Ω dans le gène <i>metE</i> , Km ^R Sp ^R	Cette étude
GRS512	GMI1000 avec insertion Ω dans le gène <i>metR</i> , Sp ^R	Cette étude
Plasmide		
pBluescript KS(+)	Vecteur de clonage, Ap ^R	Stratagene
pGEM-T	Vecteur de clonage, Ap ^R	Promega
pCZ367	Vecteur dérivé de pUC18 utilisé pour réaliser les fusions rapportrices <i>lacZ</i> , Ap ^R Gm ^R	Cunnac <i>et al.</i> , 2004
pLP45	pGEM-T avec insertion de la cassette Ω entre un fragment amont de 950 pb et un fragment aval de 1 kb du gène <i>metE</i> , Ap ^R Sp ^R	Cette étude
pLP71	pBluescript KS(+) ^R avec insertion de la cassette W dans un fragment de 1,6 kb contenant le gène <i>metR</i> , Ap ^R Sp ^R	Cette étude

4. MATERIELS ET METHODES

4.1 Matériels

Matériel microbien et conditions de croissance

Les souches et les plasmides utilisés au cours de cette étude sont décrits dans le tableau 10. Le matériel microbien et les conditions de culture utilisées sont présentés dans le chapitre précédent. La méthionine utilisée pour compléter le milieu minimum est de la L-méthionine, elle est utilisée à 25 μ M final. L'homocystéine est ajoutée à une concentration finale de 100 μ M.

Matériel végétal et co-cultures cellules végétales/bactéries

Les suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana* At-202 (accession Col-0) sont cultivées dans du milieu Gamborg B5 (Flow laboratories). Pour les co-cultures cellules végétales/bactéries, 10 mL de cellules d'*Arabidopsis* sont inoculées avec *R. solanacearum*. Après 16 h de co-culture à 28°C les cellules bactériennes sont récupérées par filtration.

4.2 Constructions génétiques

Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes standards de biologie moléculaire sont utilisées (Ausubel *et al.*, 1998). Les plasmides sont introduits dans *E. coli* et *R. solanacearum* par électroporation. Les intégrations stables dans le génome de *R. solanacearum* se font par double recombinaison homologue. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) et sont analysées sur un séquenceur automatique à capillaires de type ABI3730.

Génération des mutants *metE*, *metH* et *metR*

Le mutant *metH* a été généré par une mutagenèse aléatoire du génome de *R. solanacearum* GMI1000 en utilisant le kit EZ-Tn5<KAN-2> (Epicentre Technologies). La zone d'intégration du transposon est identifiée par PCR et séquençage.

Les mutants *metE* et *metR* ont été générés par insertion de la cassette Ω (Prentki and Krisch, 1984). Un fragment amont de 950 pb contenant une partie du gène *metE* a été amplifié avec les amorces *metE*-Xba (5'-TCTAGAGGATCTCGAAGCGGAACAG-3') et *metE*-

HindUP (5'-AAGCTTGGTCATTTCCATGGCC-3') ; un fragment de 1 kb aval contenant une partie du gène *metE* a été amplifié avec les amorces metE-HindDW (5'-AGCTTCCGCGAGGGCCTGCCG-3') et metE-Not (5'-GCGGCCGCGGCGACATCCACG-3'). Le fragment amont a été cloné dans un vecteur pGEM-T (Promega) ; le second fragment a ensuite été introduit en aval du premier fragment par digestion HindIII / NotI. Le plasmide formé par les deux fragments clonés côte à côte a été digéré par HindIII pour insertion de la cassette Ω . Le plasmide obtenu, pLP45 est linéarisé par digestion XbaI et utilisé pour transformer *R. solanacearum* GMI1000 et différents mutants. Les événements de recombinaison sont sélectionnés par résistance à la spectinomycine apportée par la cassette Ω et vérifiés par PCR.

Un fragment de 1,6 kb contenant le gène *metR* a été amplifié en utilisant les amorces oLP68 (5'-TTCGCGCACCTCGTCAACA-3') et oLP71 (5'-GCGCCCCGCGTTCTGGAC-3') et cloné dans un vecteur pBluescript KS(+) (Stratagene). La cassette Ω a été insérée au site unique EcoRV. Le plasmide obtenu pLP71 est linéarisé par PstI et utilisé pour transformer *R. solanacearum* GMI1000 et différents mutants. Les événements de recombinaison sont sélectionnés par résistance à la spectinomycine apportée par la cassette Ω et vérifiés par PCR.

Génération des fusions rapportrices dans les gènes *metE* et *methH*

Les fusions rapportrices *lacZ* ont été réalisées avec le plasmide pCZ367 (Cunnac *et al.*, 2004). Des fragments internes des gènes *metE* et *methH* ont été amplifiés et clonés dans le pCZ367 (P. Boistard, non publié). Ces constructions ont été utilisées pour transformer *R. solanacearum* GMI1000 et différents mutants. Les événements de recombinaison ont été sélectionnés par résistance à la gentamycine apportée par le pCZ367.

4.3 Tests sur plantes

Tests de pouvoir pathogène par arrosage et par injection dans la tige

Les tests de pouvoir pathogène par arrosage sont réalisés sur des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande) âgés de quatre semaines avec une suspension bactérienne de 10^7 bactéries/mL. 50 mL de suspension bactérienne sont utilisés par plant. Pour chaque test, 24 plants sont utilisés par souche.

