

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)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :

GUY Endrick

Le 14 février 2013 à 14h00

Titre :

Contribution de l'effectome et de l'effecteur de type 3 XopAC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* à l'agressivité sur *A. thaliana*

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche :

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, UMR CNRS-INRA 2594/441

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Laurent NOËL, Chargé de Recherche CNRS

Rapporteurs :

Dr. Marie-Anne BARNY, Directeur de Recherche INRA, Versailles

Dr. Denis FAURE, Directeur de Recherche CNRS, Gif-sur-Yvette

Autre(s) membre(s) du jury :

Dr. Christophe JACQUET, Professeur à l'université Paul Sabatier, Toulouse, Président du jury

Dr. Marc VALLS, Associate Professor à l'université de Barcelone, Examineur

Xavier Nesme, Ingénieur de Recherche INRA, Lyon, Examineur

Remerciements

- Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres (passés et présents) de l'équipe Stratégies Infectieuses des *Xanthomonas*. De part leur gentillesse et bienveillance, je me suis rapidement adapté et intégré aussi bien dans l'équipe qu'au sein du LIPM. Je remercie tout particulièrement Laurent Noël pour avoir accepté de m'encadrer et de me transmettre son savoir et Matthieu Arlat pour m'avoir accepté dans son équipe. Je remercie également tous les membres du LIPM avec qui j'ai pu interagir et discuter favorisant grandement l'avancée de mes travaux. Je remercie les non permanents du LIPM pour les soirées, les apéros, les discussions, les plaisanteries... qui contribuent également au bien-être d'un thésard durant les trois années de thèse. En particulier Justine avec qui les discussions Naruto, One Piece, Zelda, Fairy Tail, Zelda, séries TV... m'ont également aidé à me détendre durant les moments difficiles.
- Je remercie aussi tous nos collaborateurs ainsi que mon comité de thèse (Mathilde Fagard et Nemo Peeters) qui ont aidé à améliorer cette thèse ainsi que les manuscrits qui en découlent. Un grand merci à Anne Genissel pour le temps qu'elle a su nous mettre à disposition pour faire avancer le papier diversité des Xcc et qui a aussi réussi à m'intéresser à le GWA. Pas chose facile.
- Je tiens à remercier la région Guyane pour le soutien financier qu'elle apporte à ses étudiants qui étudient hors de la région.
- Un grand merci aux membres du jury qui ont accepté de se déplacer et d'évaluer ce travail.
- Pour finir, je remercie très fortement ma femme Erika, ma fille Kayla et ma mère Martho pour m'avoir accompagné, soutenu et surtout supporté pendant toutes ces années d'études (pas seulement pendant la thèse). Je pense que je n'y serais pas arrivé sans elles. Je vous remercie de votre soutien qui m'a rendu plus fort et meilleur sans quoi toutes ces années d'études ne m'auraient pas laissé autant de bons souvenirs. Je pense que tu te rappelleras Erika lorsque t'attendais avec moi le bus 68 qui passait tous les 400 ans en première année.

Un grand MERCI à vous tous! :)

Liste des abréviations

A

| | |
|--|---------|
| <i>A. thaliana</i> HopM interactors | AtMIN |
| Acide aminé | aa |
| Acidic Activation Domain | AAD |
| ADP-ribosyltransférase | ADP-RT |
| ADP-ribosylation factor guanine-nucleotide exchange factor | ARF-GEF |
| Amplified Fragment Length Polymorphism | AFLP |
| <i>Arabidopsis</i> peptide 1 | AtPep1 |
| Avirulence | Avr |

B

| | |
|-----------------------------------|------|
| BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1 | BIK1 |
| BRI1-Associated receptor Kinase 1 | BAK1 |

C

| | |
|---|-------|
| Conserved Effector Locus | CEL |
| Coiled-Coil | CC |
| Columbia-0 | Col-0 |
| Collection Française de Bactéries Phytopathogènes | CFBP |
| Coronatine | COR |

D

| | |
|-------------------------------------|------|
| Danger-Associated Molecular Pattern | DAMP |
| Death On Curing | Doc |
| Déséquilibre de Liaison | LD |

E

| | |
|-----------------------------------|------|
| Effector-Triggered Immunity | ETI |
| Effecteur de Type 3 | ET3 |
| EF-Tu receptor | EFR |
| Ethyl Méthane Sulfonate | EMS |
| Enhanced Disease Susceptibility 1 | EDS1 |
| Effector-Triggered Susceptibility | ETS |
| ExoPolySaccharide | EPS |

F

| | |
|-------------------------------|------|
| Fic, Doc and AvrB | fido |
| Filamentation Induced by CAMP | Fic |
| FLAGELLIN SENSING2 | FLS2 |

G

Liste des abréviations

Genome-Wide Association GWA
Glycine-Rich RNA-Binding Protein GR-RBP

H

Homolog of *avrBs3* in *Xanthomonas* Hax
Horizontal Gene Transfert HGT
Horticulture Research International HRI
HRP-Conserved HRC
Hypersensitive Response HR
Hypersensitive Response and Pathogenicity HRP

I

Insertion/deletion Indel

K

Kashmire Kas

L

Leucine-Rich Repeats LRR

M

Microarray-based comparative genomique CGH
Microbial-Associated Molecular Pattern MAMP
Microtubule MT
Minor Allele Frequency MAF
Mitogen-Activated Protein Kinase MAPK

N

National Collection CN
Next Generation Sequencing NGS
Non-race-specific Disease Resistance 1 NDR1
Nuclear Localization Sequence NLS
Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeat NB-LRR

P

PAMP-Triggered Immunity PTI
Pattern Recognition Receptor PRR
Pathogen-Associated Molecular Pattern PAMP
Pathovar pv.
Plant-Inducible Promoter-box PIP-box
Pseudomonas syringae pv. *tomato* Pto
Pseudomonas syringae pv. *syringae* Pss

R

Liste des abréviations

| | |
|---|---------|
| Reactive Oxygen Species | ROS |
| Receptor-Like Kinase | RLK |
| Receptor-Like Cytoplasmic kinase | RLCK |
| Receptor-Like Protein | RLP |
| Repeat-Variable Diresidue | RVD |
| Required for AvrXa21 activity | rax |
| Résistance | R |
| Resistance to <i>Peronospora parasitica</i> | RPP |
| RPM1-Interacting Protein 4 | RIN4 |
| RPM1-Induced Protein Kinase | RIPK |
| RNA-sequencing | RNA-seq |

S

| | |
|--------------------------------|------|
| Salicylic Acid | SA |
| Seedling Growth Inhibition | SGI |
| Single Nucleotide Polymorphism | SNP |
| Small Ubiquitin-Like Modifier | SUMO |
| Suppressor of XopAC | sxc |
| Système de Sécrétion de Type 2 | SST2 |
| Système de Sécrétion de Type 3 | SST3 |
| Systemic Acquired Resistance | SAR |

T

| | |
|------------------------------|------|
| Toll and human interleukin | TIR |
| TonB-Dependent Transporter | TBDT |
| Transcription Activator-Like | TAL |
| Type 3 Secreted Proteins | T3SP |

U

| | |
|---------------------------|---------|
| UPregulated by AvrBs3-box | UPA-box |
|---------------------------|---------|

V

| | |
|--------------|-------|
| Vascular-ETI | V-ETI |
|--------------|-------|

X

| | |
|--|-----|
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | Xcc |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Xcv |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | Xoo |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> | Xoc |
| <i>Xanthomonas</i> outer protein | Xop |

Liste des figures

Introduction

Les stratégies de virulence des bactéries

Figure A : Exemples de symptômes produits par des bactéries phytopathogènes sur leur plante hôte

Figure B : Reconnaissance des bactéries et mise en place de l'immunité innée chez les plantes

Figure C : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes

Figure D : Régulation des gènes du SST3 chez les bactéries phytopathogènes

Figure E : Les pili hrp de différentes bactéries phytopathogènes cultivées dans des milieux inducteurs des gènes *hrp*

Figure F : Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III des bactéries phytopathogènes et de son ancrage dans les structures membranaires végétales

Figure G : Domaines fonctionnels des effecteurs TAL du genre *Xanthomonas*

Figure H : Redondance fonctionnelle au sein des effecteurs

Figure I : Manipulation du métabolisme de la cellule par les effecteurs

Figure J : Mode d'action de l'effecteur AvrBs3 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Figure K : Prédiction des effecteurs *in silico*

Mise en place des défenses végétales

Figure L : Origine de différents Pathogen-Associated Molecular Patterns chez les bactéries à caractère Gram négatif

Figure M : Représentation schématique des Pattern Recognition Receptors et de leur ligand connu

Figure N : Activation des Pattern Recognition Receptors

Figure O : Inhibition de la fermeture des stomates par les ET3

Figure P : Le modèle gène-pour-gène ou la reconnaissance *R/Avr*

Figure Q : Représentation schématique des protéines de résistance NB-LRR végétales

Figure R : Activation de la résistance systémique acquise

Figure S : Similarité entre les réponses immunitaires PTI (PAMP-Triggered Immunity) et ETI (Effector-Triggered Immunity)

Présentation de notre modèle d'étude

Figure T : Exemples de symptômes produits par les bactéries du genre *Xanthomonas* sur leur plante hôte

Figure U : Symptômes de la nervation noire sur chou et photo de gouttes de guttation de chou

Figure V : Représentation schématique du cycle de vie de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) lors d'une interaction avec *Arabidopsis thaliana*

Figure W : Observations microscopiques et macroscopiques de la nervation noire des Brassicacées

Figure X : Illustration des interactions entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et une plante-hôte

Problématique du travail de thèse

Figure Y : Représentation schématique de la protéine XopAC et de son mode d'action

Résultats

Déterminants nécessaires à la virulence de *Xcc* sur *A. thaliana*

Figure Z : Distribution des gènes codant des T3SP parmi des souches de *Xanthomonas campestris*

Figure AA : Diversité et fonctionnalité de l'haplotype E de XopAC

Figure AB : Agressivité du mutant *hax* (homolog of *avrBs3* in *Xanthomonas*) de Xca5 sur les écotypes Col-0 et Kas d'*A. thaliana*

Bases moléculaires de la reconnaissance de *xopAC* chez *A. thaliana*

Figure AC : Modèle permettant d'expliquer la reconnaissance de l'ET3 XopAC chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*

Discussion et perspectives

L'immunité vasculaire existe-t-elle réellement

Figure AD : Modèle illustrant l'épistasie de *xopAM* sur *xopAC*

Reconnaissance de *Xcc* chez *A. thaliana*

Figure AE : Inactivation de la PTI par XopAC

Liste des tableaux

Introduction

Mise en place des défenses végétales

Tableau A : Liste des principaux gènes d'avirulence identifiés et de leur gène de résistance correspondant

Présentation de notre modèle d'étude

Tableau B : Liste et caractéristiques des principaux génomes séquencés du genre *Xanthomonas*

Tableau C : Distribution de quelques PAMPs ainsi que de certaines enzymes sécrétées par le système de sécrétion de type 2 (SST2) au sein du genre *Xanthomonas*

Tableau D : Effecteurs de type 3 (TAL non compris) connus chez les *Xanthomonas*

Tableau E : Distribution des gènes codant des effecteurs (effecteurs de type TAL non inclus) connus de *Xanthomonas* chez les souches séquencées

Résultats

Déterminants nécessaires à la virulence de *Xcc* sur *A. thaliana*

Tableau F : Origine des autres souches de *Xanthomonas campestris* récoltées sur Brassicacées utilisées dans cette étude

Bases moléculaires de la reconnaissance de *xopAC* chez *A. thaliana*

Tableau G : Validation des mutants *sxc*

Sommaire

| | |
|---|----------|
| Préambule..... | 1 |
| La plante et les bactéries pathogènes..... | 2 |
| Introduction générale..... | 4 |
| I. Stratégies de virulence des bactéries | 5 |
| I.1 Vue d'ensemble des facteurs de virulence bactériens | 5 |
| I.2 Le système de sécrétion de type 3 et la manipulation du métabolisme de l'hôte | 7 |
| I.2.1 Organisation, structure et régulation du SST3..... | 7 |
| I.3 Les harpines et les effecteurs de type 3 | 10 |
| I.3.1 Les harpines : Quel rôle pour ces protéines sécrétées par le SST3 ? | 10 |
| I.3.2 Les effecteurs de type 3 : protéines majeures de virulence sécrétées/transloquées par le SST3 | 12 |
| I.3.3 Diversité de séquence primaire et redondance fonctionnelle au sein des ET3 | 13 |
| I.3.4 Les ET3 : hijacking du métabolisme de la cellule hôte..... | 16 |
| I.4 Outils permettant d'identifier des déterminants du pouvoir pathogène chez les bactéries..... | 20 |
| I.4.1 Du génotype au phénotype | 20 |
| I.4.2 Du phénotype au génotype | 22 |
| I.4.3 Les facteurs de virulence à travers leur histoire évolutive..... | 25 |
| II. Mise en place de l'immunité innée végétale..... | 27 |
| II.1 Mise en place de la défense basale et de sa suppression par les bactéries | 27 |
| II.1.1 Les PAMPs : activateurs de la PTI | 27 |
| II.1.2 Reconnaissance des PAMPs | 28 |
| II.1.3 Activation de la PTI par les PAMPs | 29 |
| II.1.4 Contournement de l'immunité basale | 31 |
| II.1.5 Suppression de l'immunité par les ET3 | 31 |
| II.2 Mise en place de l'immunité spécifique (ETI) et de sa suppression par les bactéries | 33 |
| II.2.1 Interaction gène d'avirulence et de résistance : le modèle gène-pour-gène | 33 |
| II.2.2 Reconnaissance des protéines Avr | 34 |
| II.2.3 Signalisation en aval des protéines R..... | 37 |
| II.2.4 Contournement de l'immunité spécifique..... | 39 |
| II.2.5 Suppression de l'immunité spécifique par les ET3 | 40 |
| II.2.6 Connexion et similarité entre PTI et l'ETI..... | 41 |
| II.2.7 Spécificité d'hôte et tissulaire : facteurs génétiques et moléculaires..... | 42 |
| III. Présentation de notre modèle d'étude, <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> et du travail de thèse..... | 48 |
| III.1 Le genre <i>Xanthomonas</i> : un bon modèle pour étudier les interactions plantes- bactéries pathogènes | 48 |

| | | |
|---------|---|------------|
| III.1.1 | Caractéristiques générales des <i>Xanthomonas</i> | 48 |
| III.1.2 | Génomique comparative des <i>Xanthomonas</i> | 49 |
| III.2 | Présentation de notre modèle d'étude : <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> .51 | |
| III.2.1 | La nervation noire des Brassicacées : cycle de vie de <i>Xcc</i> | 51 |
| III.2.2 | Facteurs impliqués dans l'interaction plantes hôtes- <i>Xcc</i> | 52 |
| III.2.3 | Composition et fonction de l'effectome de <i>Xcc</i> | 53 |
| IV. | Problématique du travail de thèse..... | 56 |
| IV.1 | Questions et importance du travail de thèse..... | 56 |
| IV.1.1 | Quels sont les loci impliqués dans la virulence de <i>Xcc</i> sur <i>A. thaliana</i> ?..... | 56 |
| IV.1.2 | Existe-il une spécificité tissulaire pour la réponse immunitaire : utilisation de <i>xopAC</i> comme outil pour étudier l'immunité vasculaire chez <i>A. thaliana</i> | 57 |
| IV.2 | Etat des lieux/modèle | 58 |
| IV.3 | Stratégies employées durant la thèse | 59 |
| IV.3.1 | Recherche de loci impliqués dans l'adaptation de <i>Xcc</i> sur sa plante hôte <i>A. thaliana</i> | 59 |
| IV.3.2 | Analyse fonctionnelle de L'ET3 <i>XopAC</i> | 60 |
| | Résultats..... | 62 |
| V. | Quels sont les déterminants nécessaires au pouvoir pathogène de <i>Xcc</i> sur <i>A. thaliana</i> | 63 |
| V.1 | Données supplémentaires..... | 91 |
| V.1.1 | T3SP impliquées dans l'agressivité de <i>Xcc</i> sur <i>A. thaliana</i> | 91 |
| V.1.2 | <i>xopAC</i> code un facteur d'avirulence chez <i>X. campestris</i> | 92 |
| V.1.3 | Les TAL <i>hax2</i> , 3 et 4 sont requis pour l'agressivité de la souche <i>Xca5</i> de <i>Xcc</i> sur l'écotype Kas d' <i>A. thaliana</i> | 92 |
| V.1.4 | Séquence génomique de la souche <i>Xca5</i> de <i>Xcc</i> | 95 |
| V.2 | Discussion..... | 98 |
| V.2.1 | La diversité du répertoire de T3SP plutôt que le nombre d'ET3 contribuerait au pouvoir pathogène..... | 98 |
| V.2.2 | L'étude d'espèces ou souches modèles est elle toujours pertinente ?..... | 99 |
| VI. | Bases moléculaires de la reconnaissance de <i>xopAC</i> chez <i>A. thaliana</i> | 101 |
| VI.1 | Données supplémentaires..... | 128 |
| VI.1.1 | Recherche des cibles végétales de <i>XopAC</i> par voie génétique..... | 128 |
| VI.2 | Discussion..... | 129 |
| VI.2.1 | La reconnaissance de <i>XopAC</i> chez Col-0 requiert deux RLCK | 129 |
| VI.2.2 | Recherche des cibles génétiques de <i>xopAC</i> | 131 |
| | Discussion générale et perspectives..... | 133 |
| VII. | Discussion générale et perspectives..... | 134 |
| VII.1 | L'immunité vasculaire existe-t-elle réellement ? | 134 |
| VII.2 | Reconnaissance de <i>Xcc</i> chez <i>A. thaliana</i> | 135 |
| VII.3 | Vers une meilleure compréhension de l'interaction <i>Xcc</i> -Brassicacées | 137 |

VIII. Que reste-t-il de nos amours ? Que reste-t-il de ces beaux jours ?.....138

Références bibliographiques.....140

“Pourquoi ?,,

Préambule

L'étude des maladies infectieuses est pour certains, un terme souvent rempli de peurs et d'inconnu avec des conséquences désastreuses. En effet, de nombreux événements dévastateurs pour l'Homme tels que la peste noire (qui a ravagé 30 à 50% de la population européenne au XIV siècle) ou encore le mildiou (qui a causé la destruction des pommes de terre et poussé plus de 1,7 millions de personnes à quitter l'Irlande) sont encore présents dans nos esprits. Cependant, l'étude des maladies infectieuses ou en d'autres termes l'étude des microorganismes pathogènes renferme un univers fascinant, plein de surprises et de questions ouvertes laissant place à l'imagination. L'étude des microorganismes pathogènes peut être associée à la rencontre de deux organismes (ou mondes) où la parole est remplacée par des interactions moléculaires entre les molécules de l'hôte et celles de l'agent pathogène. La rencontre entre les deux organismes constitue le point de départ où toutes les questions sont permises et où l'imagination prend place afin de pouvoir se représenter ce dialogue moléculaire invisible à l'œil nu. Comment définit-on un microorganisme pathogène ? Qu'est ce que le pouvoir pathogène ? Qu'est ce que la reconnaissance du non-soi ? Qu'est ce que la réponse immunitaire ? Les réponses à ces quelques questions peuvent nous entraîner au-delà de frontières incroyables mettant en place des stratégies qui peuvent être assimilées à « l'art de la guerre ». L'étude des microorganismes pathogènes étant un champ d'étude très vaste, ce manuscrit se concentrera sur l'étude des bactéries pathogènes des plantes en essayant de comprendre où nous en sommes actuellement sur les connaissances :

- d'une part des stratégies de virulence des bactéries pour coloniser avec succès leurs hôtes
- d'autre part sur les stratégies mises en place par les plantes pour faire face à leurs envahisseurs bactériens.

A: *Ralstonia solanacearum*



B: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*



C: *Xylella fastidiosa*



D: *Erwinia amylovora*



E: *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*



F: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*



Figure A : Exemples de symptômes produits par des bactéries phytopathogènes sur leur plante hôte. A) Symptôme de flétrissement sur la tomate causé par *Ralstonia solanacearum* (Photo de Caitilyn Allen, University of Wisconsin). B) Symptôme d'échaudure sur le riz causé par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (www.Aspnet.org. Photo de Franck White, Kansas State University, Manhattan, Kansas). C) Chlorose sur Agrume causée par *Xylella fastidiosa* (Mansfield *et al.*, 2012). D) Symptôme du feu bactérien sur pommier causé par *Erwinia amylovora* (<http://www.Aspnet.org>. Photo de Alan L. Jones, Department of Botany and Plant pathology Michigan State University). E) Chlorose sur feuille de soja causée par *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (<http://www.forestryimages.org>). F) Symptôme de la tache bactérienne sur tomate causée par *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (<http://www.omafra.gov.on.ca>).

La plante et les bactéries pathogènes

Les interactions entre les plantes et les bactéries pathogènes (aussi dites phytopathogènes) font l'objet de nombreuses attentions car ces bactéries peuvent infecter de nombreuses plantes dont certaines d'intérêt économique telles que le riz, la tomate, la pomme de terre... (**Figure A**). La capacité des bactéries phytopathogènes à ravager des champs de récolte entiers a un impact conséquent sur notre société car cela peut engendrer des pertes économiques et des risques géopolitiques (famine, émigration, réfugiés...). Certaines bactéries telles que *Xanthomonas oryzae* pathovar (pv.) *oryzae* (Xoo ; pathogène responsable de la bactériose vasculaire du riz) représentent une véritable menace en Asie et dans l'Afrique de l'Ouest. Avant l'implantation de variétés de riz résistantes et de mesures de quarantaine stricte, les pertes de récoltes imputées à Xoo au Japon pouvaient atteindre jusqu'à 50%, voire plus dans les régions tropicales (Nino-Liu *et al.*, 2006). Un autre exemple est illustré par le phytopathogène *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*). Cette bactérie est responsable du flétrissement des Solanacées (tomate, pomme de terre...) et cause une perte de 1 milliard de dollar aux Etats-Unis chaque année (Champoiseau *et al.*, 2009).

Cependant, dans la nature, la maladie reste une exception car les bactéries ne sont pas capables d'infecter toutes les plantes et ne sont donc pas en mesure de causer des symptômes de maladie sur toutes les plantes : on parle d'interaction incompatible et compatible. Une interaction est dite compatible lorsqu'une bactérie pathogène est capable d'infecter son hôte et de se multiplier efficacement à l'intérieur de celui-ci, ce qui par la suite se traduira par une apparition des symptômes de la maladie sur la plante. Dans ce cas de figure la bactérie est dite « virulente » car elle possède l'arsenal nécessaire à l'interaction avec la plante c'est-à-dire les déterminants nécessaires à l'établissement de la maladie (acquisition de nutriments et suppression des défenses végétales). Une interaction est dite incompatible lorsqu'une bactérie pathogène n'est pas capable d'infecter une plante hôte ou non hôte. Dans ce cas de figure la bactérie n'est pas capable de se multiplier efficacement à l'intérieur de la plante attaquée ni de produire des symptômes de maladie. La bactérie est donc dite « avirulente » car soit elle ne possède pas l'arsenal nécessaire à l'établissement de la maladie, soit elle est reconnue par la plante hôte qui met alors en place une réaction immunitaire efficace. La reconnaissance et les réactions de défense déployées contre les bactéries pathogènes (c'est-à-dire l'immunité innée des plantes) peuvent être décrites en plusieurs phases selon le modèle du « Zig-Zag » proposé par Jones et Dangl (**Figure B** ; Jones and Dangl, 2006). Dans la phase 1 : la plante reconnaît des motifs moléculaires bactériens appelés Pathogen ou Microbial-Associated Molecular Patterns (PAMP/MAMP) ce qui va permettre d'activer l'immunité basale appelée PAMPs-Triggered Immunity (PTI). Dans

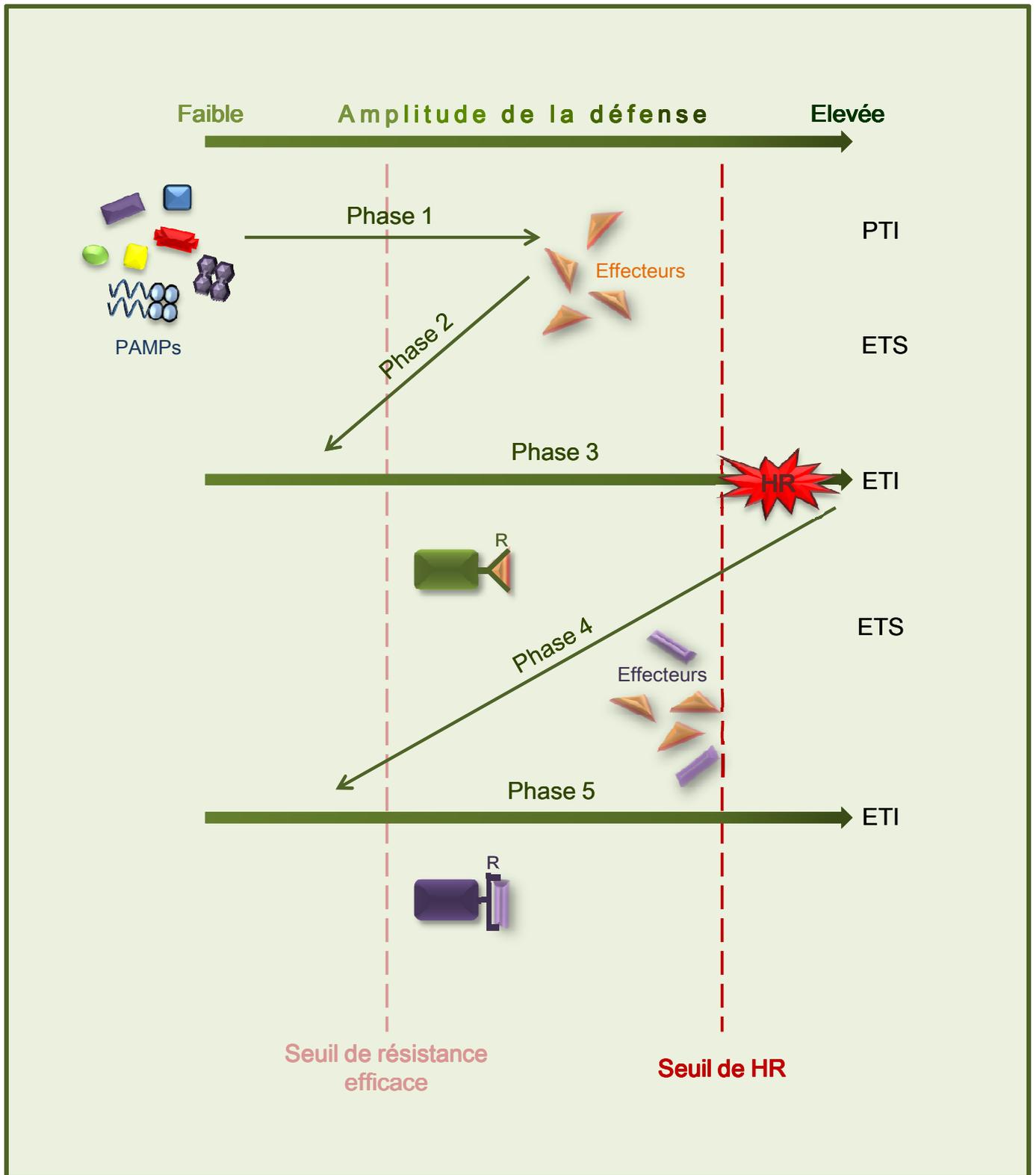


Figure B : Reconnaissance des bactéries et mise en place de l'immunité innée chez les plantes. Phase 1), la plante détecte les PAMPs et induit la voie PTI. Phase 2), le pathogène va délivrer une batterie d'effecteurs qui va bloquer la voie PTI ou permettre la nutrition et la dispersion du pathogène résultant en une sensibilité nommée ETS. Phase 3), un effecteur va être reconnu par une protéine de résistance activant la voie ETI et permettant la mise en place de la HR. Phase 4), les pathogènes ayant perdu l'effecteur beige et/ou ayant un nouvel effecteur (violet) permettant de bloquer la voie ETI sont sélectionnés. Phase 5), L'évolution va alors sélectionner des plantes ayant un nouvel allèle codant une protéine de résistance capable de reconnaître un des nouveaux effecteurs acquis par le pathogène induisant la voie ETI. ETS, Effector-Triggered Susceptibility ; ETI, Effector-Triggered Immunity ; PTI, PAMP-Triggered Immunity ; PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns ; HR, Hypersensitive Response . Adapté de Jones et Dangl, (2006).

la phase 2 : la bactérie va pouvoir supprimer la PTI grâce à des protéines de virulence appelées effecteurs (Effector-Triggered Susceptibility). Certains de ces effecteurs vont aussi permettre la nutrition et la propagation des bactéries. Dans la phase 3 : un des effecteurs est reconnu par une protéine de résistance de la plante qui va permettre la mise en place de l'immunité spécifique appelée Effector-Triggered Immunity, version amplifiée de la PAMPs-Triggered Immunity. Dans la phase 4 : la bactérie va développer d'autres effecteurs capables de supprimer l'Effector-Triggered Immunity et en réponse la plante développera d'autres protéines de résistance capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs (phase 5). Il y a donc une coévolution permanente des deux partenaires.