Les tests de pouvoir pathogène par injection dans la tige sont réalisés sur des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande) âgés de quatre semaines avec une

suspension bactérienne de 10^6 bactéries/mL. 20 μ L de suspension bactérienne sont injectés par plant. Pour chaque test, 12 plants sont utilisés par souche.

Dans les deux cas, l'apparition des symptômes est évaluée quotidiennement pour chaque plant par une note sur 4 de la manière suivante : 0 pour un plant ne présentant aucun symptôme de flétrissement, 1 pour un plant présentant 25% de flétrissement, 2 pour un plant à moitié flétri, 3 pour un plant flétri à 75% et 4 pour un plant entièrement flétri.

Tests de croissance bactérienne in planta

Les tests de croissance bactérienne *in planta* sont réalisés par injection dans la tige de 20 μ L d'une suspension bactérienne de 10^6 bactéries/mL sur des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande) âgés de quatre semaines. Pour chaque test, 12 plants sont utilisés par souche.

Pour chaque temps, trois plants sont utilisés. Les tiges des plants sont coupées de part et d'autre du point d'injection. Après stérilisation de surface à l'éthanol 70%, les tronçons sont pesés et fendus. Les bactéries sont récupérées par diffusion 20 mn dans 10 mL d'eau. La suspension bactérienne est diluée et trois dilutions différentes sont étalées sur boîte avec du milieu sélectif. Le dénombrement des bactéries présentes sur boîte est ramené à la masse de la tige. Le résultat est exprimé en Log_{10} (CFU/g) (colony forming unit). La moyenne obtenue pour les trois plants est calculée.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours du processus infectieux, la bactérie *Ralstonia solanacearum* doit faire face à des conditions environnementales hostiles dues aux ressources énergétiques limitées dans la plante et aux mécanismes de défense induits par la plante après perception de la présence du pathogène. Malgré ces conditions hostiles, la bactérie doit déployer de l'énergie pour se développer rapidement et surtout pour mettre en place l'intégralité des éléments nécessaires à la réussite du processus infectieux. Pour ne pas gaspiller les ressources dont elle dispose et pour pouvoir mener à bien la mise en place de la maladie, la bactérie a développé un système de régulation complexe lui permettant de coordonner l'expression des différents déterminants de virulence dont elle dispose en fonction de stimuli environnementaux. L'expression du pouvoir pathogène et sa régulation chez *R. solanacearum* est étudiée depuis plusieurs années dans l'équipe. Cette approche a deux objectifs principaux : comprendre la mise en place du pouvoir pathogène en fonction des signaux perçus de l'environnement et déterminer quelles sont les fonctions de virulence mobilisées par la bactérie. Pour ce deuxième objectif, des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur les régulateurs HrpB (Occhialini *et al.*, 2005) et HrpG (Valls *et al.*, 2006). Ces études ont montré que HrpB régule principalement le système de sécrétion de type III et des effecteurs ; HrpG est un régulateur plus central puisqu'il contrôle l'expression du système de sécrétion de type III via HrpB mais aussi l'expression d'autres fonctions dont l'implication dans des fonctions de virulence ou d'adaptation *in planta* a été démontrée. La détermination de la séquence reconnue par HrpB a permis de compléter les connaissances sur ce régulateur (Cunnac *et al.*, 2004). La détermination de la séquence nucléotidique *cis*-régulatrice nécessaire à l'activation par HrpG permettra également de mieux déterminer l'intégralité des gènes contrôlés par HrpG et de mieux définir son régulon. Un autre enjeu de l'étude de la régulation chez *R. solanacearum* est la compréhension et la détermination des mécanismes fins de rétrocontrôle impliqués dans la modulation de l'expression des déterminants de virulence.

Les bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas* possèdent également un système de sécrétion de type III essentiel à la mise en place de leur pouvoir pathogène. De la même manière que chez *R. solanacearum*, l'expression du système de sécrétion de type III et des effecteurs est contrôlé par un régulateur de type AraC, appelé HrpX, et homologue à HrpB

de *R. solanacearum*. L'expression de *hrpX* est contrôlée par un régulateur de type OmpR, appelé HrpG, et homologue à HrpG de *R. solanacearum*. La séquence nucléotidique nécessaire à l'activation transcriptionnelle de *hrpX* par HrpG chez *Xanthomonas spp.* n'est pas connue. Etant donné la similarité entre les mécanismes de régulation du système de sécrétion de type III de *Xanthomonas spp.* et de *R. solanacearum*, il est probable que la séquence nucléotidique impliquée dans l'activation transcriptionnelle de *hrpB* par HrpG chez *R. solanacearum* soit proche de celle nécessaire à HrpG chez *Xanthomonas spp.* Cette similarité des séquences *cis*-régulatrices a déjà été observée pour les régulateurs HrpX et HrpB qui reconnaissent la même séquence consensus chez *Xanthomonas spp.* et *R. solanacearum*. L'identification de la séquence promotrice nécessaire à HrpG chez *R. solanacearum* nous permettra peut-être d'identifier celle reconnue par HrpG chez *Xanthomonas spp.* dans le promoteur de *hrpX*. Ainsi, il sera intéressant de déterminer si le consensus est conservé et d'évaluer par la suite la diversité des gènes cibles de HrpG dans les deux espèces, mettant en évidence la conservation des mécanismes de régulation de la pathogénie entre ces deux genres bactériens.

Chez *R. solanacearum* le régulateur HrpB est régulé par au moins deux régulateurs : HrpG et PrhG. L'expression de *hrpG* est induite en présence de cellules végétales par la cascade Prh et son activité est également induite en milieu minimum. L'expression de *prhG* est induite en milieu minimum par rapport au milieu complet mais pas en présence de cellules végétales. Les mécanismes de co-régulation de *hrpB* par HrpG et PrhG sont en cours d'étude. Les premiers résultats obtenus indiquent que la régulation par PrhG requiert davantage de résidus nucléotidiques que la régulation par HrpG. Cette différence expliquerait pourquoi HrpG régule davantage de gènes que PrhG et pourquoi ces deux régulateurs fortement homologues ont si peu de cibles communes.

Un projet de séquençage à grande profondeur de lecture des ARN messagers de *R. solanacearum* cultivée dans différentes conditions et pour différents mutants est actuellement en cours dans l'équipe. Ce projet nous permettra de confirmer voire d'élargir les régulons HrpB et HrpG identifiés par analyses transcriptomiques. Cette approche devrait également permettre de déterminer l'intégralité des gènes exprimés *in planta* au cours du processus infectieux ainsi que d'identifier les positions des +1 de transcription. Ces informations faciliteront les alignements de promoteurs et sans doute l'identification des séquences consensus reconnues par différents régulateurs.

Un des objectifs principaux de l'étude des cibles contrôlées par HrpG est de découper le régulon de HrpG en plusieurs sous-groupes fonctionnels. Pour cela plusieurs approches sont utilisées et mises en place.

Une banque de mutants de la souche GMI1000 a été générée par transposons et l'insertion des transposons dans les différents mutants est en cours d'identification. Cette banque de mutants devrait permettre de couvrir une grande partie du génome de *R. solanacearum* et donc de nombreux gènes régulés par HrpG.

Cependant, étant donné le grand nombre de gènes régulés par HrpG indépendamment de HrpB, il est probable que la redondance fonctionnelle au sein de ce régulon ne nous permette pas d'observer des phénotypes remarquables en mutant un seul gène codant pour un déterminant de virulence. C'est pourquoi nous nous intéressons particulièrement aux régulateurs qui sont situés sous HrpG. 12 régulateurs ont été retenus par Valls et ses collaborateurs (2006) comme étant contrôlés par HrpG. Des mutants dans ces gènes régulateurs sont en cours de réalisation. Le phénotypage de ces mutants permettra de mieux comprendre les cascades de signalisation situées sous HrpG et pourra nous amener à déterminer des sous-groupes fonctionnels dans le régulon de HrpG.

Récemment, un autre test de phénotypage de mutants de *R. solanacearum* a été mis au point dans l'équipe. Ce test consiste à comparer la capacité d'un mutant à se multiplier par rapport à la souche sauvage GMI1000 en co-inoculant la souche sauvage et le mutant par infiltration dans la feuille (Macho *et al.*, 2010). Ce test pourra être utilisé pour caractériser plus finement le phénotype *in vivo* des différents mutants de régulateurs contrôlés par HrpG et mieux discriminer quels sont les gènes impliqués dans l'apparition des symptômes ou dans l'adaptation et la croissance *in planta*.

Dans l'objectif de mieux établir le rôle de chacun des différents régulateurs contrôlés par HrpG dans le processus infectieux, il serait intéressant de déterminer à quelles étapes et dans quels types de tissus végétaux les gènes de ces régulateurs sont exprimés *in planta*. Pour cela des analyses cytologiques, telles que celles effectuées par Vasse et ses collaborateurs (2000), pourraient être envisagées. Ces analyses permettraient d'établir et de comparer les pouvoirs infectieux et colonisateurs des mutants de ces régulateurs.

Des outils pour suivre l'expression de gènes *in planta* sont actuellement mis en place et testés par M. Valls et ses collaborateurs. Ces outils pourront être utilisés pour étudier l'expression des gènes régulateurs *in planta* et ainsi pouvoir peut-être identifier la présence de signaux inducteurs plus spécifiques. L'identification de nouveaux signaux ou la définition plus précise des signaux déjà identifiés, tel que le milieu minimum, est également un enjeu important de l'étude de la régulation. Dans le cas du régulon HrpG, il est envisageable que

d'autres signaux soient intégrés *in planta* ; l'identification de ces signaux et leur intégration dans ce régulon nous permettra de mieux comprendre et de mieux définir le régulon HrpG.

Les travaux effectués sur le régulateur MetR montrent que l'intervention de régulateurs intermédiaires entre HrpG et les gènes qu'il contrôle permet d'intégrer d'autres signaux que ceux intégrés par HrpG. Dans ce cas l'expression du gène *metE* répond à aux moins trois signaux que nous avons pu identifier : le signal végétal PrhA-dépendant et le signal environnemental du milieu minimum sont intégrés par HrpG et l'induction par la présence d'homocystéine est intégrée par MetR. Dans le cas de la régulation de biosynthèse de la méthionine, il semble également que le passage par un régulateur intermédiaire permette une amplification de l'activation transcriptionnelle médiée par HrpG. En effet, le gène *metE* avait été retenu dans la liste du régulon de HrpG établie par Valls et ses collaborateurs (2006) mais pas le gène *metR*. L'intervention de régulateurs intermédiaires permettrait donc l'intégration de nouveaux signaux mais également une modulation des signaux médiés par HrpG.