L'étude du dialogue moléculaire et de l'évolution des déterminants génétiques impliqués dans celui-ci permettra de mieux appréhender le pouvoir pathogène des bactéries ainsi que de mieux caractériser les défenses végétales. L'identification des déterminants génétiques bactériens (importants pour la virulence) et des déterminants génétiques végétaux (importants pour la résistance) représente un enjeu majeur pour élaborer des stratégies de lutttes efficaces, écologiques et pérennes contre les bactéries phytopathogènes.

Dans la suite de ce manuscrit, l'introduction générale traitera dans une première partie du dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie, puis de la notion de spécificité d'hôte et finira sur une présentation de notre bactérie modèle *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et de son positionnement au sein des bactéries du genre *Xanthomonas*. La partie résultats présentera les résultats obtenus au cours de cette thèse notamment sur la recherche de marqueurs génétiques bactériens impliqués dans l'agressivité de *Xcc* sur *Arabidopsis thaliana* ainsi que des bases moléculaires de la reconnaissance de l'effecteur XopAC et de la recherche de ses cibles végétales. Pour finir, la discussion traitera des perspectives de ce travail ainsi que de son apport dans la compréhension de l'interaction *Xcc*-plante hôte.

Introduction générale

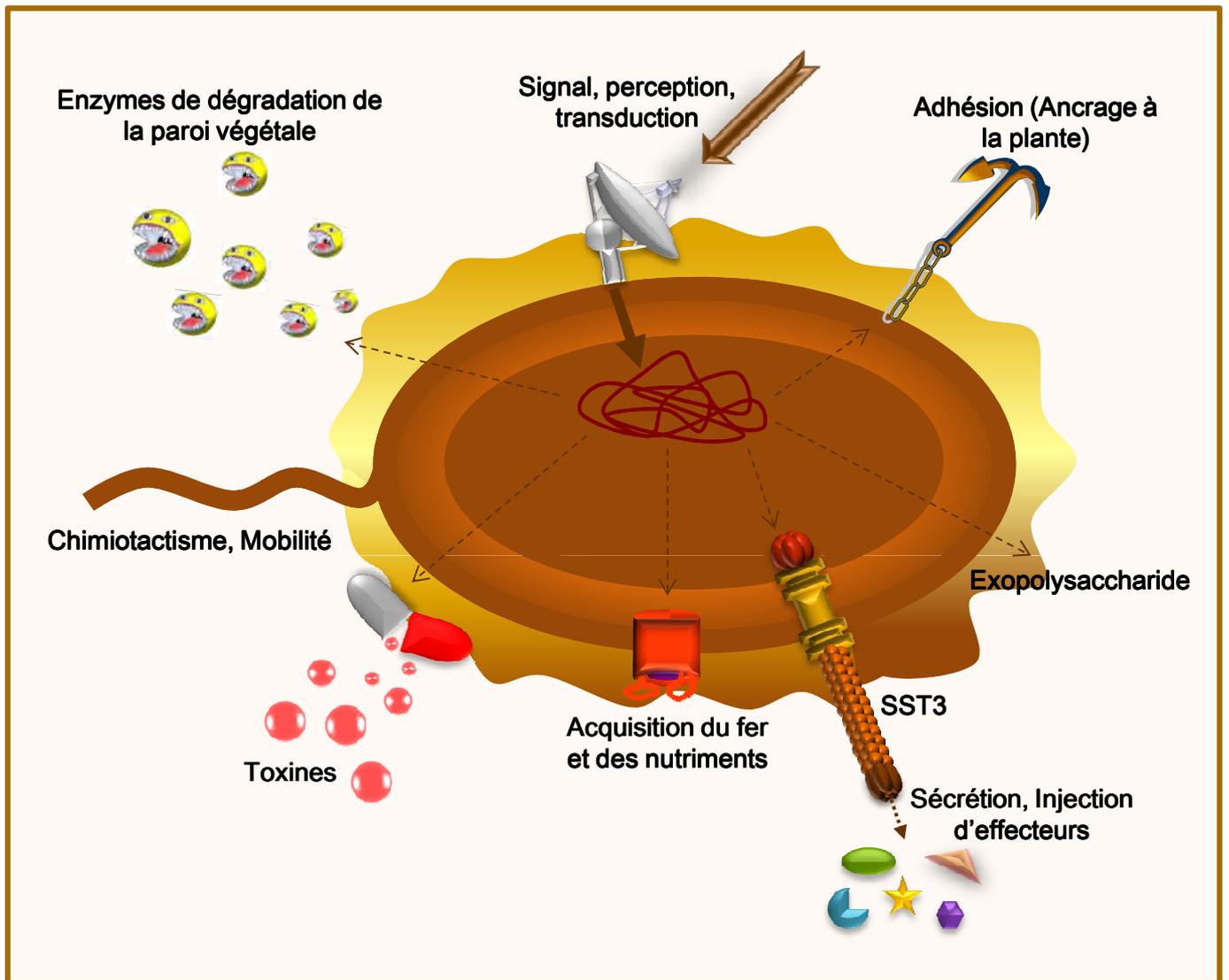


Figure C : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes. Adapté de Boucher *et al.*, (2001).

I. Stratégies de virulence des bactéries

L'une des premières étapes pour les bactéries pathogènes consiste à pénétrer à l'intérieur de la plante afin d'atteindre les tissus ou organes où elles pourront se nourrir, proliférer et assurer la dissémination de l'espèce. Une fois à l'intérieur de la plante, les bactéries perçoivent des signaux végétaux et induisent un ensemble de facteurs de virulence (**Figure C**) qui collectivement vont permettre une colonisation efficace. Toutefois, il est maintenant admis que le système de sécrétion de type III est l'un des facteurs de virulence essentiel au pouvoir pathogène des bactéries à caractère Gram négatif. Ce paragraphe décrira plus particulièrement le système de sécrétion de type 3 (SST3) et son rôle au cours de l'infection en passant brièvement sur le rôle de quelques facteurs de virulence bactériens (**Figure C**) et de leur implication dans la virulence des bactéries.

I.1 Vue d'ensemble des facteurs de virulence bactériens

Le cycle de vie d'un pathogène nécessite au moins deux étapes : une première où il doit assurer sa survie en attendant d'être en contact avec son hôte. Une seconde où le pathogène va devoir coloniser son hôte et faire face aux défenses de l'hôte afin d'assurer sa multiplication. A chacune de ces étapes les bactéries vont devoir mettre en place diverses stratégies afin de s'adapter aux différentes conditions physiologiques et métaboliques qu'elles vont rencontrer.

Outre le fait que la motilité permet aux bactéries de se déplacer vers des environnements favorables (où elles pourront trouver des nutriments, éviter des substances toxiques...), son rôle a aussi été très étudié dans la virulence des bactéries phytopathogènes. Bien qu'il soit compliqué d'émettre une règle générale quant à l'implication de la motilité dans la virulence des bactéries phytopathogènes, il semblerait qu'elle soit importante dans les étapes précoces de l'infection (Tans-Kersten *et al.*, 2001; Hattermann et Ries., 1989; Ichinose *et al.*, 2003). En effet, des études menées chez *R. solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P. syringae* pv. *tabaci*) et *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (*P. syringae* pv. *glycinea*) montrent que le flagelle permet à ces bactéries de se mouvoir vers des composés végétaux. Ces études montrent aussi que la motilité est importante pour l'étape d'invasion (l'entrée dans la plante), mais le serait moins une fois que les bactéries ont réussi à pénétrer à l'intérieur de l'hôte (Hattermann et Ries., 1989 ; Ichinose *et al.*, 2003 ; Malamud *et al.*, 2011; Tans-Kersten *et al.*, 2001). En accord avec ces données, les études menées sur la souche K60 de *R. solanacearum* montrent qu'à l'intérieur de la plante les bactéries sont non motiles suggérant la répression des gènes impliqués dans

celle-ci (Tans-Kersten *et al.*, 2001). L'invasion de l'hôte nécessite également la production d'ExoPolySaccharide (EPS ; Dharmapuri and Sonti, 1999; Kao *et al.*, 1992; Saile *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 2004). Les bactéries épiphytes (bactéries vivant à la surface des parties aériennes des plantes) du genre *Pseudomonas* ou *Xanthomonas* doivent faire face à des stress abiotiques tels que la dessiccation ou les UV. La production d'EPS leur permet d'avoir une enveloppe protectrice permettant de mieux résister à ces stress en attendant de pénétrer à l'intérieur de la feuille (Denny, 1995; Yu *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 2004; Büttner and Bonas, 2009).

Dans la seconde phase de l'infection certaines stratégies sont mises en place afin d'assurer la survie de la bactérie à l'intérieur de l'hôte : telles que la capacité d'acquérir des nutriments, le contournement ainsi que la suppression des défenses de l'hôte. La production d'EPS aura également un rôle important dans cette phase car elle permet à la bactérie de survivre aux conditions défavorables rencontrées *in planta* (Denny, 1995). Une étude réalisée chez *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*X. axonopodis* pv. *manihotis*, pathogène du manioc) montre que les bactéries productrices d'EPS sont plus résistantes au stress oxydatif (H_2O_2 , Kemp *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les bactéries productrices d'EPS sont moins soumises au stress oxydatif produit par la plante au cours de l'infection.

La virulence des bactéries phytopathogènes dépend souvent de systèmes de sécrétion protéiques qui jouent un rôle dans la dégradation de la paroi, l'acquisition de nutriments et la suppression des défenses végétales (Boucher *et al.*, 2001; Genin, 2010; Poueymiro and Genin, 2009; Büttner and Bonas, 2009). Le système de sécrétion de type 2 (SST2) est un exemple d'appareil de sécrétion protéique utilisé par les bactéries durant leur cycle infectieux. Le SST2 permet de sécréter une batterie d'enzymes qui vont dégrader les composants de la paroi végétale (barrière majeure pour l'invasion des pathogènes ; Lagaert *et al.*, 2009). En plus de favoriser l'invasion du pathogène, la dégradation de la paroi végétale permet aussi aux pathogènes d'acquérir des nutriments nécessaires à leur multiplication (Jha *et al.*, 2005). La contribution du SST2 dans le pouvoir pathogène a été étudiée chez de nombreuses bactéries phytopathogènes. Par exemple, la mutagénèse du SST2 (*xps*) chez les bactéries *Xoo* et *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*, pathogène de la tomate et du poivron) entraîne une diminution de l'agressivité de ces bactéries chez leur plante hôte (Ray *et al.*, 2000; Szczesny *et al.*, 2010b). Bien que ces mutants soient affectés dans leur pouvoir pathogène, ils ne sont pas complètement non pathogènes. Ces résultats suggèrent que le SST2 est requis mais non essentiel au pouvoir pathogène des bactéries *Xoo* et *Xcv*.

De façon intéressante, le SST2 pourrait être également impliqué (grâce à la dégradation de la paroi) dans l'assemblage d'un autre système d'export protéique : le SST3 (Szczeny *et al.*, 2010b), Ce dernier étant impliqué dans la suppression des défenses végétales *via* la manipulation du métabolisme de l'hôte (Alfano and Collmer, 2004).

I.2 Le système de sécrétion de type 3 et la manipulation du métabolisme de l'hôte

Le SST3 est un facteur de virulence spécifique des bactéries à caractère Gram négatif. Le SST3 est retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes d'animaux des genres *Salmonella*, *Escherichia* ou *Yersinia* (Cornelis, 2006). Les bactéries pathogènes des plantes des genres *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* et *Xanthomonas* possèdent également un SST3 (Alfano and Collmer, 1997; Cornelis, 2006). Ce dernier est un système d'export protéique permettant la sécrétion/translocation de protéines de virulence bactériennes (Type 3 Secreted Proteins, T3SP). Une majorité d'entre elles vont être injectées directement à l'intérieur de la cellule eucaryote et sont donc appelées Effecteur de Type 3 (ET3). Une fois à l'intérieur de la cellule eucaryote, les ET3 ciblent des molécules eucaryotes afin de manipuler le métabolisme de la cellule hôte et favoriser l'invasion ainsi que la multiplication du pathogène à l'intérieur de l'hôte. Les études réalisées sur le SST3 montrent qu'il est un facteur de virulence essentiel au pouvoir pathogène. En effet, l'inactivation du SST3 chez ces bactéries les rend non pathogènes démontrant ainsi l'importance du SST3 et des protéines transitant par ce système. Chez les bactéries phytopathogènes un mutant dans le SST3 n'est plus capable d'induire de HR (Hypersensitive Response) sur une plante non hôte ou une plante hôte résistante. De ce fait, le SST3 est également appelé « Hypersensitive Response and Pathogenicity » (HRP) chez les bactéries phytopathogènes (Lindgren *et al.*, 1986).

I.2.1 Organisation, structure et régulation du SST3

I.2.1.1 Organisation du SST3

La plupart des gènes *hrp* du SST3 des bactéries phytopathogènes des genres *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* et *Erwinia* est regroupée en cluster sur le chromosome au niveau d'une région qui s'étend sur environ 25 kb (Alfano and Collmer, 1997), excepté pour *Ralstonia* où le cluster *hrp* se situe sur un mégaplasmide (Genin and Boucher, 2004). Le cluster des gènes *hrp* (excepté pour *R. solanacearum*) comporte les caractéristiques typiques des îlots de pathogénie c'est-à-dire : des gènes codants des facteurs de virulence, un pourcentage en GC différent du reste du génome et des régions

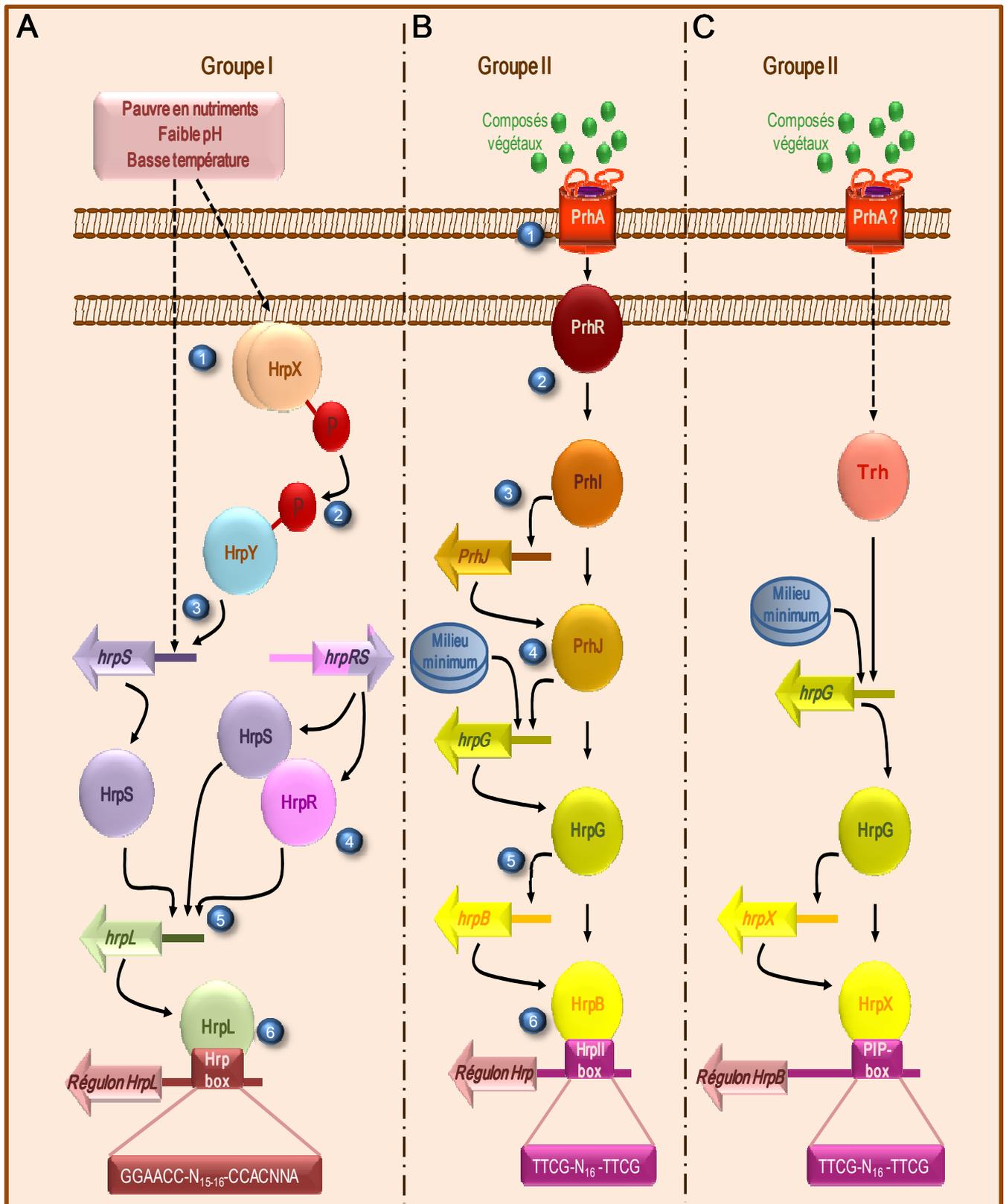


Figure D : Régulation des gènes du SST3 chez les bactéries phytopathogènes. A : 1) Chez *Erwinia*, HrpX perçoit un signal et s'autophosphoryle. 2) HrpX active HrpY par phosphorylation. 3) HrpY active la transcription de *hrpS*. 4) Chez *Pseudomonas syringae*, les protéines HrpR et HrpS forment un hétérodimère. 5) HrpS chez *Erwinia* et HrpS/HrpR chez *P. syringae* activent la transcription de *hrpL*. 6) HrpL reconnaît un motif consensus (*hrp*-box) afin de se fixer au niveau des promoteurs des gènes du régulon HrpL (gènes *hrp*, *hrc*, T3SP et autres) pour activer leur transcription. B : 1) Chez *Ralstonia solanacearum*, PrhA perçoit un signal provenant d'un composé végétal et le transmet à PrhR. 2) PrhR libère le facteur sigma PrhI. 3) PrhI active la transcription de *prhJ*. 4) PrhJ et un signal métabolique inconnu provenant du milieu minimum activent la transcription de *hrpG*. 5) HrpG active la transcription de *hrpB*. 6) HrpB reconnaît un motif consensus (*hrpII*-box) afin de se fixer au niveau des promoteurs des gènes du régulon HrpB (gènes *hrp*, *hrc*, T3SP et autres) pour activer leur transcription. C : Chez les bactéries du genre *Xanthomonas*, la régulation des gènes *hrp* est similaire à celle du genre *Ralstonia*. Il existe quelques différences. Chez le genre *Xanthomonas*, l'homologue de HrpB est appelé HrpX, l'expression de *hrpG* est activée par Trh et la *hrpII*-box est appelée PIP-box (Plant-Inducible Promoter-box). Les gènes permettant le relais entre *prhA* et *trh* n'ont pas encore été identifiés.

flanquantes contenant des éléments génétiques mobiles ainsi que des gènes d'ARNt (Hacker and Kaper, 2000). Tous ces éléments sont caractéristiques d'une acquisition par transfert horizontal (Horizontal Gene Transfert ; HGT). Parmi les gènes *hrp*, 9 gènes sont conservés entre les différentes bactéries phytopathogènes. On retrouve également une conservation entre ces 9 gènes *hrp* et des gènes du SST3 des pathogènes animaux tels que *Yersinia* et *Salmonella* (Alfano and Collmer, 1997; Huang *et al.*, 1995). Ces gènes ont donc été renommés *hrc* (Hrp-Conserved) et la dernière lettre du gène correspond à la dernière lettre des gènes *ysc* du SST3 de *Yersinia*. Les clusters *hrp* sont séparés en deux groupes selon trois critères : le degré de similarité entre les gènes *hrp*, l'organisation structurale des clusters et le mode de régulation des gènes *hrp* (Alfano and Collmer, 1997). Le groupe I regroupe les clusters *hrp* des genres *Erwinia* et *Pseudomonas* et le groupe II ceux des genres *Ralstonia* et *Xanthomonas*.

1.2.1.2 Régulation du SST3

Les gènes *hrp* sont exprimés *in planta* et lorsque les bactéries sont cultivées en présence de cellules végétales (Aldon *et al.*, 2000; Marena *et al.*, 1998). Ces gènes sont également exprimés lorsque les bactéries sont cultivées en milieu minimum (pauvre en nutriments) à basse température et à faible pH. Ces conditions permettent de reproduire les conditions que les bactéries rencontrent dans l'apoplaste (van Dijk *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1992b). L'expression des gènes *hrp* des groupes I et II est activée par des cascades de signalisation différentes (**Figure D**).

Le signal permettant d'induire l'expression des gènes *hrp* du groupe I (**Figure DA**) est perçu et transduit par un système à deux composants. Le senseur histidine kinase HrpX est la protéine qui perçoit le signal. Après perception du signal, HrpX active le régulateur de réponse HrpY. Suite à son activation HrpY va induire l'expression du gène *hrpS*, qui à son tour activera l'expression de *hrpL*. La protéine HrpL (facteur sigma alternatif de type ECF) permet l'activation des gènes *hrp* en se fixant sur une boîte promotrice appelée *hrp*-box (GGAACC-N₁₅₋₁₆-CCACNNA). L'activation de l'expression du gène *hrpL* ne requiert que HrpS chez le genre *Erwinia* alors que son expression requiert HrpR et HrpS chez le genre *Pseudomonas*. Les protéines HrpS et HrpR font partie de la famille des régulateurs à deux composants mais ne possèdent pas le domaine receveur suggérant que l'activation du domaine receveur par phosphorylation n'est pas nécessaire pour l'activation de ces deux protéines. D'autres régulateurs vont intervenir dans la régulation de HrpL mais ne seront pas abordés dans ce manuscrit (Chatterjee *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2000; Wei and Beer, 1995).

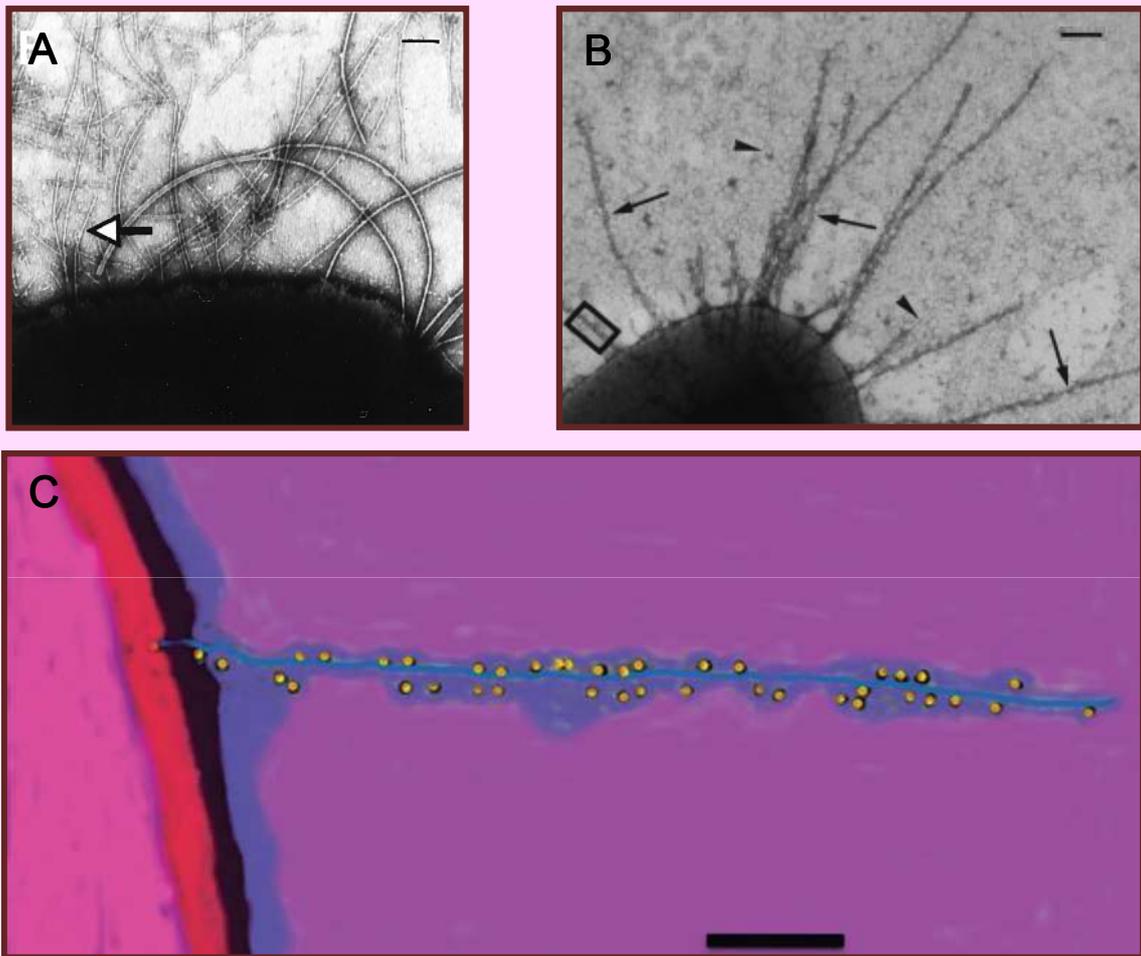


Figure E : Les pili Hrp de différentes bactéries phytopathogènes cultivées dans des milieux inducteurs des gènes *hrp* (photographies de microscopie électronique). A) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Flèche : pilus *hrp* (Roine *et al.*, 1997). Barre = 200 nm. B) *Ralstonia solanacearum* GM1000. Tête de flèche : fimbriae ; flèche : pilus Hrp (Van Gijsegem *et al.*, 2000). Barre = 25 nm. C) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Immunolocalisation de la sous-unité HrpA du pilus Hrp avec des anticorps couplés à des billes d'or (Mansfield *et al.*, 2012). Barre = 25 nm.

La cascade de signalisation permettant d'induire l'expression des gènes *hrp* du groupe II a été mieux caractérisée chez *R. solanacearum*. Ce paragraphe illustrera donc la régulation des gènes *hrp* de *R. solanacearum* et se terminera en décrivant les connaissances actuelles sur la régulation des gènes *hrp* du genre *Xanthomonas*.

Le signal permettant d'induire l'expression des gènes *hrp* du groupe II (**Figure DB**) est perçu et transduit par la protéine (PrhA) qui présente des homologies de séquence avec des protéines appartenant à la famille des TonB-Dependent Transporters (TBDT ; Marena *et al.*, 1998). Le TBDT (PrhA), ancré dans la membrane externe de la bactérie, perçoit un signal non diffusible, résistant aux protéases et à la chaleur, au niveau de la paroi végétale. Suite à la perception du signal, PrhA va induire une cascade de signalisation permettant de lever l'inhibition du facteur sigma PrhI, exercée par le facteur anti-sigma PrhR. Suite à sa libération, PrhI active l'expression du gène *prhJ* qui est un activateur transcriptionnel de la famille LuxR/UhpA. L'activateur transcriptionnel PrhJ permet l'activation de l'expression du gène *hrpG* (régulateur de réponse de la sous famille *ompR* des systèmes à deux composants). Cette cascade d'activation séquentielle prend fin avec l'activation du gène *hrpB* par HrpG. Une fois activé, l'activateur transcriptionnel (activateur transcriptionnel de type AraC), HrpB, va pouvoir activer l'expression des gènes *hrp* en se fixant sur une boîte promotrice appelée *hrpII*-box (TTCG-N₁₆-TTCG ; Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2002; Genin *et al.*, 1992; Marena *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter, que bien qu'ayant des homologies de séquences avec des systèmes d'acquisition du fer, l'activation de PrhA n'est pas régulée par le fer (Marena *et al.*, 1998). A ce jour le signal végétal reconnu par PrhA n'a pas encore été identifié, bien qu'il semble dépendant du contact avec la paroi des cellules végétales (Aldon *et al.*, 2000).

Chez le genre *Xanthomonas*, l'homologue du gène *hrpB* est codé par le gène *hrpX* (Kamdar *et al.*, 1993; Wengelnik and Bonas, 1996). Afin d'activer les gènes *hrp*, l'activateur transcriptionnel HrpX se fixe sur l'équivalent de la *hrpII*-box appelée PIP-box (TTCG-N₁₆-TTCG ; Plant-Inducible Promoter-box) chez le genre *Xanthomonas* (Fenselau and Bonas, 1995; Wengelnik *et al.*, 1996). De façon similaire à *R. solanacearum*, l'expression du gène *hrpX* est activée par HrpG (Wengelnik *et al.*, 1996). Aucun gène *prh* (excepté peut être un homologue de *prhA*) n'a été identifié chez le genre *Xanthomonas*, suggérant que l'activation de l'expression du gène *hrpG* ne passe pas par le gène *prhJ*. Chez *Xoo*, l'expression du gène *hrpG* est activée par un autre gène appelé *trh* (Tsuge *et al.*, 2006). Un homologue du gène *prhA* de *R. solanacearum* a été identifié chez *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) (Zou *et al.*, 2006). Toutefois, l'activation des gènes *hrp* par l'homologue de PrhA identifié chez *Xoc* reste à démontrer. De même, les gènes qui vont permettre de faire le lien entre PrhA et Trh restent à identifier (**figure DC**).

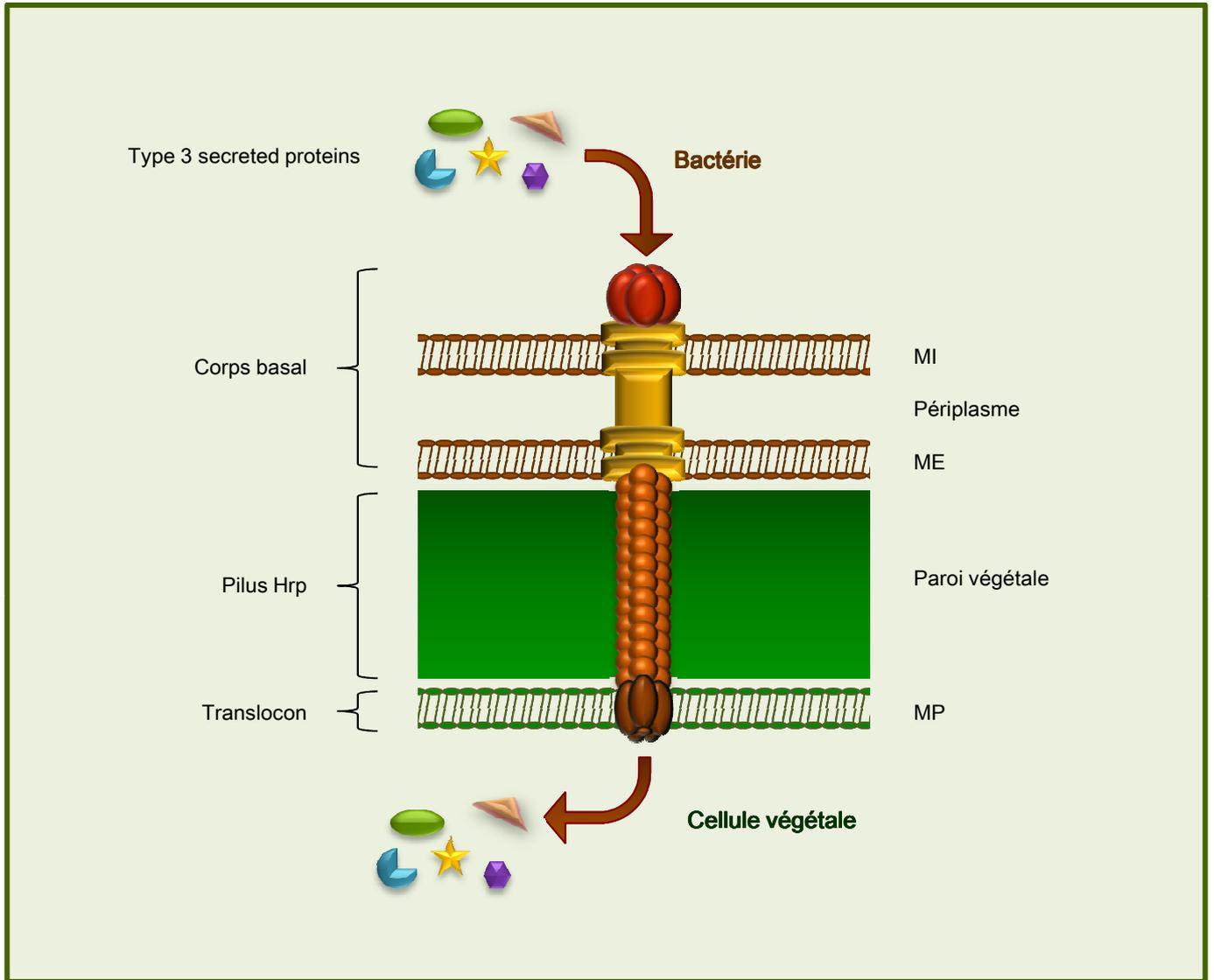


Figure F : Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III des bactéries phytopathogènes et de son ancrage dans les structures membranaires végétales. Le corps basal du SST3 (en jaune et rouge) est dans la double membrane bactérienne. Il est prolongé par le « pilus Hrp » (en orange) qui traverse la paroi végétale et par le « translocon » (en marron), ancré dans la membrane plasmique de la cellule végétale. Ces structures assurent le cheminement et l'injection dans la cellule végétale des substrats du système appelés « effecteurs de type III ». MI, Membrane Interne de la bactérie ; ME, Membrane externe de la bactérie ; MP, Membrane Plasmique de la cellule végétale. D'après Büttner et Yang He, (2009).

I.2.1.3 Structure du SST3

L'activation des gènes *hrp* va permettre l'expression des protéines impliquées dans l'assemblage du SST3, ainsi que des T3SP qui vont transiter par le SST3 (**Figure E**). La structure et la fonction du SST3 évoquent celles d'une seringue. L'aiguille est représentée par un long tube protéique filamentueux appelé « pilus » (**Figure E**). Le SST3 est composé de trois parties : le corps basal, le pilus Hrp et le translocon (**Figure F**). Le corps basal permet de traverser la paroi bactérienne et est composé des protéines HrcR, S, T, U, V, J, Q, N et C. De façon intéressante, les gènes codant le corps basal (excepté *hrcC*) sont similaires aux gènes du corps basal du flagelle suggérant un assemblage et un fonctionnement similaires (Van Gijsegem *et al.*, 1995). Le pilus Hrp est un canal creux extracellulaire composé de l'assemblage de plusieurs sous-unités protéiques appelées pilines. La protéine piline est appelée HrpA chez *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), HrpY chez *R. solanacearum* et HrpE chez *Xanthomonas*. Le diamètre du pilus Hrp mesure 6-8 nm. Contrairement aux pathogènes animaux où la longueur de l'aiguille ne dépasse pas 60 nm, le pilus Hrp peut atteindre plusieurs micromètres de longueur (jusqu'à 12 µm chez *R. solanacearum*). Cette différence de longueur est vraisemblablement liée à la présence d'une paroi épaisse au niveau de la cellule végétale qui nécessite une taille de pilus suffisamment grande pour la traverser entièrement (Cornelis, 2006; Roine *et al.*, 1997a; Roine *et al.*, 1997b; Van Gijsegem *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2005). Le pilus Hrp pourrait se terminer par une structure protéique appelée translocon (reste à démontrer) qui serait composée des protéines PopF1 et PopF2 chez *R. solanacearum*, HrpF et XopA chez le genre *Xanthomonas* et HrpK chez *P. syringae* (Buttner *et al.*, 2002; Buttner, 2012; Meyer *et al.*, 2006; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005).

Le translocon permettrait de faire le lien entre la cellule hôte et l'extrémité du pilus Hrp formant ainsi un pore à travers la membrane plasmique afin que les effecteurs puissent être délivrés à l'intérieur de la cellule végétale (Alfano and Collmer, 1997; Cornelis, 2006).

I.3 Les harpines et les effecteurs de type 3

I.3.1 Les harpines : Quel rôle pour ces protéines sécrétées par le SST3 ?

Parmi les protéines transitant par le SST3, les harpines sont les premières à avoir été identifiées et leur statut est encore très énigmatique à ce jour. Les protéines harpines regroupent une famille de protéines riches en glycine, qui ne comportent pas de cystéine dans leur séquence protéique, qui résistent à la chaleur mais pas aux protéases et qui sont

sécrétées par le SST3. De plus, ces protéines sont capables d'induire des HR quand elles sont infiltrées dans l'apoplaste de plantes de tabac ou d'autres plantes. Les deux premières protéines harpines identifiées sont codées par les gènes *hrpN* de *Erwinia amylovora* (*E. amylovora*) et *hrpZ* de l'espèce *P. syringae* (He *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1992a). Les harpines ont été initialement définies comme étant les protéines majeures de virulence (traversant le SST3) car un mutant dans le gène codant *hrpN* de *E. amylovora* est très affecté dans sa capacité de produire une HR sur le tabac ou des symptômes sur des poires immatures (Wei *et al.*, 1992a). Cependant, l'identification de nouvelles harpines telles que PopA de *R. solanacearum* ou HrpW de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) infirme cette hypothèse (Charkowski *et al.*, 1998; Gaudriault *et al.*, 1998; Kim and Beer, 1998). En effet, un mutant dans le gène codant PopA de *R. solanacearum* est toujours capable d'induire une HR chez le tabac et des symptômes de flétrissement chez la tomate (Arlat *et al.*, 1994). Les mêmes résultats sont obtenus avec des mutants dans le gène codant HrpW de *E. amylovora* et de *Pss* (Charkowski *et al.*, 1998; Kim and Beer, 1998). Ces résultats montrent que d'autres protéines transitant par le SST3 sont impliquées dans les phénotypes observés sur plante.

Les harpines pourraient jouer un rôle dans la perméabilisation de la paroi végétale en permettant l'insertion du translocon dans la membrane de la cellule hôte, facilitant ainsi une distribution efficace des ET3 dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette hypothèse actuelle provient de plusieurs expériences qui montrent que PopA et HrpZ sont capables de se lier à des bicouches lipidiques et de former des pores à travers ces dernières (Lee *et al.*, 2001; Racape *et al.*, 2005). De façon intéressante, la formation d'un pore à travers la bicouche lipidique de la membrane de la cellule végétale permettrait aux harpines de perturber les flux ioniques de la cellule et donc la libération de nutriments de la cellule vers l'apoplaste (milieu pauvre en nutriment) pour les bactéries. La protéine HrpW possède un domaine pectate lyase en C-terminal. La présence de celui-ci pourrait permettre à HrpW de dégrader la pectine se trouvant dans la paroi. Cependant, aucune activité pectate lyase n'a été identifiée bien que la protéine soit capable de se lier à des pectates (Charkowski *et al.*, 1998). De plus, une étude réalisée chez *E. amylovora* montre que la translocation de l'effecteur DspA/E dans les cellules végétales requiert la présence de HrpN mais sa présence n'est pas requise pour la sécrétion *in vitro* (Bocsanczy *et al.*, 2008). Un autre exemple est illustré par la harpine XopA qui est requise pour le pouvoir pathogène et la multiplication *in planta* de *Xcv* sur le poivron (Noel *et al.*, 2002). Cette harpine pourrait prendre part à la formation du translocon et ainsi participer à l'injection des ET3 dans la cellule hôte (Buttner, 2012).

Ces résultats suggèrent que les harpines assistent la mise en place du SST3 et permettent une translocation efficace des vraies protéines de virulence dans la cellule végétale que sont les effecteurs de type III.

1.3.2 Les effecteurs de type 3 : protéines majeures de virulence sécrétées/transloquées par le SST3

Les ET3 sont des protéines qui sont sécrétées puis transloquées à l'intérieur de la cellule hôte *via* le SST3. En général, l'expression des gènes codant les ET3 est activée par les régulateurs clés du SST3. Actuellement, les ET3 sont reconnus comme étant les protéines majeures de virulence injectées à l'intérieur de la cellule par le SST3. Le signal permettant la sécrétion et la translocation des ET3 n'a pas encore clairement été identifié. L'absence d'un signal connu pour cibler les ET3 vers le SST3 complique fortement l'identification de ces derniers *in silico*. Cependant, de nombreuses études montrent que le domaine N-terminal est indispensable pour la sécrétion et la translocation des ET3 et que le domaine « effecteur » réside dans la région C-terminale (Guttman and Greenberg, 2001; Mudgett *et al.*, 2000). De plus, une étude réalisée chez *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000 montre que certaines propriétés biophysiques peuvent être identifiées dans la partie N-terminale des ET3 (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Par exemple, la présence d'acides aminés hydrophiles, l'absence de résidus acides dans les 12 premiers acides aminés, un biais pour la sérine et la glutamine dans les 50 premiers acides aminés. L'identification de ces propriétés biophysiques constitue une prémisse dans l'identification d'un signal permettant la sécrétion et la translocation des ET3. Elles ont d'ailleurs permis la découverte de nouveaux ET3 *in silico* chez *Pto* DC3000 qui ont été validés expérimentalement (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Pour certains ET3, la présence d'un signal de sécrétion en N-terminal n'est pas suffisante pour avoir une sécrétion maximale. Dans ce cas, la sécrétion de ces ET3 nécessite la présence de chaperonnes. Bien que la sécrétion de certains ET3 requière la présence de chaperonnes spécifiques, certaines sont moins spécifiques et interviennent de façon générale dans la sécrétion des ET3 (Buttner and He, 2009). Par exemple, chez *Xcv* la sécrétion des ET3 a été divisée en deux classes : la classe A regroupe des ET3 dont la sécrétion est dépendante de la chaperonne HpaB alors que la classe B regroupe des ET3 dont la sécrétion est indépendante de HpaB (Buttner *et al.*, 2006).

Une fois à l'intérieur de la cellule, ces protéines vont pouvoir altérer le métabolisme de la cellule hôte afin de supprimer la réponse immunitaire de la plante. Actuellement, les ET3 sont reconnus comme étant les protéines de virulence qui transitent à travers le SST3.

La contribution des ET3 dans le pouvoir pathogène des bactéries a été très étudiée, [pour revue (Alfano and Collmer, 2004; Kay and Bonas, 2009; Poueymiro and Genin, 2009)]. Ce manuscrit propose donc de voir sous un angle différent de quelle façon ces protéines contribuent au pouvoir pathogène des bactéries.

1.3.3 Diversité de séquence primaire et redondance fonctionnelle au sein des ET3

Etudier comment un ET3 va pouvoir réaliser sa fonction de virulence durant l'infection n'est pas facile car plusieurs facteurs vont venir complexifier l'analyse fonctionnelle d'un effecteur en particulier.

Le premier facteur est l'activité enzymatique. Il est très difficile d'attribuer une activité enzymatique aux effecteurs car bon nombre d'entre-eux n'ont pas d'homologies de séquences ou de structures avec d'autres protéines autres que les effecteurs eux-mêmes. Néanmoins, l'étude de ces effecteurs sans « activité enzymatique connue » requiert notre attention car elle permet de trouver de nouvelles activités enzymatiques et de nouveaux outils moléculaires pour étudier l'immunité innée végétale. Un exemple est illustré par l'ET3 VopS de *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus* pathogène animal). L'effecteur VopS possède un domaine Fic en C-terminal (Filamentation Induced by CAMP). Le domaine Fic est impliqué dans la division cellulaire *via* le métabolisme de l'acide folique chez *E. coli* (Komano *et al.*, 1991). L'effecteur VopS de *V. parahaemolyticus* est capable d'induire une cytotoxicité dans des cellules animales en ciblant des Rho-GTPases. Celles-ci sont des petites protéines régulatrices du cytosquelette des cellules eucaryotes. L'effecteur VopS modifie post-traductionnellement les Rho-GTPases par adénylylation (addition d'un groupement AMP *via* un ATP sur un résidu thréonine) ce qui entraîne l'inactivation des Rho-GTPases (Yarbrough *et al.*, 2009). Cette étude est la première à démontrer l'activité enzymatique du domaine Fic. Bien que la modification de protéine par adénylylation fût déjà connue, aucune enzyme ou domaine protéique avant ce travail n'avait été montré comme étant capable de catalyser cette réaction.

Le deuxième facteur complexifiant l'analyse d'un ET3 est la diversité d'activités enzymatiques présente chez les ET3. En effet, les études réalisées sur les ET3 ont permis de les classer dans des familles enzymatiques. Cependant, la classification d'ET3 au sein de familles enzymatiques ne permet pas forcément d'attribuer une fonction ou un mode d'action aux ET3. Un exemple est bien illustré par la famille des protéases à cystéine. Tous les membres de cette famille possèdent une triade catalytique (H[D/E]C) nécessaire à leur activité biologique. Le membre historique de cette famille est représenté par l'effecteur YopJ

de *Yersinia pestis*. Cet effecteur réalise sa fonction de virulence en acétylant certaines MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), bloquant ainsi la transduction du signal permettant l'activation des défenses et est donc une acétyl transférase et non pas une protéase (Mukherjee *et al.*, 2006). Des protéines faisant partie de la famille des protéases à cystéine sont également présentes chez les bactéries phytopathogènes, notamment l'effecteur PopP2 de *R. solanacearum* qui possède également une activité acetyltransférase (Tasset *et al.*, 2010). Cependant, deux autres effecteurs, XopD de *Xcv* et AvrRpt2 de *P. syringae*, bien qu'ayant la triade catalytique permettant de les classer dans la famille des protéases à cystéines, possèdent des activités enzymatiques différentes. L'effecteur XopD possède une activité SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifier) protéase qui va lui permettre d'enlever le groupement SUMO (modification post-traductionnelle permettant de moduler l'activité biologique des protéines) des protéines végétales (Hotson *et al.*, 2003). L'effecteur AvrRpt2 est une protéase qui clive la protéine végétale RIN4 (Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b). Un autre exemple est illustré par la famille fido (Fic, Doc and AvrB). Cette famille regroupe des protéines qui ont un domaine Fic ou Doc (Death On Curing) possédant le motif consensus (HPFx[D/E]GN[G/K]R). La famille fido regroupe également des protéines qui ne possèdent pas le motif consensus mais un domaine structural similaire à celui du domaine Fic ou Doc tel que AvrB de *P. syringae* (Kinch *et al.*, 2009). Comme expliqué précédemment le domaine Fic de VopS possède une activité enzymatique d'AMP transferase tandis que l'effecteur AvrB possède une activité enzymatique kinase. La protéine de virulence AnkX de *Legionella pneumophila* injectée par le système de sécrétion de type 4 possède une activité phosphocoline transferase (ajout d'un groupement phosphatidyl choline *via* un CDP-choline ; Mukherjee *et al.*, 2011). Cette étude est la première montrant qu'une protéine (voire un domaine enzymatique) est capable d'utiliser la CDP-choline pour former une modification post-traductionnelle stable. Une étude récente montre que l'ET3 XopAC (protéine avec un domaine Fic) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) modifie des protéines végétales par uridylylation (ajout d'un groupement UMP *via* un UTP ; Feng *et al.*, 2012).

Le dernier exemple concerne la famille des ET3 de type TAL (Transcription Activator-Like). Les ET3 de type TAL sont capables de rentrer dans le noyau des cellules hôtes et de se fixer sur les promoteurs de certains gènes afin d'activer leur expression. Le gène *avrBs3* de *Xcv* est le membre historique de la famille TAL (Bonas *et al.*, 1989). De nombreux homologues de *avrBs3* ont été identifiés au sein du genre *Xanthomonas* (*X. oryzae*, *X. citri*, *X. axonopodis*, *X. campestris*) mais également chez *R. solanacearum* (Athinuwat *et al.*, 2009; Cunnac *et al.*, 2004; De Feyter *et al.*, 1993; Hopkins *et al.*, 1992; Kay *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 1992). Les membres de cette famille sont définis en raison d'un certain nombre de domaines communs qu'ils possèdent au sein de leur séquence protéique et qui

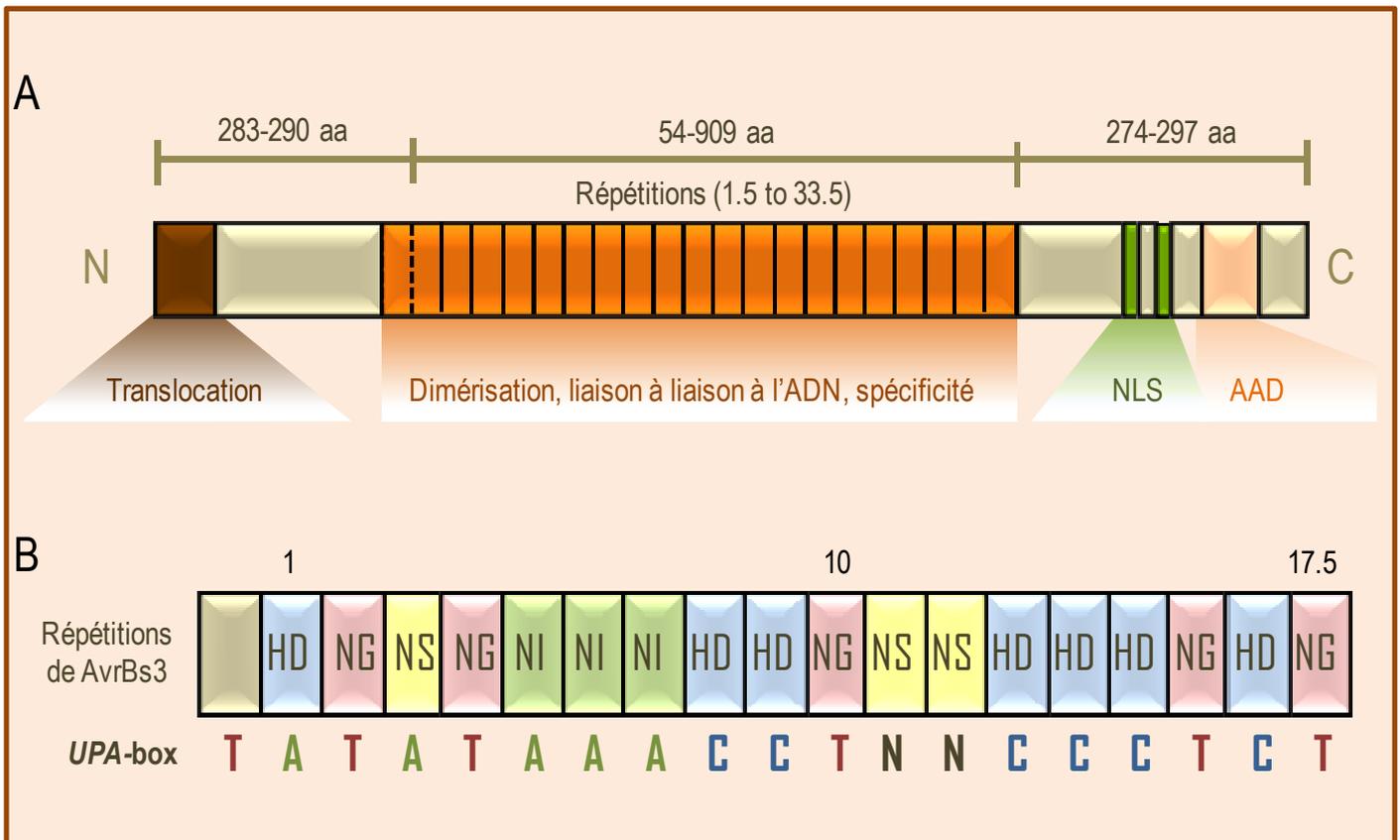


Figure G : Domaines fonctionnels des effecteurs TAL du genre *Xanthomonas*. A) Le domaine N-terminal contient le domaine de translocation par le SST3. Le domaine C-Terminal renferme les domaines NLS (Nuclear Localisation Sequence) et AAD (Acidic Activation Domain) qui sont nécessaires au transport dans le noyau et à l'activation de gènes cibles. Le nombre de répétitions dans le domaine de liaison à l'ADN varie entre 1.5 et 33.5. B) Structure du domaine de liaison à l'ADN de AvrBs3. Les 17.5 répétitions sont presque identiques, seuls les acides aminés 12 et 13 de chaque répétition sont variables (RVD) et sont indiqués sur la figure. La séquence UPA-box schématisée représente la correspondance « RVD-base nucléotidique ». RVD : Repeat-Variable Diresidue. D'après Boch and Bonas, (2010).

sont nécessaires à leur fonction (**Figure GA** ; Boch and Bonas, 2010). Le domaine N-terminal est le domaine requis pour la sécrétion et la translocation *in planta* par le SST3. Le domaine C-terminal renferme les séquences NLS (Nuclear Localization Sequence) et AAD (Acidic Activation Domain) qui sont nécessaires aux transports de la protéine dans le noyau et à l'activation de gènes cibles. Suite à sa translocation dans la cellule, ces ET3 s'homodimérisent et interagissent avec l'importine α *via* les NLS afin d'être transloqués dans le noyau où les protéines se fixent à des séquences spécifiques (Gurlebeck *et al.*, 2006; Kay and Bonas, 2009; Szurek *et al.*, 2001; Szurek *et al.*, 2002). La dimérisation des TALs et la fixation à l'ADN sont dues à un domaine répété au milieu de la protéine (**Figure GA** ; Boch *et al.*, 2009; Gurlebeck *et al.*, 2005). Chez AvrBs3, le domaine répété comprend 17.5 répétitions de 34 aa (Bonas *et al.*, 1989). Les séquences répétées ainsi que les domaines N et C-terminal sont très conservés entre les différents TALs (Boch and Bonas, 2010). Cependant, au milieu des séquences répétées il existe deux résidus (aa 12 et 13) hypervariables (Repeat-Variable Diresidue ; RVD) qui confèrent la spécificité d'interaction entre le TAL et l'ADN. La reconnaissance des promoteurs cibles des TALs est contrôlée par la relation « RVD-base nucléotidique » où à chaque RVD va correspondre une base (**Figure GA et B**). La séquence RVD d'un TAL va donc directement correspondre à la séquence nucléotidique du site de liaison situé dans chaque promoteur (Boch *et al.*, 2009; Bonas *et al.*, 1989; Moscou and Bogdanove, 2009). Bien que cette famille possède des caractéristiques communes, la diversité des résidus RVD fait que chaque TAL active un ensemble de gènes qui lui sont propres.