L'identification de sous-groupes fonctionnels et leur hiérarchisation a pour objectif de nous aider à mieux comprendre quels sont les gènes impliqués dans les différentes étapes du processus infectieux telles que l'adaptation *in planta*, la colonisation de la plante ou l'apparition des symptômes. Actuellement, nos études permettent d'avoir une vision globale des mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle des différents déterminants du pouvoir pathogène. Les travaux menés sur le régulon HrpG ont pour objectif d'apporter une vision plus précise et plus intégrative de ce régulon, en nous permettant de discriminer les fonctions d'adaptation au milieu *in planta*, de colonisation de la plante et de virulence et de comprendre comment ces fonctions sont coordonnées et hiérarchisées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aarons, S., Abbas, A., Adams, C., Fenton, A., and O'Gara, F. (2000) A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* 182: 3913-3919.
- Albright, L.M., Huala, E., and Ausubel, F.M. (1989) Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu Rev Genet* 23: 311-336.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *Embo J* 19: 2304-2314.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 179: 5655-5662.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42: 385-414.
- Allen, C., Gay, J., and Simon-Buela, L. (1997) A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 1054-1064.
- Alvarez, B., Lopez, M.M., and Biosca, E.G. (2008) Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology* 154: 3590-3598.
- Anand, G.S., Goudreau, P.N., and Stock, A.M. (1998) Activation of methylesterase CheB: evidence of a dual role for the regulatory domain. *Biochemistry* 37: 14038-14047.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailliau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S. (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14620-14625.
- Arlat, M., Gough, C.L., Barber, C.E., Boucher, C., and Daniels, M.J. (1991) *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 4: 593-601.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A., and Boucher, C.A. (1992) Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 5: 187-193.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., and Boucher, C.A. (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes,

- is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J* 13: 543-553.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., and Seidman, J.G., (eds) (1998) *Current protocols in molecular biology*. New York: Publishing Associates and Wiley Interscience.
- Bachrach, U. (2010) The early history of polyamine research. *Plant Physiol Biochem* 48: 490-495.
- Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P., Stewart, G.S., and Williams, P. (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288 (Pt 3): 997-1004.
- Bell, B.L., Mohapatra, N.P., and Gunn, J.S. (2010) Regulation of virulence gene transcripts by the *Francisella novicida* orphan response regulator PmrA: role of phosphorylation and evidence of MglA/SspA interaction. *Infect Immun* 78: 2189-2198.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 266-292.
- Bialczyk, J., and Lechowski, Z. (1995) Chemical composition of xylem sap of tomato grown on bicarbonate containing medium. *J. Plant Nutrition* 18: 2005-2021.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2002) Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10: 701-713.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denance, N., Vasse, J., Lauber, E., and Arlat, M. (2007) Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* 2: e224.
- Boucher, C.A., Van Gijsegem, F., Barberis, P.A., Arlat, M., and Zischek, C. (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J Bacteriol* 169: 5626-5632.
- Boughammoura, A., Matzanke, B.F., Bottger, L., Reverchon, S., Lesuisse, E., Expert, D., and Franza, T. (2008) Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* 190: 1518-1530.
- Bourret, R.B., and Silversmith, R.E. (2010) Two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 13: 113-115.
- Braun, V., and Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* 24: 104-109.

- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (1999) *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 31: 237-251.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 109-119.
- Brown, D.G., and Allen, C. (2004) *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Mol Microbiol* 53: 1641-1660.
- Brumbley, S.M., and Denny, T.P. (1990) Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J Bacteriol* 172: 5677-5685.
- Buttner, D., and Bonas, U. (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34: 107-133.
- Byerly, K.A., Urbanowski, M.L., and Stauffer, G.V. (1991) The MetR binding site in the *Salmonella typhimurium* *metH* gene: DNA sequence constraints on activation. *J Bacteriol* 173: 3547-3553.
- Cai, X.Y., Maxon, M.E., Redfield, B., Glass, R., Brot, N., and Weissbach, H. (1989) Methionine synthesis in *Escherichia coli*: effect of the MetR protein on *metE* and *metH* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4407-4411.
- Cai, X.Y., Redfield, B., Maxon, M., Weissbach, H., and Brot, N. (1989) The effect of homocysteine on MetR regulation of *metE*, *metR* and *metH* expression *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 79-83.
- Callard, D., and Mazzolini, L. (1997) Identification of proliferation-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. Characterization of a new member of the highly evolutionarily conserved histone H2A.F/Z variant subfamily. *Plant Physiol* 115: 1385-1395.
- Chatterjee, A., Cui, Y., and Chatterjee, A.K. (2002) RsmA and the quorum-sensing signal, N-[3-oxohexanoyl]-L-homoserine lactone, control the levels of *rsmB* RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability. *J Bacteriol* 184: 4089-4095.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R., and Chatterjee, A.K. (2003) GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1106-1117.
- Chevance, F.F., and Hughes, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6: 455-465.