Le troisième facteur complexifiant l'étude d'un ET3 concerne la redondance fonctionnelle. Plusieurs études ont montré que la délétion d'un ou plusieurs effecteurs n'a pas de conséquence sur le pouvoir pathogène des bactéries. En effet, les bactéries phytopathogènes vont pouvoir transloquer un grand nombre d'effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte, il y en aurait au moins 30 chez *Pto* DC3000, 30 chez *Xcv* et jusqu'à 74 chez *R. solanacearum* (O'Brien *et al.*, 2011; Poueymiro and Genin, 2009; White *et al.*, 2009). Avec un aussi grand nombre d'effecteurs injectés par bactérie dans la cellule hôte il est assez facile d'imaginer qu'un ou plusieurs effecteurs pourront compenser l'absence d'un effecteur. En effet, des études de pouvoir pathogène réalisées chez *Pto* DC3000 montrent que la délétion de plusieurs effecteurs est requise pour réduire le pouvoir pathogène de cette bactérie sur *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana* ; Cunnac *et al.*, 2011; Kvitko *et al.*, 2009). La redondance fonctionnelle peut intervenir de plusieurs façons (**Figure H**) : i) les effecteurs vont cibler la même protéine pour réaliser leur fonction de virulence. Toutefois, la cible ne sera pas modifiée de la même façon par chaque effecteur : tel est le cas pour la

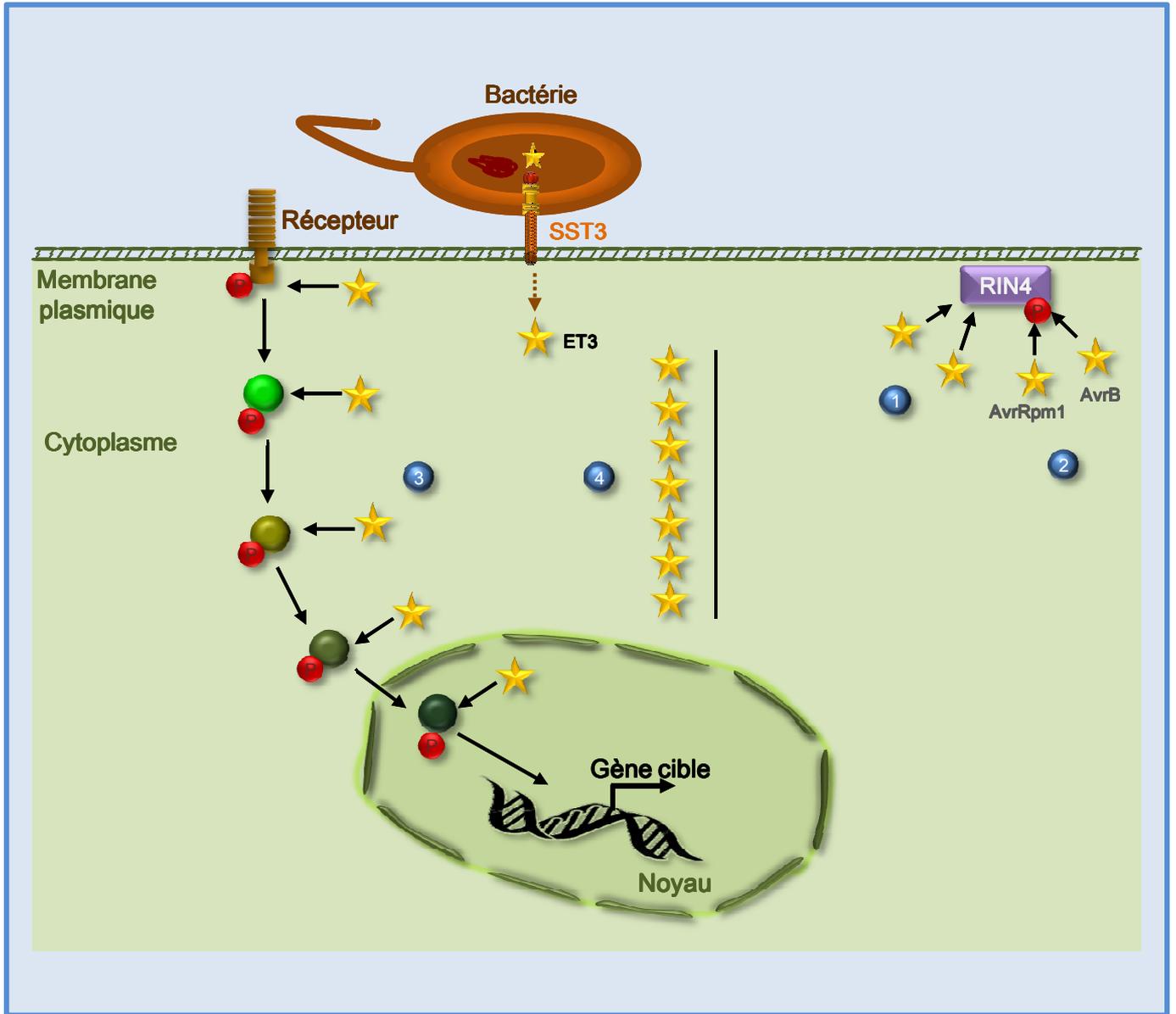


Figure H : Redondance fonctionnelle au sein des effecteurs. Plusieurs effecteurs vont cibler la même protéine végétale mais avec des activités enzymatiques différentes (1) ou similaires (2). Les effecteurs vont cibler la même voie de signalisation mais inhiber différentes cibles (3). Certains effecteurs font partie de familles multigéniques. L'absence d'un membre pourrait être compensée par les autres membres de la famille (4).

protéine végétale RIN4 qui est ciblée par plusieurs effecteurs de *P. syringae* (Deslandes and Rivas, 2012) ; ii) les effecteurs ont la même cible et réalisent la même modification post-traductionnelle sur leur cible commune. Par exemple, les effecteurs AvrB et AvrRpm1 sont tous les deux impliqués dans la modification post-traductionnelle de la protéine végétale RIN4 par phosphorylation (Mackey *et al.*, 2002) ; iii) les effecteurs vont cibler des voies de signalisations communes mais affecter différentes composantes de la voie de signalisation ; iv) chez *R. solanacearum* plusieurs effecteurs font partie de familles multigéniques. Les protéines de la famille GALA regroupent 7 gènes, qui ont été nommées ainsi car elles possèdent toutes un domaine LRR (Répétitions Riche en Leucine) qui renferme un motif consensus GAXALA. Les études de pouvoir pathogène réalisés sur *A. thaliana* montrent qu'aucun des simples mutants n'est affecté dans le pouvoir pathogène (Angot *et al.*, 2006). Seul le sextuple mutant est affecté dans son pouvoir pathogène (Angot *et al.*, 2006). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les ET3 GALA pourraient compenser mutuellement leur absence (**Figure H**).

Les effecteurs vont présenter une diversité d'activités enzymatiques et d'activités fonctionnelles redondantes qui vont complexifier leurs analyses. La redondance fonctionnelle est un moyen efficace pour compenser l'absence d'un ou plusieurs effecteurs. De façon intéressante, ce système peut aussi compenser l'absence ou la modification de la cible par la cellule hôte. Les bactéries ont donc acquis un système efficace pour s'assurer de coloniser leurs plantes hôtes avec succès. Cette colonisation passe par la manipulation de certains processus cellulaires essentiels au métabolisme de la cellule hôte qui sont détournés au profit de la bactérie.

1.3.4 Les ET3 : hijacking du métabolisme de la cellule hôte

Afin de pouvoir réaliser leur fonction de virulence de nombreux effecteurs vont pouvoir interférer avec des processus physiologiques indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Cibler des processus physiologiques clés permet la suppression des réactions de défenses et l'acquisition des nutriments (**Figure I**).

1.3.4.1 Altération du transcriptome de la plante

L'activité de plusieurs ET3 résulte dans leur capacité à modifier l'expression de gènes de l'hôte. Comme cité ci-dessus, les ET3 de type TAL sont capables d'activer l'expression de certains gènes et vont donc directement moduler le transcriptome de la cellule végétale. Par exemple, l'ET3 AvrBs3 induit un certain nombre de gènes (gènes *upa*), dont le gène *upa20*. Le gène *upa20* code un facteur de transcription qui induit à son tour l'expression d'un gène (expansine) impliqué dans la croissance de la cellule végétale. La protéine AvrBs3 peut

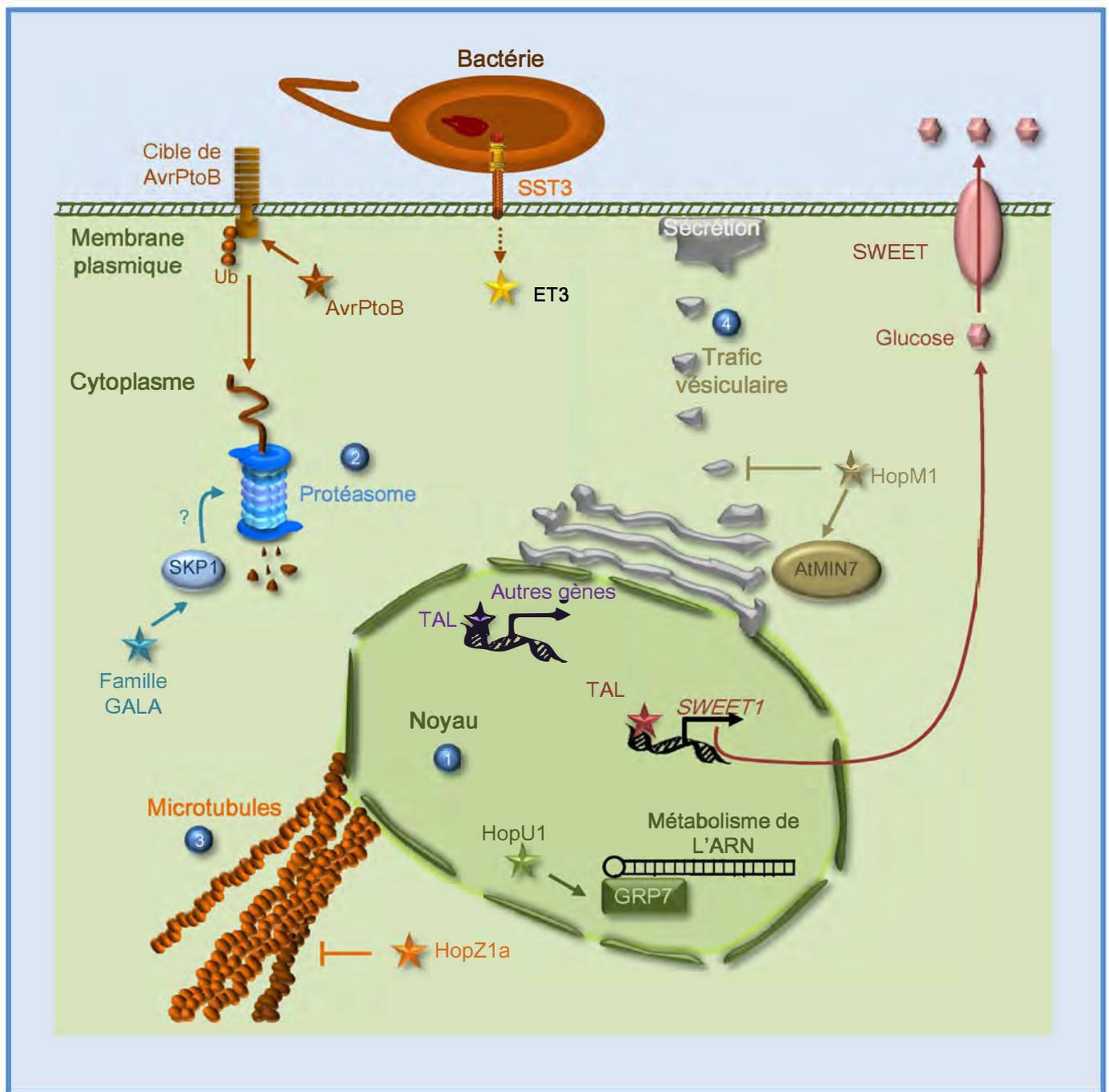


Figure 1 : Manipulation du métabolisme de la cellule par les effecteurs. 1) Certains ET3 vont altérer le transcriptome de la cellule hôte soit en permettant l'expression de gènes cibles (TAL), soit en altérant le métabolisme des ARN, tel que HopU1 qui inhibe la protéine GRP7 (protéine régulatrice du métabolisme des ARN). 2) Certains ET3 (AvrPtoB) vont altérer le protéasome de la cellule hôte en induisant directement la dégradation de protéines cibles. Ce mode d'action reste à démontrer pour les ET3 de la famille GALA. 3) L'ET3 HopZ1a inhibe la polymérisation des microtubules. 4) Altération du trafic vésiculaire de la cellule hôte. L'ET3 HopM1 inhibe la protéine AtMIN7 qui est un régulateur du trafic vésiculaire. Adapté de Deslandes and Rivas, (2012).

directement activer l'expression de *upa20* en se fixant au niveau du promoteur de ce dernier sur une boîte promotrice appelée UPA-box (UPregulated by AvrBs3-box) contenant une séquence nucléotidique correspondant à la séquence des RVD de l'ET3 AvrBs3 (**Figure GB et J**). Cette hypertrophie cellulaire permet d'assister la multiplication bactérienne à l'intérieur des espaces intercellulaires (Boch *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2007; Marois *et al.*, 2002). Toutefois, la contribution de cette hypertrophie de la cellule hôte dans la virulence de la bactérie n'a pas encore été démontrée. Chez le pathogène du riz Xoo PXO99, l'ET3 TAL PthXo1 induit l'expression d'un gène impliqué dans le transport de sucre (*OsSWEET11*) pour permettre l'export de glucose vers le xylème qui peut être utilisé par la bactérie (Chen *et al.*, 2010). Des effecteurs tels que les TAL vont affecter le transcriptome de l'hôte en modulant directement la transcription de certains gènes tandis que d'autres ET3 vont perturber l'activité de facteurs de transcription. Par exemple, l'ET3 XopD de la souche B100 de *Xcc* interagit et inhibe un facteur de transcription (ATMYB30) qui régule positivement des gènes et la mort cellulaire programmée associés à la réponse immunitaire chez *A thaliana* (Canonne *et al.*, 2011). D'autres effecteurs perturbent le transcriptome de la cellule hôte en affectant le pool d'ARN de la cellule, c'est-à-dire une fois que les gènes ont été transcrits, tel est le cas de HopU1. L'effecteur HopU1 de *Pto* DC3000 fait partie de la famille des ADP-ribosyltransférases (ADP-RT ; Fu *et al.*, 2007). Les ADP-RT sont des enzymes qui hydrolysent le NAD⁺ pour transférer un ADP-ribose sur un résidu arginine, asparagine ou cystéine. L'effecteur HopU1 interagit avec deux protéines de liaison à l'ARN riches en glycine (GR-RBP) dans le noyau, GRP7 et GRP8 (Fu *et al.*, 2007). Les GR-RBP sont des protéines qui possèdent un motif de reconnaissance de l'ARN qui est suffisant et nécessaire pour se lier à l'ARN. Les GR-RBP sont des régulateurs post-transcriptionnels clés qui interviennent dans le métabolisme des ARNs. De ce fait, ils constituent des cibles intéressantes pour les bactéries. L'effecteur HopU1 peut modifier GRP7 par ADP-ribosylation sur l'arginine 49 (Fu *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2011). Ce résidu est essentiel pour la fonction de GRP7 car la mutation de cette arginine par une lysine diminue très fortement sa capacité à se lier aux ARNs (Jeong *et al.*, 2011). L'effecteur HopU1 pourrait altérer le transcriptome de la cellule en inactivant GRP7 et probablement GRP8 (homologue de GRP7).

1.3.4.2 Altération du protéome de la cellule

Un autre moyen d'altérer le métabolisme de l'hôte vise à perturber la stabilité de certaines protéines. Ainsi, certains ET3 vont cibler des protéines de l'hôte vers le protéasome afin qu'elles y soient dégradées. Comme mentionné précédemment *R. solanacearum* possède une famille multigénique de gènes appelés GALA. En plus de leur domaine LRR, les protéines GALA possèdent un domaine F-box en N-terminal leur

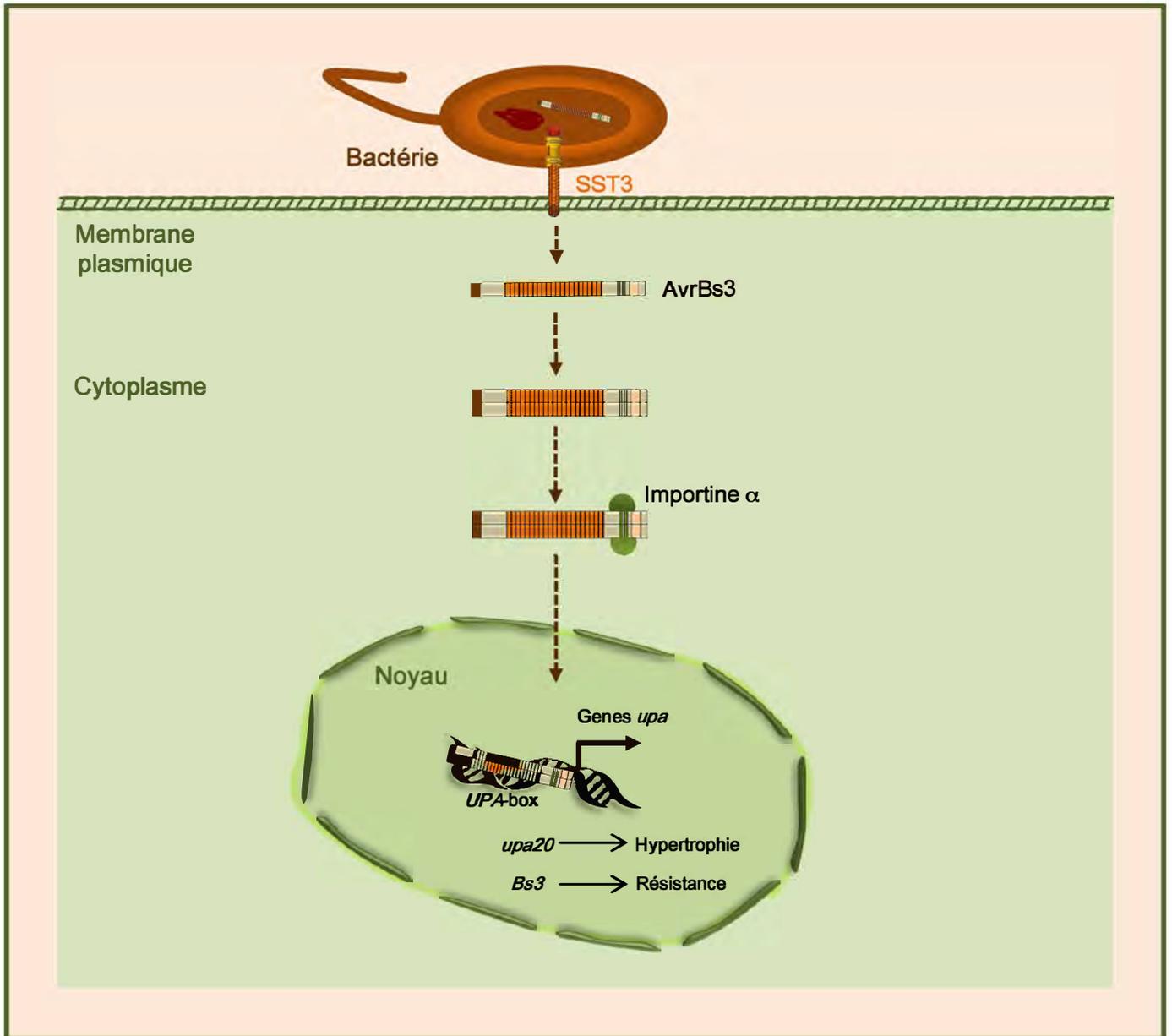


Figure J : Mode d'action de l'effecteur AvrBs3 de *X. campestris pv. vesicatoria*. Suite à son injection dans la cellule, l'ET3 AvrBs3 s'homodimérise et est transloqué dans le noyau en interagissant *via* ses NLS (Nuclear Localisation Sequence) avec l'importine α . Une fois dans le noyau, l'homodimère AvrBs3 se lie par l'intermédiaire des RVD des domaines répétés à des séquences promotrices (UPA-box) afin d'induire l'expression de gènes cibles *via* son domaine AAD (Acidic Activation Domain). Chez la plante sensible, l'expression de gènes cibles dont le gène *upa20* conduit à une hypertrophie de la cellule alors que chez la plante résistante, l'homodimère AvrBs3 induit l'expression du gène de résistance *Bs3* qui conduira à l'induction de la réponse hypersensible et à la résistance de la plante. RVD : Repeat-Variable Diresidue.

permettant d'interagir avec des protéines de type SKP1 d'*A. thaliana* (Angot *et al.*, 2006). Le domaine F-box est un petit domaine (48 aa ; acides aminés) caractéristique des protéines F-box eucaryotes leur permettant d'interagir avec les protéines de type SKP1. Les protéines de type SKP1 interagissent avec la culline 1 afin de former le complexe E3 ubiquitine ligase de type SCF. Le complexe E3 ubiquitine ligase permet de reconnaître des protéines cibles et de les polyubiquitinyler afin de les adresser au protéasome pour qu'elles soient dégradées. Toutefois, il reste à démontrer que les protéines GALA sont capables de former des complexes E3 ubiquitine ligase fonctionnels et d'induire la dégradation de protéines cibles. L'effecteur AvrPtoB de *Pto* DC3000 possède en C-terminal un domaine E3 ubiquitine ligase (Janjusevic *et al.*, 2006). Contrairement aux protéines GALA de *R. solanacearum*, AvrPtoB est capable d'induire la polyubiquitinylation de protéines cibles et il a été démontré que cette activité contribue au pouvoir pathogène de *Pto* DC3000 sur *A. thaliana* (Gohre *et al.*, 2008; Janjusevic *et al.*, 2006).

1.3.4.3 Altération du cytosquelette de la cellule hôte

Le cytosquelette composé de filaments d'actine et de microtubules (MT) joue un rôle crucial dans le métabolisme de la cellule. En effet, le cytosquelette intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que l'endocytose, la sécrétion, le trafic vésiculaire, la croissance cellulaire, la division cellulaire.... (Bhavsar *et al.*, 2007). De nombreuses bactéries pathogènes modulent le cytosquelette afin de réaliser leur cycle infectieux soit en ciblant les protéines régulatrices du cytosquelette soit en ciblant directement ce dernier. L'ET3 VopS de *V. parahaemolyticus* inhibe des Rho-GTPases (petites protéines régulatrices du cytosquelette) en modifiant (par adenylylation) un aa important pour la signalisation en aval des Rho-GTPases (Yarbrough *et al.*, 2009). D'autres protéines de virulences telles que, IbpA de *Histophilus somni* (pathogène animal du bétail) ou AnkX de *Legionella pneumophila* vont aussi cibler les Rho-GTPases (Mukherjee *et al.*, 2011; Worby *et al.*, 2009). L'ET3 VirA de *Shigella* (pathogène animal) inhibe le réseau de MT (Microtubule) destabilisant ainsi la forme initiale de la cellule (Yoshida *et al.*, 2002). Afin de déstabiliser le réseau de MT, l'ET3 VirA interagit directement avec des hétérodimères de tubulines α et β (Yoshida *et al.*, 2002). Cette interaction avec les hétérodimères de tubulines inhibe la polymérisation des MT.

Chez les plantes, récemment il a été démontré que l'effecteur HopZ1a de la souche A2 de *Pss* interagit avec des hétérodimères de tubuline et cette interaction permet d'inhiber la polymérisation des MT (Lee *et al.*, 2012). L'effecteur HopZ1a fait partie de la famille YopJ (famille des protéases à cystéine). De façon similaire à YopJ, l'effecteur HopZ1a possède une activité acétyl transférase qui va lui permettre d'acétyler les tubulines. L'acétylation des tubulines est responsable de l'inhibition de la polymérisation des MT. L'effecteur HopZ1a

cible les MT afin d'inhiber l'apposition de callose (polymère de β -1,3-glucose) à la surface de la cellule hôte. Une étude de gain de fonction montre que l'introduction de *hopZ1a* chez *Pto* DC3000 contribue de façon significative au pouvoir pathogène de la bactérie chez *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2012).

I.3.4.4 Altération du trafic vésiculaire de la cellule hôte

Le trafic vésiculaire de la cellule est très important pour la virulence de pathogènes animaux tels que *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Afin d'échapper au système immunitaire *L. monocytogenes* induit son internalisation dans les cellules épithéliales. Les bactéries se retrouvent dans des vacuoles qu'elles vont pouvoir utiliser pour se reproduire et envahir les cellules voisines (Cossart and Sansonetti, 2004). Dans ce cas de figure, la bactérie maintient le trafic vésiculaire pour son cycle infectieux. Chez les bactéries de l'espèce *P. syringae* il existe un locus appelé CEL (Conserved Effector Locus) qui est conservé et requis pour leur pouvoir pathogène sur leurs plantes hôtes (Alfano *et al.*, 2000). Parmi les effecteurs du locus CEL, HopM1 et AvrE sont nécessaires au pouvoir pathogène et sont fonctionnellement redondants (Kvitko *et al.*, 2009). L'effecteur HopM1 interagit avec la protéine AtMIN7 (*A. thaliana* HopM interactors) au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Nomura *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2011). La protéine AtMIN7 fait partie de la famille des ADP-ribosylation factor (ARF) guanine nucleotide exchange factor (GEF). Les protéines ARF-GEF sont des régulateurs clés du trafic vésiculaire des cellules eucaryotes. L'effecteur HopM1 induit la dégradation *via* le protéasome de AtMIN7 (le mécanisme en est inconnu), ce qui permet de perturber le trafic vésiculaire de la cellule hôte afin d'inhiber l'apposition de callose (Nomura *et al.*, 2006). Contrairement au pathogène animal *L. monocytogenes* qui maintient le trafic vésiculaire pour coloniser son hôte, les bactéries de l'espèce *P. syringae* le déstabilisent.

Les bactéries au cours de leur cycle infectieux développent tout un panel d'activité enzymatique et interagissent avec plusieurs molécules de l'hôte afin de supprimer les défenses et acquérir des nutriments de ce dernier. L'identification des facteurs de virulence est une étape clé avant les études visant à comprendre leur rôle et leur contribution dans le pouvoir pathogène. Dans ce but, de nombreux outils ont été mis au point afin d'identifier ces facteurs de virulence.

I.4 Outils permettant d'identifier des déterminants du pouvoir pathogène chez les bactéries

Une des grandes difficultés pour étudier le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes consiste à développer des stratégies et des outils permettant d'identifier les facteurs de virulence et leurs contributions dans le pouvoir pathogène des plantes. Ce paragraphe traitera essentiellement des outils qui ont permis l'identification de facteurs de virulence ainsi que des nouvelles méthodes qui présentent un potentiel intéressant pour le futur.

I.4.1 Du génotype au phénotype

I.4.1.1 Mutation spontanée et mutagenèse aléatoire

Avant l'apparition des premiers génomes séquencés, la recherche de facteurs de virulence se faisait par voie génétique et notamment par recherche de mutants spontanés ou par mutagenèse aléatoire (chimique ou par transposition). Par exemple, des études ont été entreprises pour rechercher des mutants spontanés ne produisant pas ou peu d'EPS. Ensuite ces mutants ne produisant plus d'EPS ont été utilisés pour évaluer le rôle de l'EPS dans le pouvoir pathogène. Toutefois, la recherche de mutants spontanés a été abandonnée avec l'apparition de la mutagenèse aléatoire car elle présentait un défaut majeur. Bien qu'étant affecté dans son pouvoir pathogène un mutant spontané d'EPS peut aussi présenter d'autres mutations spontanées dans d'autres loci impliqués dans le pouvoir pathogène (Kao *et al.*, 1992).

La mutagenèse aléatoire est une alternative à la recherche de mutations spontanées afin d'identifier des mutants altérés dans leurs pouvoirs pathogènes. En utilisant une banque de mutants de la souche 8004 de *Xcc* obtenue par mutagenèse aléatoire par transposition, Qian *et al* (2005) ont criblé 16 512 transformants afin d'identifier des mutants affectés dans leur pouvoir pathogène sur le chou. Le crible de ces transformants a permis l'identification de 75 mutants avec une réduction du pouvoir pathogène de la souche 8004 sur le chou. En plus de montrer l'importance de facteurs de virulence déjà connus (tels que le SST3, SST2...), ce crible a aussi identifié des gènes avec des fonctions inconnues et dont certains sont spécifiques de la souche 8004. Ce crible est l'un des plus importants (en termes de nombre de souches criblées) utilisé à ce jour que ce soit sur des pathogènes animaux ou végétaux. De plus, ce crible montre que de nombreux facteurs de virulence restent à identifier et que certains sont spécifiques d'une souche et donc potentiellement impliqués dans l'adaptation de la souche sur ses plantes hôtes.

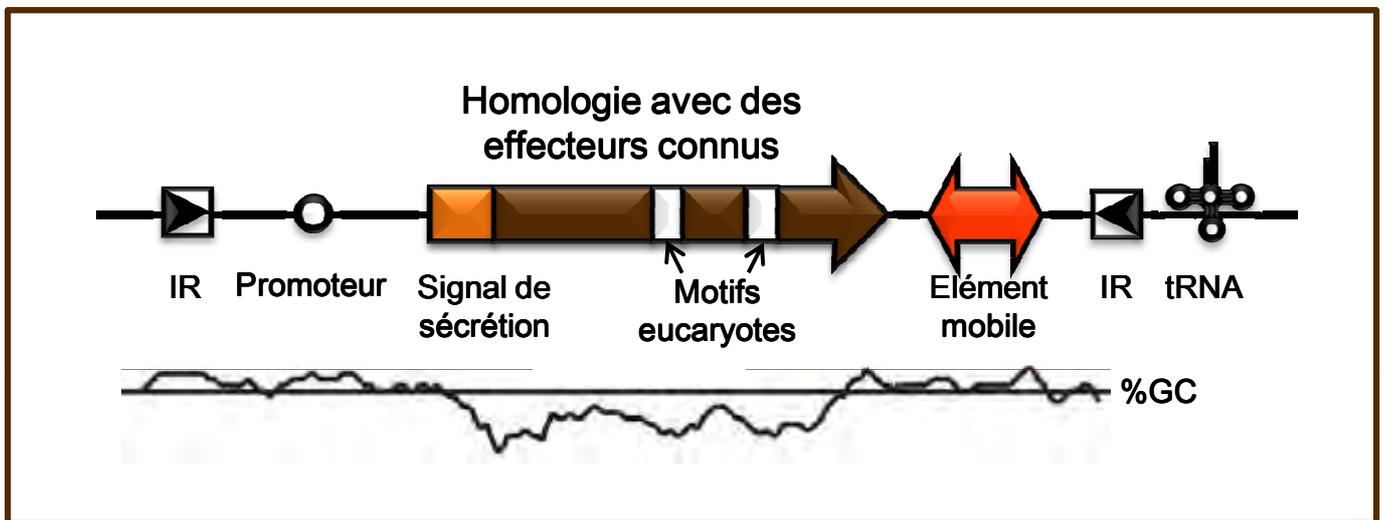


Figure K : Prédiction des effecteurs *in silico*. Représentation schématique d'un locus d'effecteur. Les effecteurs peuvent être prédits grâce à la présence de motifs et de signes d'acquisition par transfert horizontal : éléments génétiques mobiles (rouge), ARN de transfert (tRNA), séquence de répétitions inversées (IR). Au niveau de la séquence en acide aminé, il peut y avoir des similarités avec des effecteurs connus, la présence de motifs eucaryotes et la présence d'un signal putatif de sécrétion du SST3 (orange). De plus, le promoteur peut contenir des motifs conservés tels que la PIP-box, *hrp*-box et la *hrpII*-box. D'après Gürlebeck *et al.*, (2006).

L'une des principales contraintes avec la mutagenèse aléatoire ou les mutations spontanées réside dans le fait que chez les bactéries de nombreux gènes sont compris au sein d'opéron. La mutation aléatoire ou les mutations spontanées peuvent donc avoir un effet polaire sur les gènes en aval de l'opéron et compliquer les analyses qui suivent.

En plus des méthodes de génétique classique, le séquençage des génomes est actuellement très utilisé afin d'identifier *in silico* les facteurs de virulence des agents pathogènes par génomique comparative.

1.4.1.2 La science in silico au secours de la science expérimentale

Les séquences des génomes disponibles dans les bases de données publiques sont des outils très utilisés actuellement afin d'identifier les facteurs de virulence des agents phytopathogènes (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/shared/Genomes.cgi?crumbs=genomes>). Etant donné l'importance des ET3 dans le pouvoir pathogène, de nombreux chercheurs se sont efforcés d'établir un répertoire complet des ET3 de chaque bactérie phytopathogène possédant un SST3. Les séquences complètes des génomes de nombreuses bactéries phytopathogènes ont été d'une aide majeure dans l'identification des ET3. Néanmoins, cette tâche a été complexifiée par le fait que beaucoup d'effecteurs : i) n'ont pas d'homologues dans les bases de données ; ii) ne possèdent pas de *hrp*-box, *hrpII*-box ou PIP-box dans leur promoteur ; iii) ne possèdent pas de séquences de signal de sécrétion ou de translocation. Cependant, certaines caractéristiques permettent de les identifier dans le génome (Buttner *et al.*, 2003; Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Samudrala *et al.*, 2009 ; **Figure K**). De plus, bien que n'ayant pas d'homologies avec d'autres protéines, les ET3 vont présenter des homologies avec d'autres ET3 connus (Buttner *et al.*, 2003).

Le séquençage des génomes a aussi permis l'émergence de la génomique comparative qui est maintenant très utilisée pour identifier des facteurs de virulence connus chez de nouvelles souches séquencées. La génomique comparative est également très utilisée dans des études visant à expliquer la spécificité d'hôte et tissulaire chez les bactéries phytopathogènes (voir paragraphe II.2.7).

Toutes les techniques citées ci-dessus visent à caractériser l'implication d'un ou plusieurs gène(s) dans un phénotype observé (exemple : la virulence des bactéries). Les techniques actuelles permettent de partir d'un phénotype observé et de rechercher tous les marqueurs génomiques (gènes ou polymorphismes d'ADN) qui pourraient être responsables ou associés à ces phénotypes observés.

1.4.2 Du phénotype au génotype

1.4.2.1 Etude de génétique d'association

La génétique d'association (Genome-Wide Association ; GWA) est un outil statistique permettant d'identifier des marqueurs d'ADN (traits génotypiques) qui sont associés à des traits phénotypiques chez des individus dont la structure de la population est connue. Cet outil provient d'études réalisées sur les maladies humaines, là où il est nécessaire d'identifier des polymorphismes d'ADN qui peuvent être liés à une mutation causale partagée par plusieurs individus malades (Kruglyak, 2008; McCarthy *et al.*, 2008). Ces polymorphismes sont donc des marqueurs ADN qui sont en Déséquilibre de Liaison (LD, c'est-à-dire associés) avec des mutations causales impliquées dans des maladies (Kruglyak, 2008). Les marqueurs ADN peuvent être de différentes natures tels que les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), les Indels (Insertion/deletion) ou les microsatellites (séquences répétées de di, tri ou tetranucléotides, composées de plusieurs répétitions en tandem) que l'on retrouve dans les génomes humains. Les SNP sont les marqueurs de choix (Kruglyak, 2008).

De façon intéressante, bien qu'étant exclusivement utilisé pour typer des maladies humaines ou identifier des gènes impliqués dans ces dernières, le GWA peut aussi être utilisé chez d'autres organismes que l'homme ou l'animal. Deux études réalisées chez la plante modèle *A. thaliana* montrent que le GWA permet d'identifier des gènes impliqués dans des phénotypes tels que le contrôle de la floraison ou la résistance aux pathogènes (Atwell *et al.*, 2010; Brachi *et al.*, 2010). Un des grands avantages du GWA est qu'il permet de sortir de la relation binaire qui existe dans l'étude de deux organismes modèles (exemple : un écotype modèle et une souche de référence). Le GWA permet d'étudier au niveau de l'espèce des loci qui sont associés avec un phénotype. Par exemple, le gène de résistance *RPM1* a été identifié par GWA comme étant le gène de résistance majeur au gène d'avirulence *avrRpm1* (Atwell *et al.*, 2010). Bien que *RPM1* était déjà connu comme étant le gène de résistance majeur à *avrRpm1* chez l'écotype Columbia-0 (Col-0) d'*A. thaliana*, cette étude montre qu'au niveau de l'espèce entière, *RPM1* est aussi le gène de résistance à *avrRpm1*. Si le gène *RPM1* n'était pas connu il aurait pu être identifié grâce à l'analyse GWA. Ce résultat suggère que le GWA peut être utilisé pour identifier des mécanismes de résistance pertinents au niveau d'une espèce qui pourraient être efficace pour lutter contre des pathogènes dans l'agriculture.

De ce point de vue, bien qu'encore inexistant chez les bactéries, le GWA offre la possibilité d'identifier des facteurs impliqués dans le pouvoir pathogène des bactéries. Mais ceci n'est possible que s'il y a une différence phénotypique entre les individus (par exemple, des individus plus agressifs que d'autres). Bien qu'offrant un potentiel intéressant pour

identifier des traits génotypiques corrélés ou associés avec la virulence, le GWA souffre de plusieurs inconvénients. Les études de GWA ne détectent que les effets qui sont dus à des allèles relativement communs. En général, les études de GWA ne détectent que les allèles avec un maf > 10% (Minor Allele Frequency). Une des grandes difficultés consiste à choisir et générer suffisamment de marqueurs d'ADN pour couvrir le génome afin que ce dernier soit entièrement représenté. La taille de l'échantillon est importante afin d'atteindre des puissances statistiques élevées, le consensus à ce sujet est « the more samples the better ». Le fait d'avoir un grand échantillon permet aussi d'éviter les problèmes de sous représentation de certains allèles. Pour finir, la structure de la population est aussi importante. En effet, de nombreux faux positifs ou négatifs peuvent survenir à cause de la structure de la population. Dans les analyses statistiques il est important de prendre en compte le lien de phylogénie entre les individus pour éviter ces biais (Atwell *et al.*, 2010; Brachi *et al.*, 2010).

Néanmoins, l'identification de gènes ou marqueurs ADN associés au pouvoir pathogène ne suffit pas pour évaluer grandement la contribution de ces derniers dans le pouvoir pathogène. D'autres techniques ont vu le jour afin d'étudier l'expression des facteurs de virulence au cours de l'infection. De façon intéressante, ces méthodes permettent aussi d'identifier des facteurs de virulence. En effet, certaines d'entre elles permettent d'étudier l'expression du génome entier au cours de l'infection et donc d'identifier des gènes pas encore étudiés. Elles peuvent aussi montrer des régions génomiques qui sont transcrites pendant l'infection mais qui n'ont pas été (ou mal) annotées.

1.4.2.2 Etude de transcriptomique

Le nombre des séquences génomiques disponibles dans les bases de données a grandement amélioré notre compréhension du pouvoir pathogène des bactéries. Il devient maintenant assez facile d'appréhender des processus biologiques impliqués dans la virulence des bactéries pathogènes. Cependant, le séquençage en lui-même ne donne pas toutes les informations nécessaires à la compréhension de ces processus biologiques. En effet, d'autres informations notamment sur l'annotation structurale, la régulation, et sur les conditions d'expression de ces processus biologiques sont aussi indispensables pour comprendre le pouvoir pathogène des bactéries. Ces besoins ont donc permis la mise au point d'étude de transcriptomique. Un transcriptome est une collection de transcrits (ARN) d'une cellule donnée, évalué qualitativement et quantitativement à un moment de croissance particulier ou durant une condition physiologique particulière (Martin and Wang, 2011; Pinto *et al.*, 2011). De nombreuses techniques ont vu le jour afin d'évaluer le transcriptome des cellules telles que le Northern blot, la quantitative reverse transcription PCR et les puces à

ADN... Les nouvelles techniques de séquençage des génomes dites de « nouvelles générations » (Next Generation Sequencing ; NGS) ont permis de développer une nouvelle méthode de transcriptomique : le RNA-sequencing (RNA-seq) (Nagalakshmi *et al.*, 2008).

Le RNA-seq est une technique qui permet de représenter le transcriptome révélé par le séquençage des ADNc *via* les NGS. Le RNA-seq a été développé et initialement utilisé pour identifier la carte transcriptionnelle de la levure *Saccharomyces* (Nagalakshmi *et al.*, 2008). Cette technique devient une alternative aux puces à ADN car elle présente plusieurs avantages. En plus de pouvoir évaluer de façon qualitative et quantitative la présence des transcrits (de cellules ayant poussé dans des conditions données), elle permet également de détecter des transcrits rares, d'identifier de nouveaux gènes et les sites « +1 » de transcription avec précision (Filiatrault *et al.*, 2011). Ce dernier point est intéressant parce qu'un des problèmes dans la prédiction *in silico* des effecteurs reste le manque d'information en 5' des gènes. Cet inconvénient peut aussi provenir d'un problème d'identification du vrai codon start, comme cela a été démontré pour l'effecteur XopD de *Xcv* qui initialement était prédit comme faisant 612 aa (Noel *et al.*, 2002). Plus tard, Cannone *et al.* (2010) grâce à la spectrométrie de masse ont montré que ce gène était mal annoté et qu'il manquait à la protéine une extension N-terminal de 215 aa (Cannone *et al.*, 2010). Le RNA-seq associé à la protéomique pourrait donc permettre de vérifier les « +1 » de transcription des effecteurs et si besoin de les réannoter (Cho *et al.*, 2009). Ceci offrira une possibilité d'analyser plus précisément la partie N-terminale des effecteurs afin d'y trouver un éventuel motif de sécrétion, permettant de les identifier plus facilement *in silico*. De plus, plusieurs études ont montré que le RNA-seq permet d'identifier la présence de petits ARN non codants ou anti-sens (Filiatrault *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2011; Schmidtke *et al.*, 2012). Une étude réalisée chez la souche 85-10 de *Xcv* montre qu'un petit ARN non codant identifié par RNA-seq est important pour le développement de la maladie de la bactérie sur sa plante hôte (poivron ECW) mais aussi pour la HR sur l'hôte résistant (poivron ECW-10R ; Schmidtke *et al.*, 2012). L'identification des petits ARN non codant ou anti-sens représente un enjeu important dans la compréhension du pouvoir pathogène. Cependant, bien que présentant d'énormes avantages, le RNA-seq présente des inconvénients. L'utilisation de cette technique nécessite un enrichissement en ARNm car les ARNr et ARNt représentant 98% des ARN totaux de la cellule peuvent perturber l'analyse des données. En effet, c'est en raison de la forte abondance des ARNr que cette technique a initialement été développée chez la levure. Les auteurs ont utilisé des queues polyA afin d'isoler les ARNm (qui sont polyadénylés) des ARNs totaux et donc enrichir leurs échantillons en ARNm. De plus, cette technique nécessite que le génome de l'organisme étudié soit séquençé et annoté afin d'exploiter les données d'expression issues de l'analyse.

La mise au point d'outils autorisant l'identification de traits génomiques impliqués dans le pouvoir pathogène et maintenant l'étude de leur régulation permettent de mieux appréhender la virulence des bactéries. D'autres outils sont actuellement en cours de développement afin de retracer l'histoire évolutive de ces facteurs de virulence. Ces outils ne permettent pas encore pour l'instant d'identifier des facteurs de virulence. Toutefois, ils vont plutôt permettre de comprendre les processus ou les étapes clés qui ont permis l'acquisition ou l'évolution de ces déterminants génétiques importants pour le pouvoir pathogène.

1.4.3 Les facteurs de virulence à travers leur histoire évolutive

La compréhension des mécanismes évolutifs qui ont permis aux microorganismes d'acquérir des facteurs de virulence est une discipline permettant de comprendre le pouvoir pathogène et l'adaptation des microorganismes à leurs hôtes. Cependant, il faut être prudent avec ce genre d'approche. Appréhender l'histoire évolutive de la virulence chez les bactéries n'est pas chose facile. Les études évolutives sont essentiellement réalisées au sein de l'hôte. La vie à l'extérieur de l'hôte est aussi une étape importante dans l'évolution de la virulence des bactéries (Barrett *et al.*, 2011). Par exemple, la bactérie tellurique *R. solanacearum* entre deux hôtes se retrouve dans un environnement hostile. En effet, le sol est un milieu pauvre en nutriment où la compétition fait rage entre les microorganismes afin d'acquérir des nutriments. La capacité de survie de *R. solanacearum* a probablement dû passer par l'acquisition de facteurs lui permettant d'obtenir des nutriments dans le sol (facteurs autorisant la dégradation de débris végétaux ; Genin and Boucher, 2004). De ce fait, cet avantage acquis dans le sol pourrait soit lui être favorable dans le xylème qui est aussi un environnement hostile, soit avoir un coût sur le pouvoir pathogène (Barrett *et al.*, 2011).

De plus, les études évolutives en présence de l'hôte se font généralement dans des conditions contrôlées et en l'absence d'autres microorganismes. De nombreux facteurs de virulence (tel que le SST3 et les ET3) ont été démontrés comme étant des îlots de pathogénie (Alfano and Collmer, 1997; Gurlebeck *et al.*, 2006). A un moment donné dans leur histoire évolutive, les pathogènes ont acquis un fragment d'ADN par HGT provenant d'autres microorganismes qui a influencé leur virulence ou leur spectre d'hôte. Une étude récente montre que des régions d'ADN (jusqu'à 80 kb) peuvent être échangées entre deux phylotypes de *R. solanacearum* (Coupat-Goutaland *et al.*, 2011). De plus, cette expérience montre qu'une souche faiblement agressive sur la tomate peut devenir très agressive sur cette plante, grâce à l'acquisition d'une région génomique par HGT (Coupat-Goutaland *et al.*, 2011). Bien que le HGT entre les deux phylotypes soit réalisé *in vitro*, cela démontre bien que l'évolution d'une bactérie nécessite dans certains cas la présence d'autres

microorganismes. Ce HGT peut aussi avoir lieu *in planta*. Lovell *et al* (2009) ont montré qu'un îlot génomique de 106 kb peut être échangé entre deux souches de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) durant l'infection de leur plante hôte. Cet exemple est intéressant car dans ce cas l'acquisition du fragment génomique par la souche receveuse déclenche la HR sur la plante hôte et représente donc un désavantage (Lovell *et al.*, 2009). L'évolution est une science complexe à étudier car elle prend en compte plusieurs paramètres nécessaires qui sont très difficiles à reproduire en laboratoire à l'heure actuelle. Cependant, l'évolution expérimentale est un outil intéressant qui requiert notre attention car elle permettra peut être d'expliquer l'origine et le mode d'acquisition de certains facteurs.

D'autres méthodes tel que la biologie moléculaire ont permis la caractérisation du cluster *hrp* et la découverte des harpines. En effet, les premières harpines (HrpN de *E. Amylovora* et HrpZ de *P. syringae*) ont été identifiées dans le surnageant de culture *E. coli* ayant un plasmide permettant une surexpression des gènes du cluster *hrp* (He *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1992a). L'analyse du pouvoir pathogène chez les bactéries nécessite l'utilisation de la combinaison de plusieurs outils mais aussi le développement constant de nouvelles stratégies pour décrypter le pouvoir pathogène des bactéries. Les bactéries ont développé ou acquis des armes pour coloniser de façon efficace leurs hôtes. Néanmoins, nous allons voir dans le chapitre suivant que la présence de ces armes est aussi utilisée par les plantes pour percevoir et se défendre contre les microorganismes.

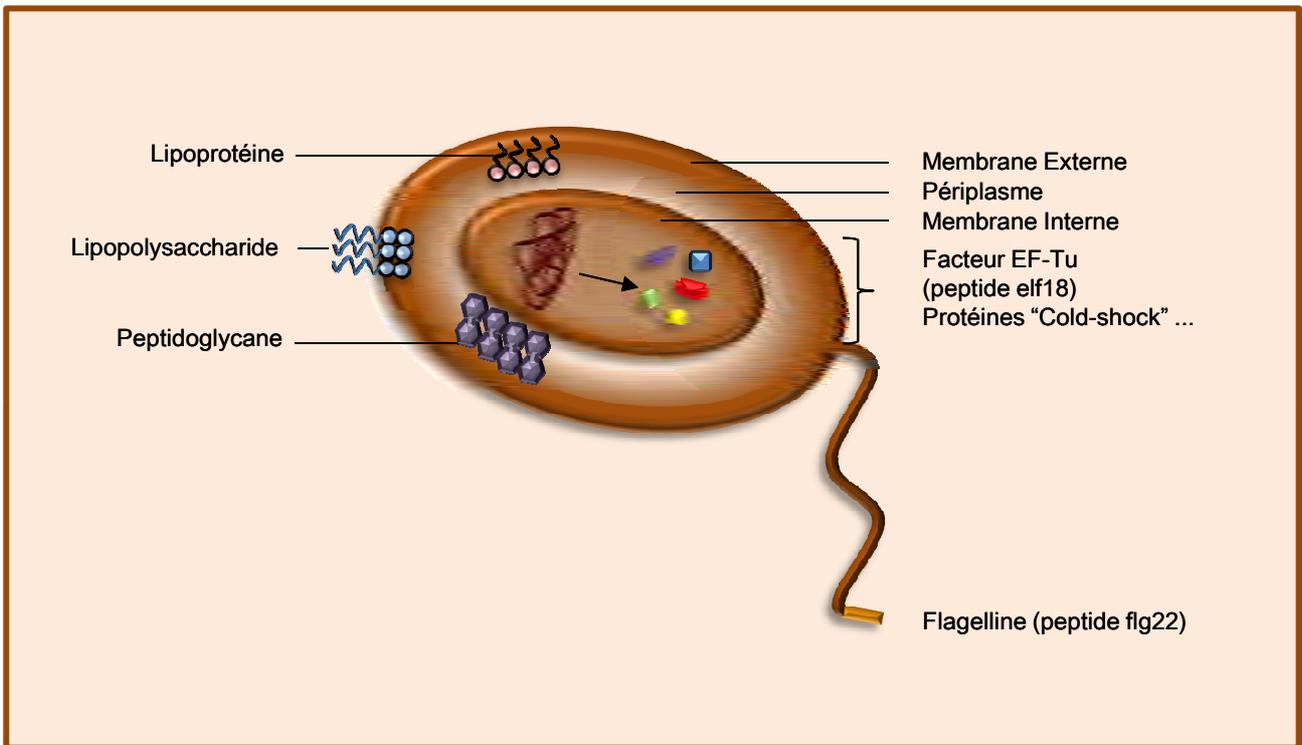


Figure L : Origine de différents Pathogen-Associated Molecular Patterns chez les bactéries à caractère Gram négatif.

II. Mise en place de l'immunité innée végétale

Les plantes sont des organismes sédentaires, elles ne peuvent donc pas fuir un danger potentiel. Elles ont donc dû mettre au point des voies de signalisation efficaces et rapides afin de percevoir et déclencher des réactions de défense contre les agents pathogènes. De plus, contrairement aux animaux, elles ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif, seule l'immunité innée est présente chez les plantes. La reconnaissance des agents pathogènes par une plante provient donc de l'héritage génétique qu'elle a reçu de son ou ses parent(s). Il existe deux voies de reconnaissance des bactéries pathogènes chez les plantes :

- La PTI qui est l'immunité basale permettant de reconnaître de façon spécifique des molécules génériques présentes chez les microorganismes (pathogènes ou non).
- L'ETI qui est l'immunité spécifique qui permet de reconnaître les pathogènes de façon spécifique.

L'activation de ces deux voies nécessite la reconnaissance d'une molécule bactérienne appelée éliciteur. Suite à la reconnaissance de l'éliciteur bactérien, il y a activation d'une voie de signalisation qui va permettre l'activation des défenses végétales.