- Clarke, T.E., Tari, L.W., and Vogel, H.J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* 1: 7-30.
- Clough, S.J., Flavier, A.B., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth. *Appl Environ Microbiol* 63: 844-850.
- Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179: 3639-3648.
- Coplin, D.L., Sequeira, L., and Hanson, R.S. (1974) *Pseudomonas solanacearum*: virulence of biochemical mutants. *Can J Microbiol* 20: 519-529.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890.
- Craig, L., and Li, J. (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 18: 267-277.
- Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A.K. (2001) Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 516-526.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N., and Chatterjee, A.K. (2005) ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J Bacteriol* 187: 4792-4803.
- Cunnac, S., Boucher, C., and Genin, S. (2004) Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 186: 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* 53: 115-128.
- Darwin, A.J., Tyson, K.L., Busby, S.J., and Stewart, V. (1997) Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol Microbiol* 25: 583-595.
- Das, A.R., and Sonti, R.V. (2009) Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 73-85.

- de Souza, J.T., Mazzola, M., and Raaijmakers, J.M. (2003) Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 5: 1328-1340.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8024-8029.
- Duffy, B.K., and Defago, G. (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* 66: 3142-3150.
- Durbin, R.D. (1991) Bacterial phytotoxins: Mechanism of action. *Experientia* 47: 776-783.
- Enard, C., and Expert, D. (2000) Characterization of a *tonB* mutation in *Erwinia chrysanthemi* 3937: TonB(Ech) is a member of the enterobacterial TonB family. *Microbiology* 146 (Pt 8): 2051-2058.
- Expert, D. (1999) WITHHOLDING AND EXCHANGING IRON: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annu Rev Phytopathol* 37: 307-334.
- Fabret, C., Feher, V.A., and Hoch, J.A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* 181: 1975-1983.
- Fegan, M., and Prior, P. (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In *Bacterial Wilt Disease and Ralstonia solanacearum species complex*. Allen C., P.P.a.H.A.C. (ed), pp. 449-461.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Basse, C.W., and Boller, T. (1991) Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol* 97: 19-25.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., Wehling, M.D., Alfano, J.R., Moreno-Hagelsieb, G., Lamboy, W.F., DeClerck, G., Schneider, D.J., and Cartinhour, S.W. (2006) Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, allows *de novo* reconstruction of the Hrp *cis* element, and identifies novel coregulated genes. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1167-1179.
- Figge, R. M. (2006) Methionine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. In *Microbiol Monogr*, Vol. 5. Wendisch, Volker F. (ed.) pp.163-187.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26: 251-259.
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone

- production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179: 7089-7097.
- Flavier, A.B., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1998) An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 28: 475-486.
- Fontecave, M., Atta, M., and Mulliez, E. (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29: 243-249.
- Francis, M.S., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (2002) Regulation of type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 5: 166-172.
- Franza, T., Sauvage, C., and Expert, D. (1999) Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 119-128.
- Franza, T., Mahe, B., and Expert, D. (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* 55: 261-275.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.M., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F., and Brockman, F.J. (2004) Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. *Appl Environ Microbiol* 70: 4230-4241.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.
- Gabriel, D.W., Allen, C., Schell, M., Denny, T.P., Greenberg, J.T., Duan, Y.P., Flores-Cruz, Z., Huang, Q., Clifford, J.M., Presting, G., Gonzalez, E.T., Reddy, J., Elphinstone, J., Swanson, J., Yao, J., Mulholland, V., Liu, L., Farmerie, W., Patnaikuni, M., Balogh, B., Norman, D., Alvarez, A., Castillo, J.A., Jones, J., Saddler, G., Walunas, T., Zhukov, A., and Mikhailova, N. (2006) Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 69-79.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 393-410.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203: 11-21.
- Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* 5: 35.
- Galperin, M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13: 150-159.

- Gao, R., Tao, Y., and Stock, A.M. (2008) System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol Microbiol* 69: 1358-1372.
- Garber, E.D., Shaeffer, S.G., and Goldman, M. (1956) The virulence of biochemical mutants of *Erwinia aroideae* for varieties of radish and turnip. *J Gen Microbiol* 14: 261-267.
- Garg, R.P., Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Denny, T.P., and Schell, M.A. (2000) Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 182: 6659-6666.
- Garg, R.P., Yindeeyoungyeon, W., Gilis, A., Denny, T.P., Van Der Lelie, D., and Schell, M.A. (2000) Evidence that *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) contains a functional homologue of the *Ralstonia solanacearum* Phc cell density sensing system. *Mol Microbiol* 38: 359-367.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C., and Boucher, C.A. (1992) Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* 6: 3065-3076.
- Genin, S., and Boucher, C. (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 42: 107-134.
- Genin, S., Brito, B., Denny, T.P., and Boucher, C. (2005) Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett* 579: 2077-2081.
- Gillings, M., Fahy, P., and Davies, C. (1993) Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Lett Appl Microbiol* 17: 44-48.
- Gonzalez, J.E., and Keshavan, N.D. (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 859-875.
- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., and Ottado, J. (2009) A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4: e4358.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 425-449.
- Grey, B.E., and Steck, T.R. (2001) The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl Environ Microbiol* 67: 3866-3872.

- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J Bacteriol* 189: 377-387.
- Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29: 65-87.
- Hayward, A.C. (2000) *Ralstonia solanacearum*. In *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 4. Lederberg, J. (ed). San Diego: Academic Press, pp. 32-42.
- He, Y.W., and Zhang, L.H. (2008) Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 32: 842-857.
- Head, C.G., Tardy, A., and Kenney, L.J. (1998) Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the ompF and ompC regulatory sites. *J Mol Biol* 281: 857-870.
- Heeb, S., and Haas, D. (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1351-1363.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 184: 1046-1056.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* 46: 47-110.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., and Ausubel, F.M. (2000) The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *J Bacteriol* 182: 3508-3516.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., Penaloza-Vazquez, A., Shao, J., Bender, C., and Ausubel, F.M. (2000) Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is *rpoN* dependent. *J Bacteriol* 182: 3498-3507.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 186: 6902-6914.
- Hernandez-Romero, D., Solano, F., and Sanchez-Amat, A. (2005) Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 71: 6808-6815.
- Hess, J.F., Bourret, R.B., and Simon, M.I. (1988) Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* 336: 139-143.
- Hong, E., Lee, H.M., Ko, H., Kim, D.U., Jeon, B.Y., Jung, J., Shin, J., Lee, S.A., Kim, Y., Jeon, Y.H., Cheong, C., Cho, H.S., and Lee, W. (2007) Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *J Biol Chem* 282: 20667-20675.

- Huang, J., Denny, T.P., and Schell, M.A. (1993) *vsrB*, a regulator of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. *J Bacteriol* 175: 6169-6178.
- Huang, J., Carney, B.F., Denny, T.P., Weissinger, A.K., and Schell, M.A. (1995) A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 177: 1259-1267.
- Huang, J., and Schell, M. (1995) Molecular characterization of the *eps* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation at a single promoter. *Mol Microbiol* 16: 977-989.
- Huang, Q., and Allen, C. (1997) An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 179: 7369-7378.
- Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Garg, R.P., Denny, T.P., and Schell, M.A. (1998) Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* 180: 2736-2743.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996) Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* 50: 213-257.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S., and Pak, K. (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* 183: 5589-5598.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., and Stebbins, C.E. (2006) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-226.
- Janse, J.D., van den Beld, H.E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N.N.A., and van Vaerenbergh, J. (2004) Introduction of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *J Plant Pathol* 86: 147-155.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J.A. (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 38: 535-542.
- Kang, Y., Saile, E., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1999) Quantitative immunofluorescence of regulated *eps* gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 2356-2362.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* 46: 427-437.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318: 648-651.

- Kay, S., and Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12: 37-43.
- Keener, J., and Kustu, S. (1988) Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4976-4980.
- Kenney, L.J. (2002) Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr Opin Microbiol* 5: 135-141.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A., and Mudgett, M.B. (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in xanthomonas-infected tomato leaves. *Plant Cell* 20: 1915-1929.
- Kitten, T., Kinscherf, T.G., McEvoy, J.L., and Willis, D.K. (1998) A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 28: 917-929.
- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A., and Bonas, U. (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol* 188: 7652-7660.
- Lan, L., Deng, X., Zhou, J., and Tang, X. (2006) Genome-wide gene expression analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals overlapping and distinct pathways regulated by HrpL and HrpRS. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 976-987.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* 41: 121-145.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C. (2002) PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1058-1068.
- Lee, J., Klusener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W., and Nurnberger, T. (2001) HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 289-294.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. (2005) Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 1296-1305.

- Lopez-Garrido, J., and Casadesus, J. (2010) Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* 184: 637-649.
- Low, D.A., and Casadesus, J. (2008) Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol* 11: 106-112.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., and Stock, J.B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 718-722.
- MacFarlane, S.A., and Merrick, M. (1985) The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntxB* and the *glnA-ntxBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 13: 7591-7606.
- Macho, A.P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzon, C.R., and Genin, S. (2010) A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1197-1205.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Gris, C., Timmers, T., Poinot, V., Gilbert, L.B., Heeb, P., Medigue, C., Batut, J., and Masson-Boivin, C. (2010) Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* 8: e1000280.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., and Arlat, M. (1998) PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* 27: 437-453.
- Maris, A.E., Walthers, D., Mattison, K., Byers, N., and Kenney, L.J. (2005) The response regulator OmpR oligomerizes via beta-sheets to form head-to-head dimers. *J Mol Biol* 350: 843-856.
- McCleary, W.R. (1996) The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol Microbiol* 20: 1155-1163.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., and Van Gijsegem, F. (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 162: 328-334.
- Meyer, R.J., and Helinski, D.R. (1977) Unidirectional replication of the P-group plasmid RK2. *Biochim Biophys Acta* 478: 109-113.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Milling, A., Meng, F., Denny, T.P., and Allen, C. (2009) Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99: 1127-1134.

- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* 4: 161-168.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangl, J.L., and Grant, S.R. (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 15: 363-371.
- Mousslim, C., and Groisman, E.A. (2003) Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* 47: 335-344.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A., and Chatterjee, A.K. (1998) RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol* 180: 3629-3634.
- Muller, S., Pflock, M., Schar, J., Kennard, S., and Beier, D. (2007) Regulation of expression of atypical orphan response regulators of *Helicobacter pylori*. *Microbiol Res* 162: 1-14.
- Newton, J.A., and Fray, R.G. (2004) Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* 6: 213-224.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide HrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 41: 1271-1281.
- Noriega, C.E., Lin, H.Y., Chen, L.L., Williams, S.B., and Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 75: 394-412.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S., and Boucher, C. (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 938-949.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiäho-Lassila, E.L., Wengelnik, K., Bonas, U., and Korhonen, T.K. (1997) Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 179: 1280-1290.
- Okamura, H., Hanaoka, S., Nagadoi, A., Makino, K., and Nishimura, Y. (2000) Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box. *J Mol Biol* 295: 1225-1236.
- Oltean, S., and Banerjee, R. (2003) Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 278: 20778-20784.
- Omori, K., and Idei, A. (2003) Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J Biosci Bioeng* 95: 1-12.

- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Macho, A.P., Mansfield, J.W., and Beuzon, C.R. (2010) Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 665-681.
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Mansfield, J.W., and Beuzon, C.R. (2010) Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 682-701.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 46: 281-291.
- Pessi, G., and Haas, D. (2001) Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol Lett* 200: 73-78.
- Plener, L., Manfredi, P., Valls, M., and Genin, S. (2010) PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 192: 1011-1019.
- Poplawsky, A.R., and Chun, W. (1997) *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 179: 439-444.
- Poueymiro, M., and Genin, S. (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* 12: 44-52.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., and Fegan, M. (2000) Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst Appl Microbiol* 23: 479-486.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., and Trigalet, A. (2000) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146 (Pt 7): 1679-1692.
- Prentki, P., and Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313.
- Qian, W., Han, Z.J., and He, C. (2008) Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 151-161.
- Racape, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., Nurnberger, T., Parlange, F., Puverel, S., and Keller, H. (2005) Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Mol Microbiol* 58: 1406-1420.
- Raghavan, V., and Groisman, E.A. (2010) Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr Opin Microbiol* 13: 226-231.

- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N., and Panopoulos, N.J. (1992) Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol* 174: 3499-3507.
- Rampersaud, A., Norioka, S., and Inouye, M. (1989) Characterization of OmpR binding sequences in the upstream region of the *ompF* promoter essential for transcriptional activation. *J Biol Chem* 264: 18693-18700.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., and Prior, P. (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11: 379.
- Rico, A., and Preston, G.M. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 269-282.
- Roberts, D.P., Denny, T.P., and Schell, M.A. (1988) Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol* 170: 1445-1451.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8: 498-504.
- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M., and Nunn, D.N. (1998) Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1048-1056.
- Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W.L., Doyle, J.J., and Collmer, A. (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13142-13147.
- Römling, U.A., D. (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol* 9: 218-228.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Jiang, B.L., He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L., and Dow, J.M. (2007) Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 63: 429-442.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87: 1264-1271.

- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502.
- Schar, J., Sickmann, A., and Beier, D. (2005) Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187: 3100-3109.
- Schell, M.A., Roberts, D.P., and Denny, T.P. (1988) Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J Bacteriol* 170: 4501-4508.
- Schell, M.A., Denny, T.P., and Huang, J. (1994) VsrA, a second two-component sensor regulating virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* 11: 489-500.
- Schell, M.A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* 38: 263-292.
- Silva, J.C., Haldimann, A., Prahalad, M.K., Walsh, C.T., and Wanner, B.L. (1998) In vivo characterization of the type A and B vancomycin-resistant enterococci (VRE) VanRS two-component systems in *Escherichia coli*: a nonpathogenic model for studying the VRE signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11951-11956.
- Silversmith, R.E. (2010) Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 13: 177-183.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C.E., Daniels, M.J., and Dow, J.M. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 38: 986-1003.
- Soto-Suarez, M., Bernal, D., Gonzalez, C., Szurek, B., Guyot, R., Tohme, J., and Verdier, V. (2010) In planta gene expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*, African strain MAI1. *BMC Microbiol* 10: 170.
- Sreedharan, A., Penalzoza-Vazquez, A., Kunkel, B.N., and Bender, C.L. (2006) CorR regulates multiple components of virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 768-779.
- Stock, A., Chen, T., Welsh, D., and Stock, J. (1988) CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1403-1407.

- Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B., and Schutt, C.E. (1989) Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* 337: 745-749.
- Stock, A.M. (1999) A nonlinear stimulus-response relation in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10945-10947.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
- Strom, M.S., and Lory, S. (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 47: 565-596.
- Surette, M.G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E.G., Ninfa, A., and Stock, J.B. (1996) Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* 271: 939-945.
- Swanson, J.K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. (2004) Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95: 136-143.
- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2010) The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J Bacteriol* 192: 117-126.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.M. (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1159-1166.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20: 326-339.
- Tuite, N.L., Fraser, K.R., and O'Byrne C, P. (2005) Homocysteine toxicity in *Escherichia coli* is caused by a perturbation of branched-chain amino acid biosynthesis. *J Bacteriol* 187: 4362-4371.
- Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.J., Vailleau, F., Gentzbittel, L., and Jardinaud, M.F. (2009) Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiol* 150: 1713-1722.
- Urbanowski, M.L., Stauffer, L.T., Plamann, L.S., and Stauffer, G.V. (1987) A new methionine locus, *metR*, that encodes a *trans*-acting protein required for activation of *metE* and *metH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 169: 1391-1397.
- Urbanowski, M.L., and Stauffer, G.V. (1989) Role of homocysteine in *metR*-mediated activation of the *metE* and *metH* genes in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 3277-3281.

- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog* 2: e82.
- van Doorn, J., Boonekamp, P.M., and Oudega, B. (1994) Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 334-344.
- van Elsas, J.D., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, J.M., de Vries, P.M., and van Overbeek, L.S. (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90: 1358-1366.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., and Boucher, C. (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* 15: 1095-1114.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marena, M., and Boucher, C. (2000) *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol Microbiol* 36: 249-260.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P., and Boucher, C. (2002) Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol Microbiol* 44: 935-946.
- van Overbeek, L.S., Bergervoet, J.H.W., Jacobs, F.H.H., and van Elsas, J.D. (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Phytopathology* 94: 463-469.
- Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 241-251.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C., and Brito, B. (2000) The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 259-267.
- Vera-Sirera, F., Minguet, E.G., Singh, S.K., Ljung, K., Tuominen, H., Blazquez, M.A., and Carbonell, J. (2010) Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Physiol Biochem* 48: 534-539.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., and Powers, D.W. (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407: 897-900.
- Walthers, D., Tran, V.K., and Kenney, L.J. (2003) Interdomain linkers of homologous response regulators determine their mechanism of action. *J Bacteriol* 185: 317-324.

- Wanner, B.L. (1992) Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* 174: 2053-2058.
- Wei, C.F., WDeng, W.L., and Huang, H.C. (2005) A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol Microbiol* 57: 520-536.
- Weingart, H., Ullrich, H., Geider, K., and Volksch, B. (2001) The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. *Phytopathology* 91: 511-518.
- Weiss, V., and Magasanik, B. (1988) Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8919-8923.
- Weissbach, H., and Brot, N. (1991) Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 1593-1597.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S., and Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8787-8791.
- Wengelnik, K., and Bonas, U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 178: 3462-3469.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (1996) HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 704-712.
- White, D., Hart, M.E., and Romeo, T. (1996) Phylogenetic distribution of the global regulatory gene *csrA* among eubacteria. *Gene* 182: 221-223.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., and Salmond, G.P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6578-6583.
- Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B., and Allen, C. (2002) *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 86: 987-991.
- Willis, D.K., Hrabak, E.M., Rich, J.J., Barta, T.M., Lindow, S.E., and Panopoulos, N.J. (1990) Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Mol Plant Microbe Interact* 3: 149-156.
- Willis, D.K., Holmstadt, J.J., and Kinscherf, T.G. (2001) Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl Environ Microbiol* 67: 1400-1403.

- Wolfe, A.J. (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 12-50.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6: 191-197.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J.M. (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* 18: 74-80.
- Yao, J., and Allen, C. (2007) The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol* 189: 6415-6424.
- Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A., and Ohnishi, K. (2009) The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. *J Bacteriol* 191: 3424-3428.
- Yoshimochi, T., Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi, Y., and Ohnishi, K. (2009) Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. *J Gen Plant Pathol*: 196-204.
- Yun, M.H., Torres, P.S., El Oirdi, M., Rigano, L.A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Dankert, M.A., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2006) Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* 141: 178-187.
- Zhang, C.C. (1996) Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* 20: 9-15.
- Zhou, J.M., and Chai, J. (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* 11: 179-185.

AUTHOR: Laure PLENER

TITLE: Study of transcriptional activation mechanisms of virulence and *in planta* adaptation genes in the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*

Ph.D SUPERVISOR : Stéphane GENIN

SUMMARY

HrpG is the central virulence regulator of the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. HrpG integrates environmental and host-dependent signals and induces the expression of type III secretion system genes via HrpB, as well as almost 200 genes independent from HrpB. A regulator highly homologous to HrpG was identified and characterised. This regulator, called PrhG, also induces the expression of *hrpB*, but only upon the environmental signal. We showed that HrpG and PrhG are two direct regulators of *hrpB* and that they partly require the same *cis*-regulatory sequences. The objective of our study is to understand how HrpG and PrhG share the control of *hrpB* expression and to define more precisely HrpG regulon in order to identify functions implicated in colonisation and adaptation to the host environment.

KEY WORDS : *Ralstonia solanacearum*, transcriptional regulation, HrpG, pathogenicity, methionine, type III secretion system

AUTEUR : Laure PLENER

TITRE : Etude des mécanismes d'activation transcriptionnelle des gènes de virulence et des fonctions d'adaptation *in planta* chez la bactérie *Ralstonia solanacearum*

DIRECTEUR DE THESE : Stéphane GENIN

RESUME

HrpG est le régulateur central de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. HrpG intègre des signaux environnementaux et hôte-dépendants et induit la transcription du système de sécrétion de type III via HrpB, ainsi que près de 200 gènes indépendants de HrpB. Un régulateur fortement homologue à HrpG a été identifié et caractérisé. Ce régulateur, PrhG, induit également l'expression de *hrpB* mais uniquement en réponse au signal environnemental. Nous avons montré que HrpG et PrhG sont deux régulateurs directs de *hrpB* et dont les séquences *cis*-régulatrices sont partiellement communes. Les études effectuées visent à comprendre comment HrpG et PrhG se partagent le contrôle de l'expression de *hrpB* et à mieux définir le régulon HrpG pour identifier les fonctions impliquées dans la colonisation et l'adaptation *in planta*.

MOTS-CLEFS : *Ralstonia solanacearum*, régulation transcriptionnelle, HrpG, pouvoir pathogène, méthionine, système de sécrétion de type III

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Microbiologie : « Microorganismes : du génome aux interactions avec l'hôte »