II.1 Mise en place de la défense basale et de sa suppression par les bactéries

II.1.1 Les PAMPs : activateurs de la PTI

Dans l'immunité basale, les éliciteurs bactériens sont appelés PAMPs (Zipfel, 2008). Les PAMPs sont également retrouvés chez les pathogènes d'animaux. Ils sont en général stables, conservés, héréditaires et caractéristiques des bactéries. Certaines de ces molécules peuvent être essentielles à la survie des bactéries car ils contribuent à certains processus biologiques clés (composition de la paroi bactérienne, traduction...). D'autres PAMPs participent à l'adaptabilité des bactéries (chimiotactisme..). Ils sont également retrouvés chez des bactéries non-pathogènes (Zipfel and Felix, 2005). De ce fait, les PAMPs sont aussi appelés Microbes-Associated Molecular Pattern (MAMPs). Les PAMPs sont de nature très diverses (**Figure L**). Chez les bactéries, les deux PAMPs les plus étudiés et donc les mieux caractérisés sont le flagelle et le facteur d'élongation, EF-Tu. Les études réalisées sur la reconnaissance du flagelle du genre *P. syringae* pv. *tabaci* ont montré que seul le produit du gène *fliC* codant la flagelline (sous-unité composant le pilus du flagelle) est perçu par la plante *A. thaliana* (Felix et al., 1999). De plus, ces études montrent qu'un peptide de

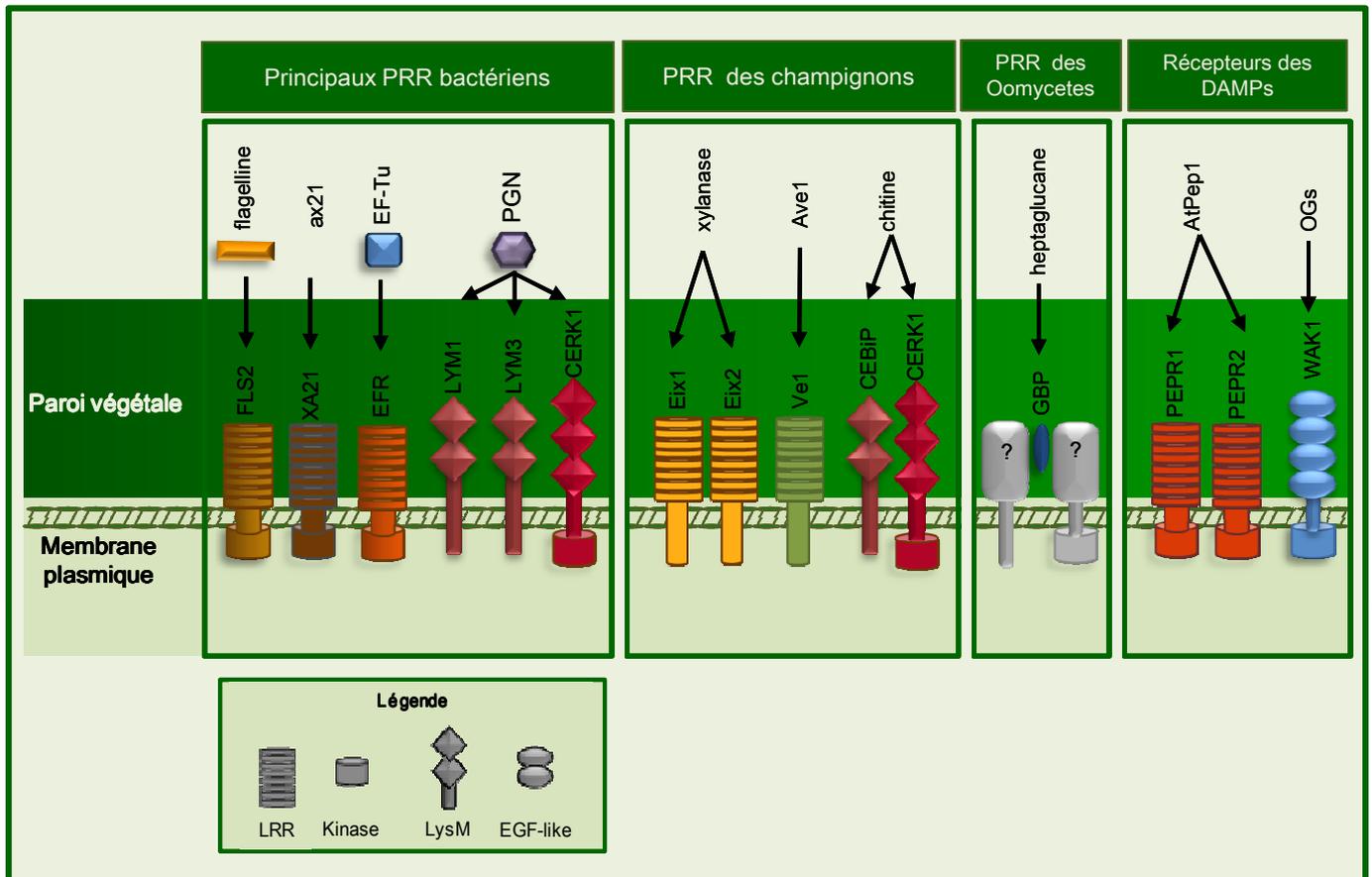


Figure M : Représentation schématique des Pattern Recognition Receptors et de leur ligand connu. Le RLK (Receptor-Like Kinase) de type LRR (Leucine Rich Repeats) FLS2 reconnaît la flagelline bactérienne chez *A. thaliana*, la tomate, *N. benthamiana* et le riz. Le RLK spécifique des Brassicacées EFR de type LRR reconnaît le facteur d'élongation EF-Tu. Le RLK XA21 de type LRR reconnaît le peptide Ax21 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chez le riz. Les RLP LYM1 et LYM3 (Receptor-Like Protein) de type LysM reconnaissent le peptidoglycane (PGN) des bactéries et le RLK de type LysM CERK1 reconnaît faiblement le PGN chez *A. thaliana*. Les RLK Eix1 et Eix2 de type LRR reconnaissent la xylanase fongique chez la tomate. Ave1 est un ligand putatif pour le RLP Ve1 chez la tomate. Chez le riz, le RLP de type LysM lie la chitine et interagit avec le RLK CERK1 de type LysM pour la signalisation intracellulaire, tandis que chez *A. thaliana* CERK1 est la protéine majeure de liaison à la chitine. Chez les légumineuses, une β -glucan binding protein (GBP) extracellulaire lie les heptaglucones des oomycètes. Cependant, la façon dont le signal est transmis à l'intérieur de la cellule n'a pas encore été décrit. Les RLK PEPR1 et PEPR2 de type LRR reconnaissent le DAMP (Danger-Associated Molecular Pattern) AtPEP1 chez *A. thaliana*. Le RLK WAK1 (contenant EGF-like domain) est un récepteur pour les oligogalacturonides (OGs) de la paroi cellulaire végétale chez *A. thaliana*. D'après Monaghan *et al.*, (2012).

22 aa en N-terminal de la séquence protéique de la flagelline (appelé flg22) est pleinement actif dans l'induction des défenses (Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). De même, chez le facteur d'élongation EF-Tu un peptide de 18 aa en N-terminal (efl18) est suffisant pour la reconnaissance de la bactérie et induire les défenses de la plante *A. thaliana* (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006).

Les plantes reconnaissent les PAMPs grâce aux protéines de résistance de la PTI qui induisent une cascade de signalisation permettant de stopper l'invasion bactérienne.

II.1.2 Reconnaissance des PAMPs

La reconnaissance des PAMPs (des bactéries) se fait au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales grâce à des récepteurs membranaires appelés PRR (Pattern Recognition Receptor ; Zipfel, 2008). On distingue deux grands types de PRR : Receptor-Like Kinase (RLK) et Receptor-Like Protein (RLP ; **Figure M**). Les deux types de récepteurs possèdent une partie extracellulaire avec un domaine LRR qui permet la reconnaissance des PAMPs. Le domaine LRR est le domaine qui permettrait la spécificité d'interaction entre le PAMP et le PRR. Le domaine extracellulaire est suivi par le domaine transmembranaire qui permet l'intégration des PRR dans la membrane plasmique. Chez les PRR de type RLK, il existe un domaine supplémentaire qui est cytoplasmique. Ce domaine cytoplasmique possède une activité sérine/thréonine kinase qui permet la transduction du signal après la perception du PAMP (Zipfel, 2008). Chez la plante *A. thaliana*, les PRR permettant la reconnaissance de la flagelline et de EF-Tu sont respectivement les RLK, FLS2 (FLAGELLIN SENSING2) et EFR (EF-Tu receptor ; Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006).

Bien que certains PAMPs soient reconnus par de nombreuses espèces, d'autres ont une gamme de reconnaissance plus restreinte. Par exemple, la flagelline est reconnue de façon générale par les plantes monocotylédones et dicotylédones (Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Robatzek *et al.*, 2007; Zipfel, 2009) tandis que le PAMP EF-Tu n'est reconnu que par les membres de la famille des Brassicacées (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Cependant, une étude réalisée chez la tomate et *N. benthamiana* (famille des Solanacées) montre que l'expression du gène *EFR* (sous le contrôle de son promoteur natif) permet la reconnaissance du peptide efl18 chez les Solanacées (Lacombe *et al.*, 2010). De plus, l'introduction du gène *EFR* chez la tomate et *N. benthamiana* permet de conférer la résistance à de nombreux genres bactériens (*Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* ; Lacombe *et al.*, 2010). Cette expérience suggère que ces plantes possèdent les voies de transduction nécessaires pour la signalisation en aval du récepteur EFR. En

effet, les études menées chez *A. thaliana* montrent que les récepteurs FLS2 et EFR induisent une série de réponses communes (Zipfel *et al.*, 2006). En accord avec cette hypothèse, une étude récente montre qu'une protéine chimère composée du domaine extracellulaire de EFR et des domaines transmembranaires et « kinase » de FLS2 est capable de reconnaître efl18 (Albert *et al.*, 2010). De plus, cette protéine chimère est capable d'induire des réponses similaires au récepteur EFR (Albert *et al.*, 2010). Ces études supposent que ces deux récepteurs utilisent une cascade de signalisation similaire ou partagent des composants de cette voie de signalisation.

En plus de la reconnaissance des PAMPs, certains PRR permettent de reconnaître des molécules dérivées de l'hôte (**Figure M** ; Monaghan and Zipfel, 2012). Ces molécules sont produites suite à la dégradation de la paroi cellulaire par les enzymes hydrolytiques des microorganismes ou par des blessures. Ces molécules sont alors appelées DAMPs (Danger-Associated Molecular Pattern). La reconnaissance des DAMPs par les récepteurs correspondant permet d'induire des réponses physiologiques qui résultent dans l'activation de la PTI. Par exemple, les récepteurs de type RLK AtPepR1 et AtPepR2 d'*A. thaliana* permettent de reconnaître le DAMP *Arabidopsis* peptide 1 (AtPep1 ; Yamaguchi *et al.*, 2010). AtPep1 est un peptide de 22 aa issu d'un précurseur de 92 aa qui permet d'induire des gènes et des réponses associés aux réactions de défenses des cellules végétales (Huffaker *et al.*, 2006). La surexpression de AtPep1 chez *A. thaliana* permet d'accroître la résistance de cette dernière à l'oomycète *Pythium irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006).

Les plantes ont évolué afin de développer plusieurs PRR (**Figure M**) qui permettent de reconnaître les agents pathogènes *via* la perception de différents PAMPs ou les dommages imputés à sa paroi *via* les DAMPs. La reconnaissance des PAMPs ou des DAMPs par les différents PRR permet d'induire une cascade de signalisation visant à activer l'immunité basale.

II.1.3 Activation de la PTI par les PAMPs

Suite à la reconnaissance de son ligand (flg22), le PRR FLS2 s'hétérodimérise au niveau de la membrane avec un autre récepteur de type RLK BAK1 (BRI1-Associated receptor Kinase 1 ; Chinchilla *et al.*, 2007). Le complexe FLS2-BAK1 interagit alors avec une autre protéine kinase (BIK1, BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1) de la famille des RLCK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase ; Lu *et al.*, 2010). Très rapidement après la formation du complexe, une transphosphorylation entre les trois partenaires est observée (Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010). De façon intéressante, le récepteur EFR est aussi capable de former un complexe avec BAK1 et BIK1 en présence de efl18. De façon similaire à FLS2, il y

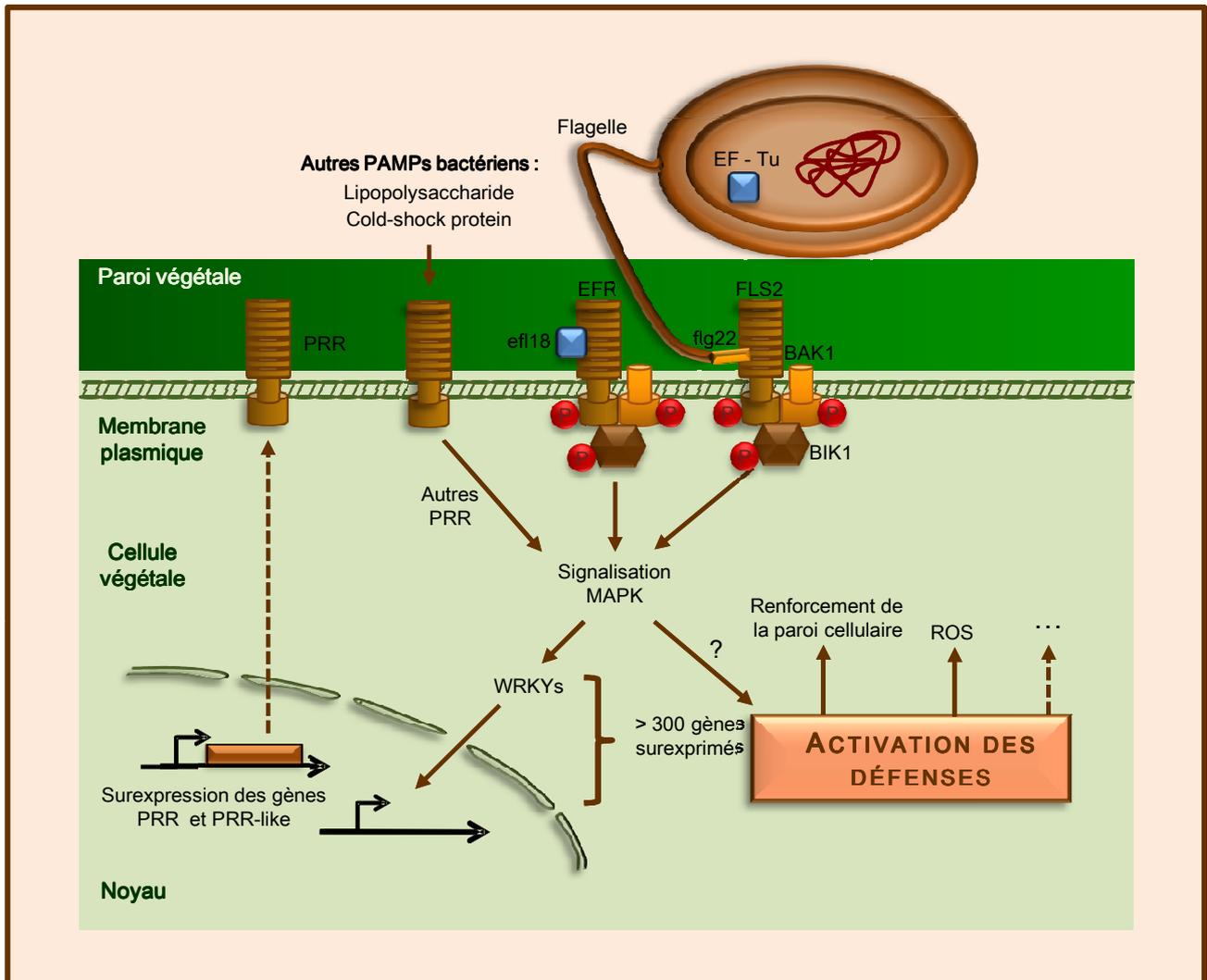


Figure N : Activation des voies de signalisation des Pattern Recognition Receptors (PRR). Suite à la reconnaissance de leur PAMP respectif, flg22 et efl18, les PRR FLS2 et EFR s'associe à BAK1 et BIK1. Après formation du complexe, il y a transphosphorylation entre les 3 partenaires. Le complexe phosphorylé va transduire le signal via les MAPK afin d'activer dans un premier temps des réponses physiologiques impliquées dans la réponse immunitaire. Dans un second temps, la signalisation via les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) permet l'activation de facteurs de transcription (de type WRKY) qui vont induire l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Les réponses physiologiques et les gènes induits par les protéines WRKY vont permettre la mise en place de l'immunité basale. D'autres PAMPs (Lipopolysaccharides et cold-shock protein) vont aussi induire les défenses végétales via les PRR. D'après Abramovitch *et al.*, (2006).

a une transphosphorylation entre les membres du complexe EFR-BAK1-BIK1 (Schwessinger *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). Toutefois, il faut noter que dans le complexe, seuls les PRR FLS2 et EFR peuvent respectivement fixer les PAMPs flg22 et efl18 mais la formation de ces complexes est importante pour l'induction de l'immunité basale (**Figure N**). Les mutants *bak1* et *bik1* montrent une réponse de défense basale fortement réduite après traitement par flg22 et efl18 (Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La protéine BIK1 a originalement été identifiée dans la défense d'*A. thaliana* contre des pathogènes fongiques de types nécrotrophes et biotrophes (Veronese *et al.*, 2006). Ces données montrent que la reconnaissance des pathogènes chez les plantes utilise des voies de signalisation communes.

Suite à la reconnaissance des PAMPs, une reprogrammation transcriptionnelle permettant l'induction de gènes associés à la défense de la cellule végétale a aussi été décrite. L'activation des complexes FLS2/EFR-BAK1-BIK1 va donc induire une cascade de signalisation *via* un phosphorelais entre différentes MAPK permettant l'activation de facteurs de transcription (Afzal *et al.*, 2008). Chez les plantes, les facteurs de transcription de type WRKY (domaine de fixation à l'ADN caractérisé par les 4 aa WRKY) jouent un rôle essentiel dans la régulation des gènes de défense (Eulgem and Somssich, 2007). Par exemple, la reconnaissance de FLS2 par flg22 induit une cascade de phosphorylation *via* les MAPK : MEKK1, MKK4/MKK5 et MPK3/MPK6 (Asai *et al.*, 2002). Cette cascade de phosphorylation aboutit à l'activation des facteurs de transcription WRKY22/ WRKY29 (Asai *et al.*, 2002). La phosphorylation des facteurs de transcription par les MAPK peut être directe ou indirecte (**Figure N** ; Eulgem and Somssich, 2007). En plus des protéines MAPK et WRKY, l'état de phosphorylation de nombreuses protéines de *A. thaliana* est modifié. En effet, en présence de PAMP bactérien (flg22) ou fongique (chitine), le taux de phosphorylation de certaines protéines est soit augmenté ou diminué (Peck *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation joue un rôle important dans la signalisation en aval de la reconnaissance des PAMPs.

Les voies de signalisation induites par les PRR aboutissent à un ensemble de réponses permettant de stopper l'infection par l'agent pathogène notamment le renforcement de la paroi (*via* l'apposition de callose), la fermeture des stomates (voie d'entrée des pathogènes colonisant le mésophile ; Abramovitch *et al.*, 2006a; Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Melotto *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2010). A ces réponses physiologiques s'ajoutent également la production de molécules antimicrobiennes telles que les camalexines (Glazebrook and Ausubel, 1994) ou la production de ROS (Reactive Oxygen Species ; Felix *et al.*, 1999).

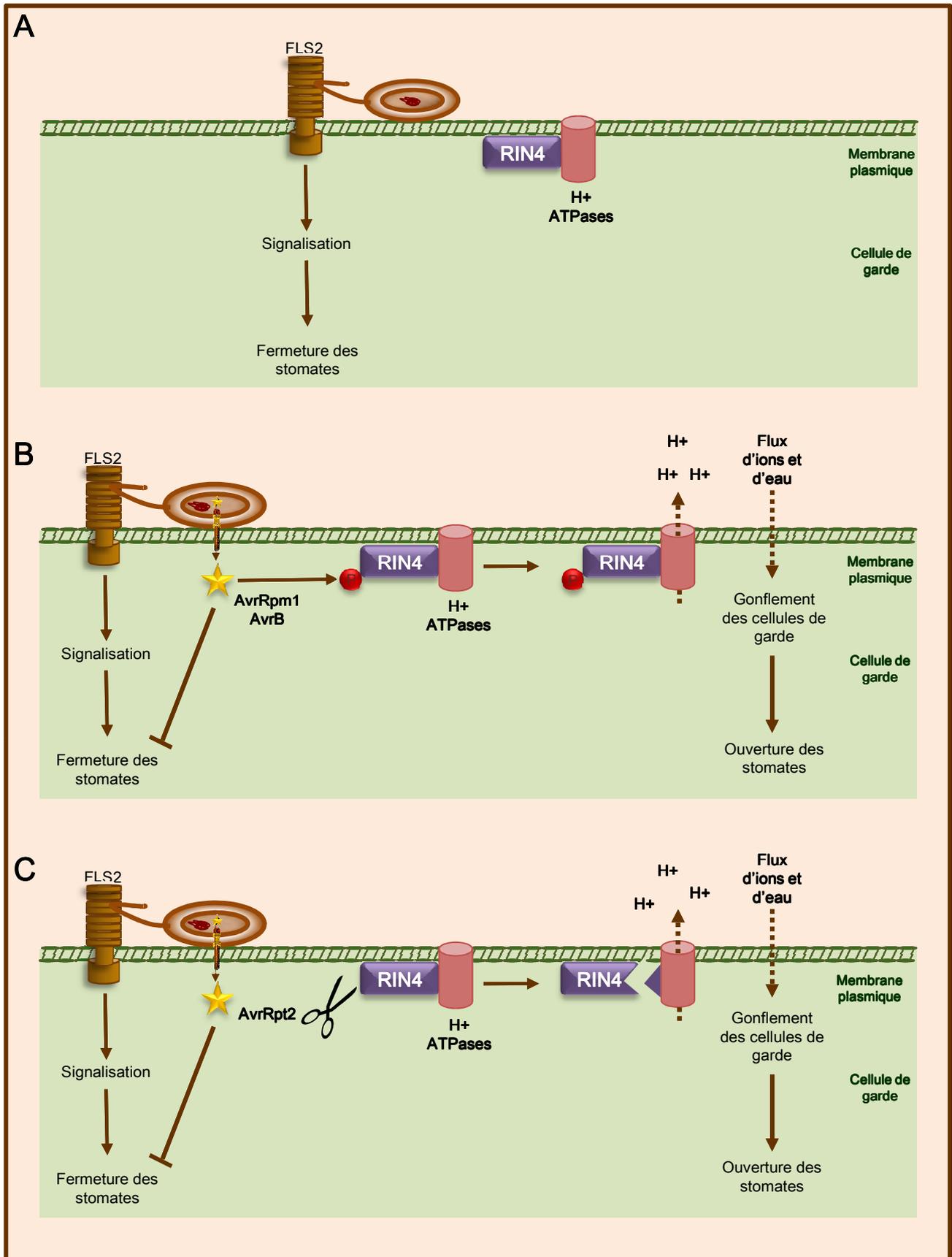


Figure O : Inhibition de la fermeture des stomates par les ET3. A) Une bactérie non pathogène est reconnue par la cellule de garde qui va induire une cascade de signalisation permettant la fermeture des stomates. La protéine RIN4 est inactive et n'active pas les pompes ATPases. B et C) Une bactérie pathogène est reconnue par la cellule de garde qui va induire une cascade de signalisation permettant la fermeture des stomates. Cependant, les ET3 AvrB, AvrRpm1 (B) et AvrRpt2 (C) vont pouvoir inhiber la fermeture des stomates *via* la phosphorylation (AvrB et AvrRpm1) ou le clivage (AvrRpt2) de RIN4. La phosphorylation (B) ou les fragments clivés (C) de RIN4 permettent d'activer cette dernière qui à son tour active les pompes H⁺ ATPases. Les pompes H⁺ ATPases induisent un gradient de proton qui va permettre l'entrée d'ions et d'eau dans les cellules de garde. Cette entrée d'eau induit un gonflement des cellules de garde et donc l'ouverture des stomates

II.1.4 Contournement de l'immunité basale

L'immunité basale est une réponse rapide qui implique de nombreuses réponses de la cellule au niveau moléculaire et physiologique. Ces réponses permettent à la plante de résister face à de nombreux microorganismes (pathogènes ou non) et font en sorte que la maladie soit une exception dans la nature. Cependant, certains microorganismes se sont adaptés pour contourner ou contrer ces défenses basales afin de coloniser leurs plantes hôtes avec succès.

Une des façons pour les bactéries pathogènes d'échapper à l'immunité basale végétale consiste à éviter leur reconnaissance *via* les PRR et donc empêcher l'activation de la PTI. Dans ce but, les PAMPs doivent évoluer afin de ne plus être reconnus. Les PAMPs sont des molécules importantes pour la viabilité ou pour le style de vie des bactéries. Ces molécules évoluent donc très lentement et il est très peu probable qu'elles soient perdues. Cependant, les bactéries vont pouvoir modifier la composition de certains PAMPs tels que le lipopolysaccharide (Büttner and Bonas, 2009) ou la flagelline. Par exemple, *R. solanacearum* synthétise un peptide flg22 qui n'induit pas de réponse immunitaire et donc n'est plus reconnu par les défenses végétales (Pfund *et al.*, 2004). De façon similaire, une étude réalisée chez 12 souches de *Xcc* montre que ces souches produisent des flagellines qui diffèrent dans leur capacité d'induction des défenses de l'hôte (Sun *et al.*, 2006).

Le meilleur moyen d'éviter l'immunité basale pour les bactéries consiste à supprimer la PTI *via* le SST3.

II.1.5 Suppression de l'immunité par les ET3

Plutôt que d'essayer de faire évoluer les PAMPs afin qu'ils ne soient plus reconnus par les PRR, les bactéries se sont adaptées afin de supprimer directement les voies de défense induites par les PAMPs. Les ET3 jouent un rôle majeur dans la suppression des défenses végétales. L'une des étapes dans la mise en place de la réponse immunitaire consiste à limiter la pénétration des pathogènes à l'intérieur des feuilles (Gudesblat *et al.*, 2009a). Les bactéries de l'espèce *P. syringae* ne sont pas capables de pénétrer à l'intérieur de la feuille par leur propre moyen. L'entrée de ces bactéries nécessite la présence d'ouvertures naturelles telles que les stomates ou des blessures. La première étape pour la plante consiste donc à fermer ses stomates pour limiter l'entrée des pathogènes (**Figure OA** ; Melotto *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2010). En réponse les bactéries du genre *Pseudomonas* ont développé des stratégies afin d'inhiber la fermeture des stomates (Zeng *et al.*, 2010). Les effecteurs AvrB et AvrRpm1 de *P. syringae* sont capables d'induire la phosphorylation d'une protéine (RIN4 ; RPM1-Interacting Protein 4) impliquée dans l'ouverture des stomates

(**Figure OB** ; Mackey *et al.*, 2002). Un autre effecteur AvrRpt2 de *P. syringae* induit le clivage de RIN4 *via* son activité de protéase à cystéine (**Figure OC** ; Axtell and Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003). La protéine RIN4 est une protéine de 211 aa qui se localise au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales (Mackey *et al.*, 2002). Cette protéine interagit au niveau de la membrane avec deux pompes à protons AHA1 et AHA2 (Liu *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2009b). Ces deux protéines sont des ATPases capables d'induire un gradient de protons à travers la membrane. Le gradient de protons permet l'entrée d'ions et d'eau dans la cellule. Cette entrée d'eau dans la cellule induit le gonflement des cellules de garde et donc l'ouverture des stomates. La protéine RIN4 est un régulateur positif des deux pompes à proton (Liu *et al.*, 2009b). Ainsi, l'activation de la protéine RIN4 *via* sa phosphorylation ou son clivage permet l'activation des pompes à proton AHA1 et AHA2 qui à leur tour induisent l'ouverture des stomates (**Figure OB et C**). D'autres molécules telles que la phytotoxine coronatine (COR) peuvent intervenir dans l'ouverture des stomates (voir paragraphe II.2.7.2 ; Melotto *et al.*, 2006).

Une fois à l'intérieur de la feuille, les bactéries doivent faire face à des réactions de défense qui visent à limiter leur accès à la cellule végétale ainsi qu'aux ressources nutritives nécessaires à une colonisation efficace. Elles doivent notamment faire face à l'induction des défenses par les PRR qui vont signaler la présence des bactéries à la cellule. Afin d'inhiber ces voies de signalisation, les bactéries peuvent inhiber des régulateurs positifs de la PTI ou activer des régulateurs négatifs. La surexpression de RIN4 chez *A. thaliana* permet de supprimer l'apposition de callose ainsi que l'expression de gènes associés à l'immunité basale (Kim *et al.*, 2005b; Mackey *et al.*, 2002). Ces données montrent que RIN4 est un régulateur négatif de la PTI. Le clivage du fragment de RIN4 par AvrRpt2 permet de libérer des fragments de la protéine RIN4 qui sont capables d'inhiber les réponses induites par le peptide flg22 (Afzal *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b). D'autres effecteurs tels que AvrPto ou AvrPtoB de *P. syringae* vont inhiber un régulateur positif de la PTI. En effet, AvrPto inhibe l'activité kinase de FLS2 et de EFR (Xiang *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011). L'effecteur AvrPtoB est une E3 ubiquitin ligase qui induit la dégradation *via* le proteasome de FLS2 (Abramovitch *et al.*, 2006b; Gohre *et al.*, 2008; Janjusevic *et al.*, 2006). Ces deux effecteurs permettent donc d'inhiber la signalisation en aval de FLS2 suite à la perception de la flagelline.

D'autres effecteurs vont cibler les voies en aval de FLS2 telles que celles qui permettent l'apposition de callose à la surface des cellules. Le trafic vésiculaire et les MT sont impliqués dans le dépôt de callose à la surface des cellules. Comme décrit

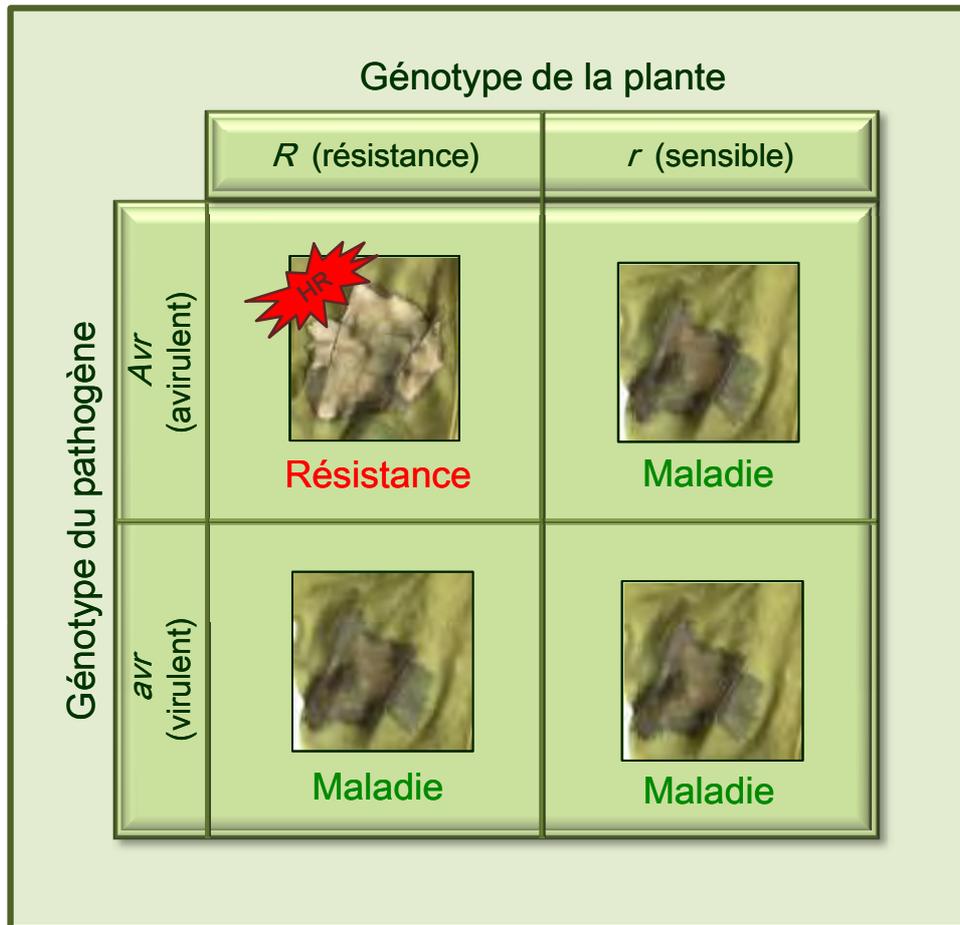


Figure P : Le modèle gène-pour-gène ou la reconnaissance *R/Avr*. La présence du gène dominant de résistance (*R*) chez la plante et de l'allèle dominant *Avr* du gène d'avirulence chez le pathogène, déclenche la résistance dite « gène-spécifique » et l'interaction est dite incompatible. Dans le cas où *r* et/ou *avr* sont absents ou récessifs, la maladie a lieu et l'interaction est dite compatible. Réaction hypersensible (HR) sur une plante résistante (poivron ECW 10R) causée par la souche 8004 de *Xhantomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) un jour après l'inoculation. Symptômes de maladie sur plante sensible (poivron ECW) sept jours après l'inoculation par *Xcc* 8004.

précédemment (voir paragraphe 1.3.4) l'effecteur HopM1 induit la dégradation de AtMIN7 (protéine régulatrice du trafic vésiculaire) et l'effecteur HopZ1a inhibe la polymérisation des MT afin de supprimer l'apposition de callose (**Figure I** ; Lee *et al.*, 2012; Nomura *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2011).

Bien que conférant un avantage aux bactéries (suppression de la PTI et acquisition de nutriments), les ET3 peuvent également représenter un inconvénient pour les bactéries. En effet, les plantes sont capables de reconnaître certains ET3 afin d'initier une réponse immunitaire dite spécifique ou l'ETI.

II.2 Mise en place de l'immunité spécifique (ETI) et de sa suppression par les bactéries

II.2.1 Interaction gène d'avirulence et de résistance : le modèle gène-pour-gène

Dans l'ETI, les éliciteurs bactériens permettant l'activation des défenses sont les ET3. L'ET3 reconnu est alors appelé protéine d'avirulence (Avr) car sa présence rend la bactérie avirulente (Alfano and Collmer, 2004; Jones and Dangl, 2006). Les protéines Avr sont donc des ET3 sécrétés et/ou transloqués à l'intérieur des cellules végétales qui induisent une réponse immunitaire chez une plante résistante. Le premier gène d'avirulence identifié et cloné est le gène *avrA* de *P. syringae* pv. *glycinea* qui permet de conférer l'avirulence sur le soja (Napoli and Staskawicz, 1987). La présence d'un gène *Avr* à l'intérieur de la cellule végétale est reconnue par un gène de résistance (*R*) correspondant. Une exception existe chez la bactérie *Xoo* où la protéine Avr Ax21 (aussi appelée AvrXa21) est une protéine sulfonylée (modification indispensable à la reconnaissance de Ax21) de 194 aa sécrétée par le système de sécrétion de type 1. La fonction Avr de cette protéine dépend des gènes *rax* (required for AvrXa21 activity), et non pas du SST3. De plus, la reconnaissance de Ax21 se fait à l'extérieur de la cellule (**Figure M**). De façon similaire à flg22 et efl18, un peptide de 17 aa (dérivé des résidus 17-33 de la région N-terminale de Ax21) sulfonylé sur la tyrosine 22 (axY^S22) est suffisant pour induire les défenses (Burdman *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009).

La reconnaissance *R/Avr* représente le modèle gène-pour-gène décrit par Flor (Flor, 1971). Ce modèle prédit que la présence d'un gène *Avr* chez une bactérie pathogène et d'un gène *R* correspondant chez une plante résistante entraîne une interaction incompatible entre les deux partenaires. Cette réaction incompatible se traduit généralement par une HR chez la plante, qui est une mort cellulaire rapide et programmée au niveau du site de l'infection

Tableau A : Liste des principaux gènes d'avirulence et de leur gène de résistance correspondant.

| Pathogène | Gène d'avirulence | Activité enzymatique | Plante résistante | Gène de résistance | Références |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---|
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. | | | | | |
| <i>glycinea</i> | <i>avrA</i> | famille YopJ/AvrRxv | soja | <i>RPG2</i> | Napoli and Staskawicz, 1987 |
| | <i>avrB</i> | kinase | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPM1</i> | Wanner <i>et al.</i> , 1993; Bisgrove <i>et al.</i> , 1994; Tamaki <i>et al.</i> , 1988 |
| | | | <i>Arabidopsis</i> | <i>TAO1</i> | Eitaset <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>avrC</i> | | soja | <i>RPG1-B</i> | Innes <i>et al.</i> , 1993; Huynh <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>tomato</i> | <i>avrD</i> | syringolide synthase | soja | <i>RPG3</i> | Tamaki <i>et al.</i> , 1988 |
| | <i>avrPto</i> | | tomate | <i>RPG4</i> | Kobayashi <i>et al.</i> , 1989; Kobayashi <i>et al.</i> , 1989 |
| | <i>avrPtoB</i> | E3 ubiquitine ligase | tomate | <i>Pf</i> | Ronald <i>et al.</i> , 1992b; Salmeron <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>avrRpt2</i> | protéase à cystéine | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPS2</i> | Kim <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>phaseolicola</i> | <i>avrPphC</i> | | soja | | Whalen <i>et al.</i> , 1991; Kunkel <i>et al.</i> , 1993 ; |
| | <i>avrPphB</i> | protéase à cystéine | haricot | <i>R3</i> | Yucel <i>et al.</i> , 1994 ; Jenner <i>et al.</i> , 1991 |
| | <i>avrPphE</i> | | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPS5</i> | Simonich <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>avrPphF</i> | | haricot | <i>R2</i> | Mansfield <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>pisi</i> | <i>avrPpiA1</i> | | soja | <i>R1</i> | Tsiasmis <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>avrRps4</i> | | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPM1</i> | Dangl <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>syringae</i> | <i>hopA1</i> | | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPS4</i> | Hinsch and Staskawicz, 1996 |
| | <i>hopZ1a</i> | acetyl transferase | <i>Arabidopsis</i> | <i>RPS6</i> | Gassmann, 2005; Kim <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>maculicola</i> | <i>avrRpm1</i> | kinase | <i>Arabidopsis</i> | <i>ZAR1</i> | Zhou <i>et al.</i> , 2009; Lewis <i>et al.</i> , 2010 |
| | | | | <i>RPM1</i> | Debenert <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. | | | | | |
| <i>vesicatoria</i> | <i>avrBs1</i> | phosphatase à tyrosine | poivron | <i>Bs1</i> | Ronald and Staskawicz, 1988 |
| | <i>avrBs2</i> | glycéro-p-diesterase | poivron | <i>Bs2</i> | Minsavage <i>et al.</i> , 1990 |
| | <i>avrBs3</i> | TAL | poivron | <i>Bs3</i> | Herbers <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>avrBs4</i> | TAL | tomate | <i>Bs4</i> | Canteros <i>et al.</i> , 1991; Ballvora <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>AvrBsT</i> | famille YopJ/AvrRxv | poivron | <i>BsT</i> | Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999 |
| | <i>AvrXv3</i> | TAL | tomate | <i>Xv3</i> | Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a |
| | <i>AvrXv4</i> | SUMOylase | tomate | <i>Xv4</i> | Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000b |
| <i>campestris</i> | <i>AvrRxv</i> | famille YopJ/AvrRxv | haricot | <i>Rxv</i> | Whalen <i>et al.</i> , 1988 |
| | <i>avrXccC</i> | | moutarde | | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>xopE2</i> | | chou | | He <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>armoraciae</i> | <i>avrAC</i> | | <i>Arabidopsis</i> | | Xu <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>hax3</i> | TAL | tomate | <i>Bs4</i> | Kay <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>hax4</i> | TAL | tomate | <i>Bs4</i> | Kay <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. | | | | | |
| <i>oryzae</i> | <i>avrXa5</i> | TAL | riz | <i>Xa5</i> | Zou <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>avrXa7</i> | TAL | riz | <i>Xa7</i> | Hopkins <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>avrXa10</i> | TAL | riz | <i>Xa10</i> | Hopkins <i>et al.</i> , 1992; Zhu <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>avrXa21</i> | | riz | <i>XA21</i> | Ronald <i>et al.</i> , 1992a; Da Silva <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>AvrXa27</i> | TAL | riz | <i>Xa27</i> | Gu <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>oryzicola</i> | <i>AvrRxo1</i> | | maïs | <i>Rxo1</i> | Zhao <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Xanthomonas gardneri</i> | | | | | |
| | <i>avrHha1</i> | TAL | poivron | <i>BS3</i> | Schornack <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>avrBs7</i> | phosphatase à tyrosine | poivron | <i>BS7</i> | Potnis <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Xanthomonas vesicatoria</i> | | | | | |
| | <i>avrBs1.1</i> | | poivron | <i>Bs7</i> | Potnis <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | | | | | |
| | <i>popP2</i> | acetyl transferase | <i>Arabidopsis</i> | <i>RRS1-R</i> | Deslandes <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>awr4</i> | | <i>Arabidopsis</i> | | Sole <i>et al.</i> , 2012 |
| | <i>awr5</i> | | <i>Arabidopsis</i> | | Sole <i>et al.</i> , 2012 |
| | | | tabac | | Sole <i>et al.</i> , 2012 |

limitant la multiplication et la propagation du pathogène (**Figure P**). L'absence ou la mutation de l'un ou des deux partenaires entraînent une interaction compatible et donc l'établissement de la maladie (**Figure P**). Le **Tableau A** montre les principaux gènes *avr* identifiés ces 30 dernières années. De nombreux gènes *R* restent à identifier et à la différence des gènes *avr*, seule une dizaine de gènes *R* ont été clonés.

Contrairement aux PAMPs, les gènes *Avr* ne sont pas présents chez toutes les bactéries (voire toutes les souches d'une espèce bactérienne). De façon similaire, les gènes *R* permettant la reconnaissance d'un gène *Avr* correspondant ne sont pas présents chez tous les cultivars d'une espèce végétale. Le modèle gène-pour-gène gouverne donc une résistance de type : race (sous-pathovar)/cultivar. Le gène *ax21* représente encore une fois l'exception car c'est un gène qui est conservé chez toutes les bactéries du genre *Xanthomonas*. On le retrouve également chez d'autres bactéries telles que *Xyloella fastidiosa* (*X. fastidiosa*) ou le pathogène opportuniste humain *Stenotrophomonas maltophilia* (Lee *et al.*, 2009). A la vue de toutes ces différences avec les autres gènes *avr*, le débat est toujours en cours sur la classification de *axY²²S* : PAMP ou Protéine *Avr* ?

Les ET3 sont des agents doubles qui vont à la fois permettre à la bactérie d'avoir un avantage face à la plante mais ils vont aussi trahir la présence de cette dernière. La reconnaissance des gènes *Avr* par les gènes *R* permet l'activation de l'ETI et de la HR.

II.2.2 Reconnaissance des protéines *Avr*

La plupart des gènes *R* clonés à ce jour codent des protéines de type nucleotide-binding leucine rich repeat (NB-LRR) qui permettent la reconnaissance de divers types de protéines *Avr* et de toutes les classes de pathogènes végétaux (Eitas and Dangl, 2010; Elmore *et al.*, 2011). Le domaine NB est un domaine de liaison/d'hydrolyse de l'ATP et qui peut aussi intervenir dans la signalisation en aval des gènes *R*. Le domaine LRR est un domaine d'interaction qui permet aux protéines NB-LRR de lier leur ligand. Ce domaine est un régulateur positif (liaison à la protéine *Avr*) et négatif (autoinhibition) de la signalisation (Eitas and Dangl, 2010; Elmore *et al.*, 2011). Chez les plantes, les protéines NB-LRR sont divisées en deux classes selon la présence d'un domaine CC (Coiled-Coil) ou d'un domaine TIR (Toll and human interleukin-1) en N-terminal (**Figure Q** ; Eitas and Dangl, 2010; Elmore *et al.*, 2011). La présence de ces deux domaines influence la nature des protéines qui sont recrutées pour la signalisation en aval de la reconnaissance. En plus des domaines CC et TIR, des domaines additionnels tels que les domaines NLS et WRKY chez la protéine R RRS1-R d'*Arabidopsis* conférant la résistance à la souche GMI1000 de *R. solanacearum* peuvent être présents (**Figure Q** ; Deslandes *et al.*, 1998; Deslandes *et al.*, 2002; Eitas and

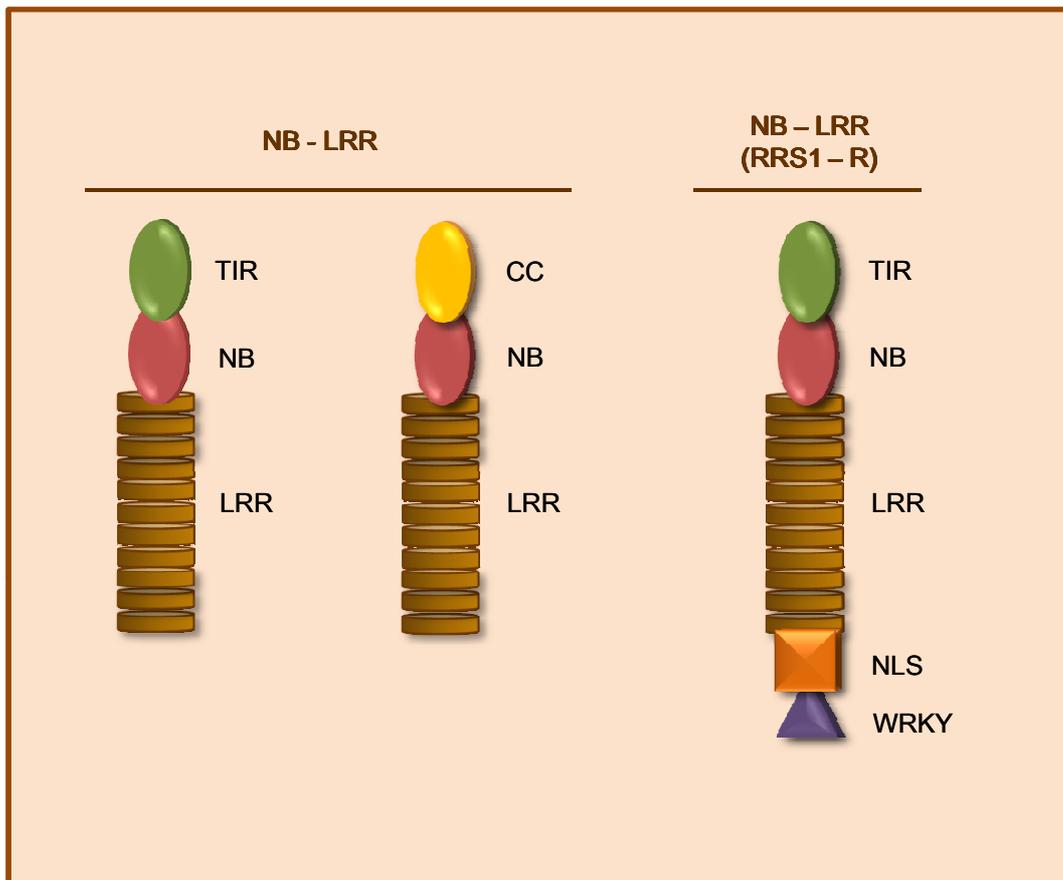


Figure Q : Représentation schématique des protéines de résistance NB-LRR végétales. Les protéines NB-LRR sont des protéines intracellulaires qui sont impliquées dans la reconnaissance des protéines d'avirulence. Parmi les protéines NB-LRR, on distingue deux sous-classes selon le domaine N-terminal, l'une présentant un domaine TIR et l'autre un domaine CC. Une troisième classe représentée par la protéine RRS1-R qui comprend un domaine WRKY a été identifiée. TIR : Toll/Interleukin Receptor ; NB : Nucleotide Binding ; LRR : Leucin Rich Repeats ; CC : Coiled-Coil ; NLS : Nuclear Localization Signal ; WRKY est un domaine de fixation à l'ADN caractérisé par le motif formé par les 4 acides aminés WRKY.

Dangl, 2010). A noter une exception pour le gène d'avirulence *ax21*. Le gène R *Xa21* (reconnaissance de *axY^S22*) code un RLK montrant à nouveau la particularité de ce couple R/Avr (Song *et al.*, 1995). Le peptide *axY^S22* est aussi reconnu par le RLK FLS2 chez *A. thaliana* et active une réponse immunitaire similaire à celle induite par la reconnaissance de *flg22* par FLS2. De façon intéressante, FLS2 reconnaît les deux formes de la protéine *Ax21* (sulfonylée et non sulfonylée ; Danna *et al.*, 2011). Le gène *Xa21* n'est pas présent chez *A. thaliana* mais il fait partie de la même famille de RLK que FLS2. Il se pourrait que le gène *Xa21* du riz ait divergé afin de reconnaître spécifiquement *axY^S22*. Dans ce cas *axY^S22* correspondrait à la définition d'une protéine Avr car les gènes *raxSTAB* nécessaires à son activité élicitrice ne sont pas présents chez toutes les souches de *Xanthomonas* (Lee *et al.*, 2006). La protéine non sulfonylée étant présente chez toutes les souches de *Xanthomonas* et reconnue par FLS2 correspondrait à la définition d'un PAMP. Concernant le débat sur la classification de *Ax21*, le peptide *axY^S22* pourrait être considéré comme une protéine Avr et le peptide *axY22* comme un PAMP. Cette étude est intéressante car elle montre qu'au moins un PRR (et probablement d'autres PRR) est capable de reconnaître deux PAMPs différents.

Il existe deux modes de reconnaissance des protéines Avr : reconnaissance directe et reconnaissance indirecte.

II.2.2.1 Reconnaissance directe des protéines Avr

La première interaction physique entre une protéine R et une protéine Avr a été démontrée entre la protéine AvrPita de *Magnaporthe grisea* (oomycète pathogène du riz) et la protéine R Pi-ta du riz (Jia *et al.*, 2000). Chez les bactéries, une interaction physique directe a été démontrée entre la protéine RRS1 (protéine R) de *Arabidopsis* et la protéine PopP2 (protéine Avr) de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2003). De façon intéressante, un autre modèle particulier d'interaction directe existe entre les ET3 TAL et leur gène de résistance. Une mutation dans les domaines NLS ou AAD de AvrBs3 (*Xcv*) ou AvrXa27 (*Xoo*) supprime respectivement la reconnaissance de ces bactéries par leur gène de résistance *Bs3* et *Xa27* (Gu *et al.*, 2005; Marois *et al.*, 2002; Szurek *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que les TALs AvrBs3 et AvrXa27 vont directement induire l'expression de leur gène de résistance. En effet, chez le cultivar ECW 30R du poivron, le promoteur du gène *Bs3* possède une UPA-box permettant l'expression de ce dernier par AvrBs3 (**Figure J**). En plus des gènes de susceptibilité, l'ET3 AvrBs3 induit également la transcription de son gène R (*Bs3*) correspondant, ce qui permet de signaler la présence du pathogène et donc l'induction des défenses de la plante (Romer *et al.*, 2007). Plutôt qu'une interaction entre deux protéines, ce modèle d'interaction directe a lieu entre un TAL et un promoteur induit par ce dernier. De façon générale, la reconnaissance des TALs par leur

gène *R* correspondant requiert la présence des domaines NLS et AAD, indiquant que l'activité transcriptionnelle de ces ET3 est requise pour leur reconnaissance (Boch and Bonas, 2010). Hormis ces exemples, très peu d'interactions directes ont été démontrées. Un exemple provient d'une étude où les auteurs ont essayé de démontrer une interaction directe entre la protéine AVR9 (*Cladosporium flavum*) et la protéine de résistance Cf-9 (tomate). Dans cette étude malgré l'utilisation de différentes approches aucune interaction directe n'a été détectée entre les deux protéines (Luderer *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres mécanismes pour la reconnaissance des gènes *Avr*.

II.2.2.2 Reconnaissance indirecte des protéines Avr

En raison de l'absence de preuves d'interactions directes entre différentes protéines R et protéines Avr, un nouveau concept du modèle gène-pour-gène a vu le jour : « le modèle de garde » (Van der Biezen and Jones, 1998). Dans ce modèle, les protéines R « surveillent » des facteurs de susceptibilité qui sont ciblés par les effecteurs des pathogènes. En d'autres termes, les protéines R perçoivent les modifications induites par les effecteurs sur leurs cibles végétales. Ce modèle est conforté par le fait que le génome de *A. thaliana* ne code que 149 protéines NB-LRR dont 12 sont des pseudogènes (Meyers *et al.*, 2003). Ce nombre est probablement insuffisant pour couvrir tous les gènes *Avr* existant chez l'ensemble des phytopathogènes. Il serait plus intéressant pour la plante de « surveiller » des facteurs de susceptibilité que de reconnaître toutes les protéines Avr existantes. Plusieurs exemples sont bien illustrés dans la littérature.

Comme nous l'avons déjà vu, RIN4 est une protéine qui est impliquée dans l'inhibition de la PTI et dans l'ouverture des stomates (Afzal *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009b; Mackey *et al.*, 2002). De nombreux ET3 vont cibler cette protéine afin d'inhiber la PTI. L'évolution a permis à la plante de mettre au point des systèmes qui contrôlent les modifications imputées à cette protéine par différents ET3 (Hou *et al.*, 2011). La phosphorylation de la protéine RIN4 (**Figure O**) par les ET3 AvrB/AvrRpm1 est perçue par le gène de résistance *RPM1* (Chung *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Mackey *et al.*, 2003). Des données récentes montrent que la reconnaissance de AvrB et AvrRpm1 dépendante de *RPM1* nécessite la présence d'une autre protéine : RIPK (RPM1-Induced Protein Kinase ; Liu *et al.*, 2011). RIPK fait partie de la famille des RLCK. De façon surprenante, cette protéine est capable d'interagir et de phosphoryler AvrB et RIN4 *in vitro* et la phosphorylation de RIN4 par RIPK induit l'ETI dépendante de *RPM1* (Liu *et al.*, 2011). Cependant, les données actuelles ne permettent pas de savoir de quelle façon RIN4 est phosphorylée *in vivo*. Est-ce qu'il y a un transfert de phosphate de AvrB à RIN4 en passant par RIPK ou de RIPK à RIN4 en passant par AvrB. Un autre exemple de modification de la protéine RIN4 est illustré par l'ET3 AvrRpt2 (**Figure O**). Le clivage de RIN4 par AvrRpt2 est reconnu par *RPS2*

(Axtell and Staskawicz, 2003; Kim *et al.*, 2005a; Mackey *et al.*, 2003). En d'autres termes, la phosphorylation et le clivage de RIN4 permettent d'activer respectivement RPM1 et RPS2 qui vont à leur tour activer l'ETI.

Les protéines cibles peuvent aussi être des leurres qui ont été développés afin de protéger les protéines clés nécessaires à l'activation de la PTI. Par exemple, la protéine BIK1 est nécessaire à la transmission du signal permettant d'initier les réponses de défense contre les PAMPs flg22 et efl18 (Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La plante a développé des leurres, c'est-à-dire des protéines (PBS1, PBL1, PBL2) qui vont mimer l'action de BIK1 mais de manière moins efficace et moins intense (Zhang *et al.*, 2010). Afin de supprimer la PTI, l'effecteur AvrPphB de *P. syringae* (cystéine protéase) peut cliver BIK1 pour inhiber la signalisation en aval de cette protéine (Zhang *et al.*, 2010). Cependant, l'effecteur AvrPphB est aussi capable de cliver les homologues (PBS1, PBL1 et PBL2) de BIK1 (Shao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Le clivage de PBS1 est reconnu par le gène *R* *RPS5* qui va induire l'ETI (Ade *et al.*, 2007). Dans cet exemple, la plante détourne l'effecteur AvrPphB vers une autre protéine afin de maintenir la fonction cruciale de BIK1.

II.2.3 Signalisation en aval des protéines *R*

Le modèle gène-pour-gène prédit l'interaction entre un gène *Avr* et un gène *R* correspondant. Ce modèle est en constante évolution. Comme mentionné ci-dessus, plutôt que de reconnaître le gène *Avr*, le gène *R* reconnaît les modifications réalisées par le produit du gène *Avr* sur ses protéines cibles. De plus, un même gène *R* (*RPM1*) peut reconnaître différents gènes *Avr* (*avrB* et *avrRpm1*). Un nouveau concept émerge sur la nécessité d'avoir deux gènes *R* NB-LRR afin d'avoir la résistance complète contre un pathogène cible (Eitas and Dangl, 2010). De façon intéressante, le couple de NB-LRRs peut différer dans la structure des protéines codées et selon le pathogène. La résistance contre l'effecteur AvrB (*P. syringae*) requiert la présence des NB-LRR TAO1 (TIR-NB-LRR) et RPM1 (CC-NB-LRR) alors que celle contre PopP2 (*R. solanacearum*) requiert RPS4 (TIR-NB-LRR) et RRS1 (TIR-NB-LRR ; Eitas *et al.*, 2008; Narusaka *et al.*, 2009). Dans ces deux exemples, la résistance contre AvrB nécessite deux classes de NB-LRR alors que la résistance contre PopP2 ne requiert qu'une classe. Toutefois, la protéine RRS1 possède un domaine WRKY et pourrait donc être considérée comme une autre classe de protéine NB-LRR. Ce concept étant assez récent, la nécessité d'avoir deux NB-LRR de la même classe ou de classes différentes pour la résistance n'est pas très claire. Cependant, c'est un champ d'étude intéressant car les composants intermédiaires qui vont permettre d'activer la HR ne seront pas les mêmes selon que le gène *R* soit de type CC-NB-LRR ou TIR-NB-LRR.

Les études visant à caractériser les mécanismes sous-jacents de la reconnaissance par les protéines R ont permis de mettre en évidence chez *A. thaliana* la protéine NDR1 (Non-race-specific Disease Resistance 1) et EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1 ; Century *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1996). Le gène *NDR1* a été identifié dans un crible permettant de supprimer les résistances induites par les gènes R *RPS2*, *RPS5* et *RPM1* ainsi que différents gènes R (gènes *RPP* ; Resistance to *Peronospora parasitica*) impliqués dans la reconnaissance de différentes races de *P. parasitica* (Century *et al.*, 1995). Le gène *EDS1* a été identifié dans un crible permettant de supprimer les résistances induites par différents gènes *RPP* mais pas celles induites par *RPM1* (Parker *et al.*, 1996). Des études ont montré que les voies de signalisation *EDS1* et *NDR1* sont mutuellement exclusives et qu'elles permettent de différencier les réponses induites par les deux classes de NB-LRR (Aarts *et al.*, 1998). La classe CC-NB-LRR (*RPM1*, *RPS2* et *RPS5*) induit une signalisation *via* *NDR1* alors que la classe TIR-NB-LRR requiert la voie *EDS1* (Aarts *et al.*, 1998). D'autres facteurs interviennent dans la signalisation passant par *EDS1*. Les gènes *PAD4* et *SAG101* sont également impliqués dans la voie de signalisation des protéines TIR-NB-LRR (Feys *et al.*, 2005; Glazebrook *et al.*, 1997). Ces deux protéines sont fonctionnellement redondantes et sont toutes deux capables d'interagir avec *EDS1* (Feys *et al.*, 2001; Feys *et al.*, 2005). Une étude récente montre que les 3 protéines forment un complexe qui se localise dans le noyau (Zhu *et al.*, 2011).

Toutefois, les exemples cités ci-dessus ne sont pas des règles absolues. Il existe des protéines de type TIR-NB-LRR qui peuvent passer par *NDR1* ou des protéines CC-NB-LRR passant par *EDS1* (Glazebrook, 2001). Certaines voies de signalisation sont indépendantes de *EDS1* et *NDR1* comme cela a été démontré pour les gènes de résistance *RPP13* et *ZAR1* qui ne nécessitent pas la présence de ces deux gènes (Bittner-Eddy and Beynon, 2001; Lewis *et al.*, 2010).

Certains gènes R peuvent moduler indirectement ou directement l'expression de gènes associés aux réactions de défense. Le gène R *MLA10* de l'orge se localise dans le noyau après reconnaissance de la protéine Avr *Avr_{A10}* de *Blumeria graminis* (Shen *et al.*, 2007). Cette localisation nucléaire permet à la protéine *MLA10* d'interagir avec des facteurs de transcription de type WRKY et de moduler l'expression de gènes impliqués dans la résistance. De même, le gène R *RRS1* se localise dans le noyau des cellules et pourrait directement modifier l'expression de gènes cibles grâce à son domaine WRKY (**Figure Q** ; Deslandes *et al.*, 2003).

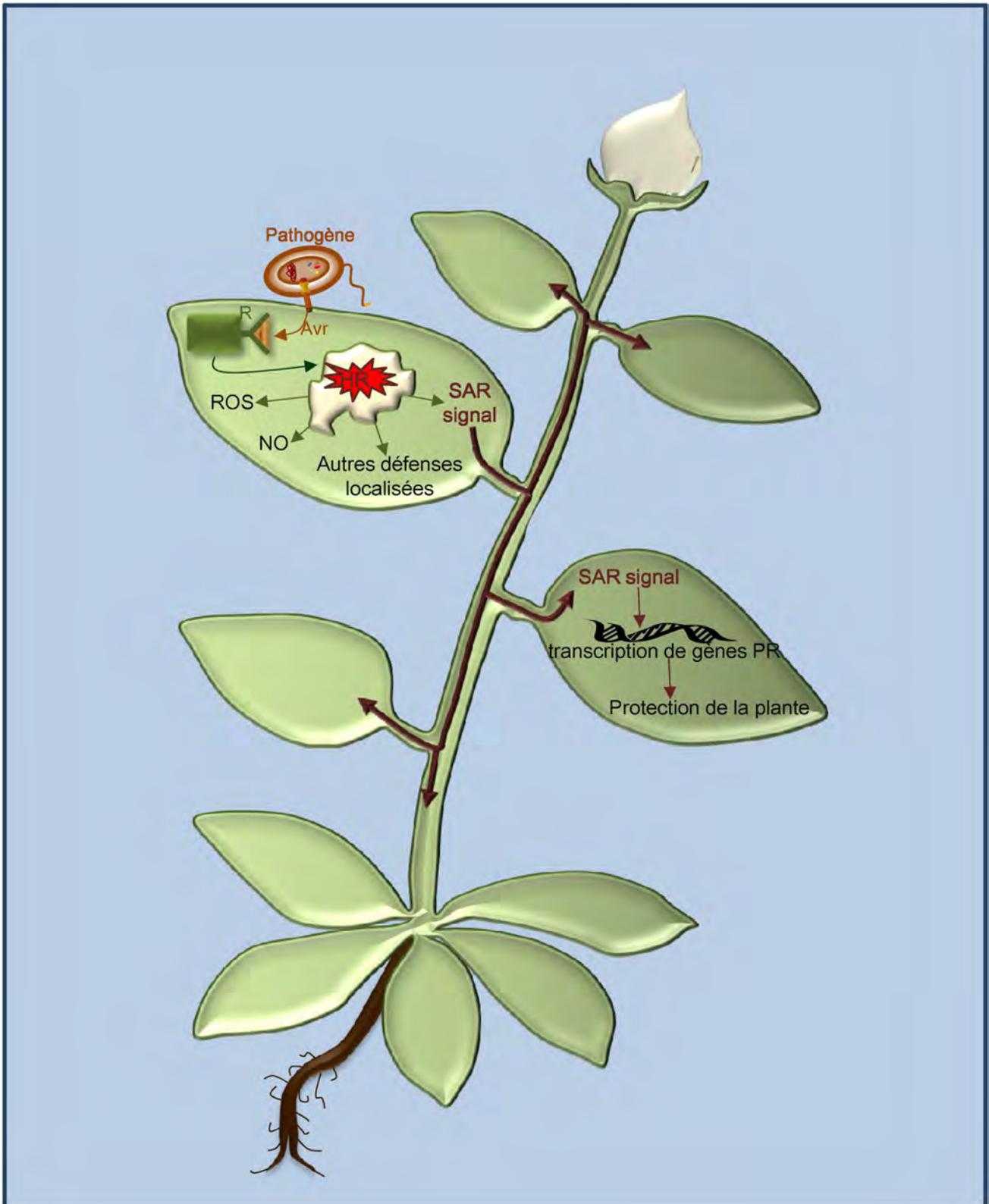


Figure R : Activation de la résistance systémique acquise. L'interaction R/Avr induit une réponse hypersensible (HR) et la réponse systémique acquise [systemic acquired resistance (SAR)] chez les cellules voisines. Le signal de la SAR est ensuite véhiculé à travers toute la plante afin de prévenir l'infection par un pathogène. PR : Pathogenesis-Related genes ; NO : Oxyde Nitrique ; ROS ; espèces réactives de l'oxygène.

Tous ces résultats montrent que les protéines NB-LRR utilisent des voies de signalisation complexes. Certaines de ces voies ou mécanismes restent à compléter et/ou identifier afin de mieux comprendre la signalisation en aval des gènes *R*. L'activation des protéines *R* va permettre l'activation de l'ETI qui se traduit généralement par une HR [pour revue (Heath, 2000; Mur *et al.*, 2008)]. La HR permet également d'induire des signaux qui vont conférer une résistance systémique acquise à la plante (Systemic Acquired Resistance ; SAR). En effet, les cellules qui ont déclenché la HR vont produire des messagers secondaires (**Figure R**) permettant de prévenir les cellules voisines (mais également toute la plante) de l'attaque d'un pathogène. Durant la SAR, il y aura accumulation d'acide salicylique (Salicylic Acid ; SA), une forte expression de gènes associés aux défenses ainsi que d'autres processus physiologiques qui confèrent une résistance accrue à la plante contre un large spectre de pathogène [**Figure R** ; (pour revue ; Carr *et al.*, 2010)].

Les plantes ont été capables d'acquérir des stratégies leur permettant de reconnaître les ET3 et déclencher une réponse immunitaire en réponse à ces derniers. Similairement à la suppression de la PTI, l'évolution des bactéries leur a permis de développer des stratégies pour contourner ou supprimer l'ETI afin d'éviter leur reconnaissance *via* les ET3.

II.2.4 Contournement de l'immunité spécifique

Selon le modèle du Zig-Zag (**Figure B**) suite à la reconnaissance d'un ET3 par la plante, les bactéries ont deux mécanismes pour éviter la reconnaissance et donc éviter la réponse immunitaire (Jones and Dangl, 2006). Le premier mécanisme consiste à muter ou supprimer l'ET3 reconnu. En général, et à la différence des PAMPs, les ET3 ne sont pas essentiels à la viabilité ou à l'adaptabilité de la bactérie. De plus, les ET3 sont souvent présents au sein d'îlots de pathogénie ou entourés d'éléments génétiques mobiles (Alfano and Collmer, 1997; Alfano *et al.*, 2000; Gurlebeck *et al.*, 2006). En raison de toutes ces particularités, il est facile pour les bactéries de faire évoluer ou de perdre leurs ET3 lorsqu'ils deviennent encombrants pour le pouvoir pathogène.

Par exemple, l'effecteur AvrPphB de *P. syringae pv. phaseolicola* est reconnu chez les cultivars de Haricot possédant le gène de résistance *R3* (Puri *et al.*, 1997). Cet effecteur fait partie d'un cluster (PPHGI-1) qui est entouré des sites de recombinaison *att* (L et R) et code une intégrase *xerC* (Pitman *et al.*, 2005). Au cours de l'infection de la plante résistante, l'expression du gène *xerC* est activée. La protéine XerC qui est alors produite permet l'excision du cluster PPHGI-1. L'excision de ce cluster entraîne la perte du gène d'avirulence

avrPphB ce qui rend les bactéries virulentes sur les cultivars de haricot possédant le gène de résistance *R3* (Pitman *et al.*, 2005).

Le deuxième mécanisme utilisé par les bactéries consiste à acquérir ou faire évoluer des ET3 qui vont supprimer la HR induite chez la plante par d'autres ET3.

II.2.5 Suppression de l'immunité spécifique par les ET3

Le premier modèle de suppression d'ETI a été observé avec les gènes R *RPS2* et *RPM1* de *A. thaliana* permettant de reconnaître respectivement les gènes *Avr avrRpt2* et *avrRpm1* de *P. syringae*. Chez une lignée *RPM1/rps2* de *A. thaliana* la présence de l'ET3 *AvrRpt2* permet de supprimer la reconnaissance de l'ET3 *AvrRpm1* par le gène R *RPM1* ainsi que la HR induite par ce dernier (Mackey *et al.*, 2003; Ritter and Dangl, 1996). Cette suppression de HR est due au clivage de la protéine RIN4 par *AvrRpt2* (Mackey *et al.*, 2003). Le clivage de la protéine RIN4 entraîne une relocalisation de RIN4 dans le cytosol suivi de sa dégradation par le protéasome (Kim *et al.*, 2005a). La protéine RIN4 est donc inaccessible à l'ET3 *AvrRpm1* qui ne pourra pas induire sa phosphorylation perçue par *RPM1*. Ce mécanisme de suppression de ETI par *AvrRpt2* est aussi valable pour l'effecteur *AvrB* (Kim *et al.*, 2005a). Cet exemple montre une suppression d'ETI par la modification de la cible d'un gène *Avr*.

Récemment, un autre modèle mis à jour chez *Xcv* montre que la suppression d'ETI peut aussi intervenir en agissant sur un composant important pour la mise en place de la HR (Szczesny *et al.*, 2010a). L'effecteur *AvrBsT* de *Xcv* interagit avec une protéine SNF1-related kinase 1 afin de supprimer la HR induite par l'effecteur *AvrBs1* sur poivron ECW-10R. De façon intéressante, la protéine SNF1-related kinase 1 n'est pas une cible de *AvrBs1* et la suppression de son expression par silencing est suffisante pour inhiber la HR induite par *AvrBs1*. Cependant, la nature de la suppression de la HR par *AvrBsT* via son interaction avec la protéine SNF1-related kinase 1 n'a pas encore été élucidée. Toutefois, un mutant catalytique de *AvrBsT* n'est plus capable de supprimer la HR dépendante de *AvrBs1*, montrant ainsi que l'activité enzymatique de *AvrBsT* est nécessaire (Szczesny *et al.*, 2010a).

Bien que les mécanismes de suppression d'ETI soient encore très mal décrits, les données montrant le rôle des ET3 dans la suppression de la HR sont nombreuses. Une étude a montré que la plupart des ET3 de *Pto* DC3000 en sont capables (Guo *et al.*, 2009). De façon intéressante, les ET3 qui suppriment l'ETI sont aussi capables de supprimer la PTI tels que les ET3 *AvrPtoB* de *Pto* DC3000 et *XopB* de *Xcv* (Abramovitch *et al.*, 2003; Schulze *et al.*, 2012). Ces données suggèrent qu'il y aurait une connexion entre la PTI et l'ETI.

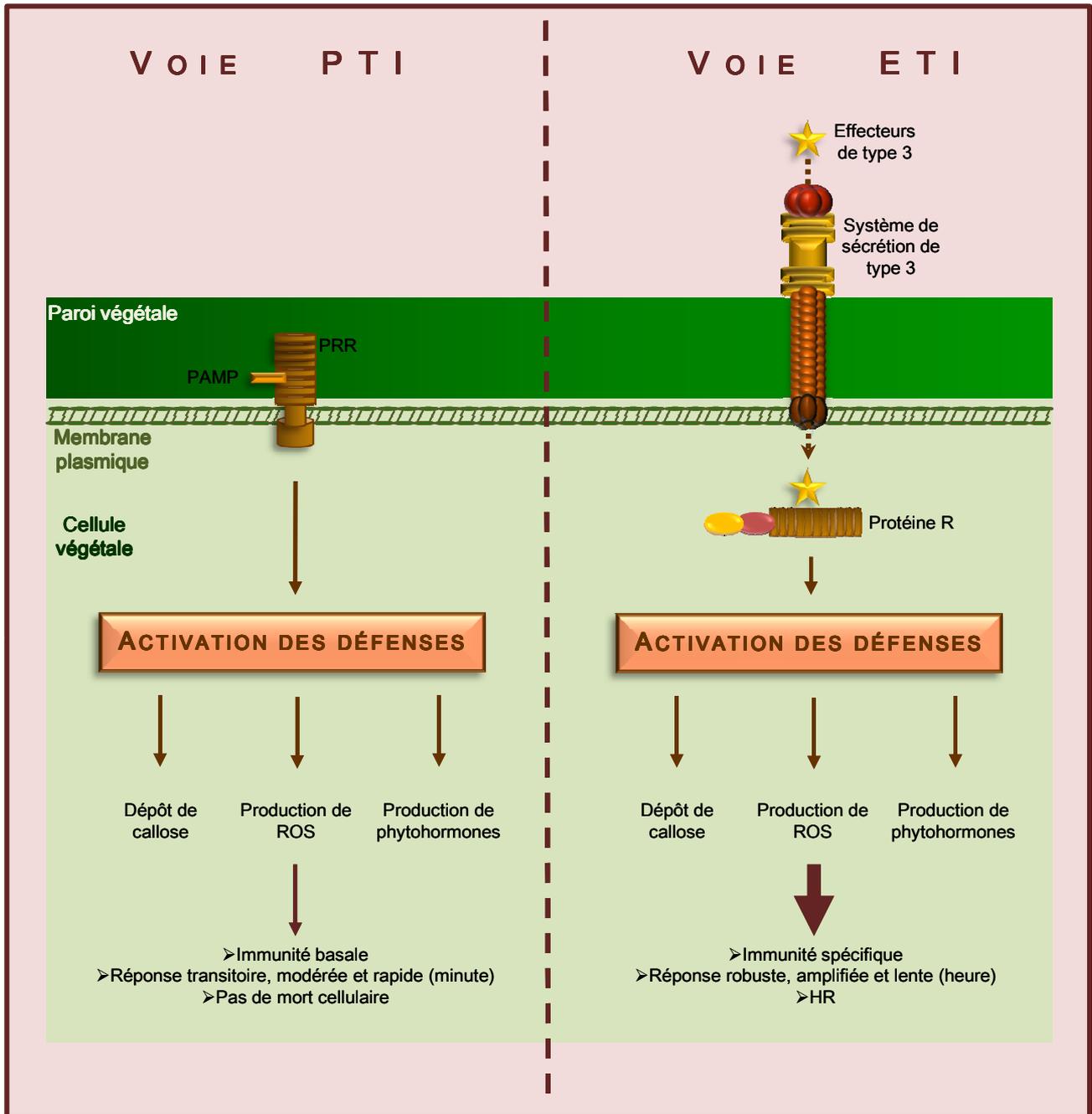


Figure S : Similarité entre les réponses immunitaires PTI (PAMP-Triggered Immunity) et ETI (Effector-Triggered Immunity). Les deux voies de signalisation utilisent des récepteurs protéiques contenant un domaine LRR afin de reconnaître un ligand. Dans les deux cas, des réponses similaires sont induites. Toutefois, elles vont différer dans le timing et la force de la réponse immunitaire. De plus, dans la réponse ETI on observe une mort cellulaire programmée qui n'est pas présente lors de la PTI. HR : Hypersensitive Response ; PRR : Pattern Recognition Receptor ; PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern ; protéine R : protéine de Résistance.

II.2.6 Connexion et similarité entre PTI et l'ETI

La suppression de la PTI par les ET3 est un problème majeur rencontré par la plante au cours de l'infection. Une des clés pour contrer l'agent pathogène consiste à réactiver l'immunité basale (Jones and Dangl, 2006). L'ETI est maintenant admise par la communauté comme étant une réponse permettant de reconnaître spécifiquement (reconnaissance R/Avr) des agents pathogènes mais elle permettrait également de rétablir une PTI fonctionnelle (Jones and Dangl, 2006). L'ETI serait donc une réponse qui a évolué à partir de la PTI (**Figure S**). Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse : i) les deux réponses activent des réponses similaires intervenant dans la réponse immunitaire telle que l'activation de la voie de signalisation MAPK, la production de ROS, l'apposition de callose et la production de phytohormones (SA, acide jasmonique... ; An and Mou, 2011; Deslandes *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007) ; ii) elles activent un set de gènes communs (Navarro *et al.*, 2004) ; iii) une étude montre que la réponse ETI est capable de rétablir l'apposition de callose qui est supprimée durant la PTI par l'effecteur HopM1 de *P. syringae* (Nomura *et al.*, 2011) ; iv) récemment, une étude a montré qu'en plus d'un lien génétique entre la PTI et l'ETI il y a également un lien physique entre les deux réponses. Dans cette étude, les auteurs montrent que les protéines R RPS2, RPM1, RPS5 (réponse ETI) et FLS2 (réponse PTI) interagissent entre elles et sont donc présentes au sein d'un complexe (Qi *et al.*, 2012) ; v) les deux réponses impliquent une reconnaissance des épitopes bactériens par la présence de protéines ayant un domaine LRR qui permet de lier le ligand. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les plantes utilisent des voies de signalisation communes entre la PTI et l'ETI en réponse à des pathogènes et que l'ETI pourrait avoir évolué à partir de la PTI. Cependant, la réponse PTI semble être une réponse transitoire et modérée alors que l'ETI serait une version amplifiée et beaucoup plus robuste car elle conduit à la mort cellulaire (**Figure S** ; Jones and Dangl, 2006). De plus, la réponse PTI est une réponse rapide (de l'ordre de la minute) alors que l'ETI est une réponse longue (de l'ordre de l'heure ; Abramovitch *et al.*, 2006a). La vitesse d'induction des deux réponses pourrait être due à la méthode d'analyse de ces deux voies de signalisation. En effet, dans la PTI, les molécules élicitrices sont infiltrées directement dans les feuilles ou mises en contact direct avec des cultures cellulaires alors que dans l'ETI les molécules élicitrices sont délivrées par les bactéries. Dans le cas de l'ETI, le temps de réponse observé pourrait simplement être dû au fait, qu'il faille beaucoup plus de temps pour que la molécule soit mise en contact avec les cellules. Il faudrait prendre en compte le temps que les bactéries entrent en contact avec les cellules végétales, le temps que le SST3 soit mis en place et qu'il puisse transloquer les ET3. Une étude montre que la protéine AVR9 (*Cladosporium flavum*) induit des réponses de défenses (production de ROS, phosphorylation de MAPK) qui sont de

l'ordre de la minute (Romeis *et al.*, 2000). Dans cette étude, les auteurs ont mis directement en contact la protéine AVR9 avec des cultures cellulaires de tabac exprimant le gène d'avirulence (Cf-9) correspondant à AVR9 (Romeis *et al.*, 2000). Cette étude montre que de façon similaire à la PTI, l'ETI est aussi une réponse qui est rapide.

L'interaction entre les phytopathogènes et les plantes ressemble à une course à l'armement entre les deux partenaires. Cette course à l'armement permet une coévolution permanente des deux partenaires. Les protéines sécrétées (protéine Avr) par le SST3 et les protéines R de l'ETI sont à la base de l'interaction entre une bactérie et sa plante hôte. En plus de gouverner la résistance chez les plantes, le modèle gène-pour-gène (interaction R/Avr) est pensé comme étant à la base de la spécificité d'hôte des agents pathogènes.

II.2.7 Spécificité d'hôte et tissulaire : facteurs génétiques et moléculaires

Les études sur les interactions plantes-microorganismes montrent des particularités intéressantes. Toutes les bactéries ne sont pas capables d'infecter les mêmes tissus. De plus, toutes les bactéries d'une même espèce ne sont pas capables d'infecter le même hôte. Il existe donc deux composantes principales qui entrent en jeu dans l'interaction plante-bactéries pathogènes : la spécificité d'hôte et la spécificité tissulaire. Il est possible de définir plusieurs groupes de pathogène sur la base de leur spécificité tissulaire : les pathogènes vasculaires et ceux colonisant le mésophile, les pathogènes foliaires ou racinaires. Cependant, dans ce manuscrit, nous nous intéresserons qu'aux pathogènes vasculaires et à ceux colonisant le mésophile

Avant de voir quels mécanismes moléculaires peuvent expliquer ces deux spécificités tissulaires (en se plaçant du point de vue des bactéries), il m'a semblé intéressant de faire un point sur les nomenclatures actuelles concernant les interactions plantes-bactéries pathogènes.

Selon le type d'interaction entre le pathogène et la plante : la plante est dite hôte ou non hôte. Une plante est dite non hôte quand tous les cultivars d'une espèce sont résistants à une espèce d'un microorganisme pathogène. L'interaction entre les deux espèces est dite incompatible. Une plante est dite hôte quand au moins un cultivar de l'espèce est sensible à une ou plusieurs souches de l'espèce d'un microorganisme pathogène. L'interaction entre les deux partenaires est dite compatible. Cependant, chez une plante hôte certains cultivars peuvent être résistants à certaines souches de l'espèce d'un microorganisme pathogène. Sous-jacent au concept de la plante hôte, il y a le spectre ou la gamme d'hôte. Le spectre

d'hôte est défini par le nombre d'espèces végétales qu'un agent pathogène est capable de coloniser. Par exemple, un pathogène tel que *R. solanacearum* est considéré comme un phytopathogène à large spectre d'hôte car il est capable d'infecter plus de 200 plantes hôtes (Genin, 2010).

Chez les bactéries pathogènes des plantes il est fréquent de trouver le mot « pathovar » en 3^{ème} ou 4^{ème} position après le nom binomial (genre et espèce). Le pathovar différencie à un niveau intraspécifique (au sein d'une même espèce) des bactéries apparentées qui provoquent des symptômes différents sur une même plante ou des symptômes similaires sur différentes plantes hôtes. Par exemple, l'espèce *P. syringae* compte plus de 50 pathovar qui causent les mêmes symptômes mais sur des plantes hôtes différentes (O'Brien *et al.*, 2011). Il est aussi courant de trouver le mot « race » après le pathovar. Le terme race permet de différencier (à un niveau intrapathovar) différentes souches qui donnent des réponses différentielles sur différents génotypes (cultivars) d'une même plante hôte. Bien qu'ils soient utiles aux phytopathologistes, la valeur biologique de ces deux termes est questionnable car cette classification n'est basée que sur une seule caractéristique qui est le résultat d'une interaction avec un autre organisme. Par exemple, l'espèce *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* regroupe au sein du même pathovar des souches qui sont pathogènes sur le haricot et qui produisent des symptômes similaires sur cette plante hôte. Toutefois, les études phylogénétiques montrent que les souches de ce pathovar se répartissent au sein de quatre lignées génétiques différentes (Alavi *et al.*, 2008). De plus, dans certains cas, le terme pathovar n'est pas suffisant pour décrire la diversité observée au sein d'une espèce. Ceci est le cas pour *R. solanacearum* qui représente un « complexe d'espèces » (Fegan and Prior, 2005). Un complexe d'espèces est défini comme un cluster de souches dont les membres peuvent représenter une espèce.

La notion d'espèce chez les bactéries est très différente de celle en vigueur chez les eucaryotes (Costechareyre *et al.*, 2009). Actuellement, de nombreuses études se concentrent sur les facteurs permettant de donner une valeur un peu plus biologique aux termes « pathovar » et « race ». De plus, des études sont aussi en cours afin de savoir si la classification en pathovar est pertinente. En effet, des souches comprises au sein d'un pathovar pourraient représenter des espèces à part entière. Tel est le cas de la souche Xcv qui autrefois faisait partie de l'espèce *campestris*. Par la suite, elle a été reclassée dans l'espèce *axonopodis* et finalement classée comme une espèce à part entière (*Xanthomonas euvesicatoria* ; Jones *et al.*, 2004). Toutes ces recherches visent *in fine* à identifier des traits génétiques permettant d'expliquer la spécificité d'hôte et tissulaire.

II.2.7.1 Traits génétiques impliqués dans la spécificité et le spectre d'hôte

Les principaux facteurs de virulence suspectés d'être impliqués dans le spectre d'hôte sont les ET3. Bien que la délétion d'un ou plusieurs ET3 n'ait pas d'effet sur l'agressivité, la présence ou l'absence de certains ET3 peut grandement modifier le spectre d'hôte des bactéries. Certains ET3 (Avr) induisent une réponse immunitaire chez les plantes et sont donc impliqués dans la diminution du spectre d'hôte (Vivian and Arnold, 2000). Par exemple, *N. benthamiana* n'est pas un hôte pour la bactérie *Pto* DC3000 car cette dernière induit une HR chez cette plante. La HR est induite par la présence de l'effecteur HopQ1-1 (Wei *et al.*, 2007). La mutagenèse de l'ET3 *hopQ1-1* permet à *Pto* DC3000 de devenir virulente sur *N. benthamiana* (Wei *et al.*, 2007). Cet exemple montre une diminution du spectre d'hôte de la bactérie *Pto* DC3000 en raison de la présence d'un ET3. Toutefois, certains effecteurs vont aussi pouvoir augmenter le spectre d'hôte. L'effecteur GALA7 de *R. solanacearum* est absolument requis pour le pouvoir pathogène de la bactérie sur *Medicago truncatula* (Angot *et al.*, 2006). L'exemple de GALA7 qui augmente le spectre d'hôte de *R. solanacearum* suggère que plus une bactérie aura des ET3 plus elle sera capable d'infecter un grand nombre d'espèces végétales. Par exemple, le large spectre d'hôte de *R. solanacearum* (>200 plantes ; Genin, 2010) pourrait s'expliquer par le fait que l'on dénombre au moins 74 ET3 chez cette bactérie (Poueymiro and Genin, 2009). Ce nombre contraste avec celui observé chez l'espèce *P. syringae* où chaque souche ne possède qu'une trentaine d'effecteurs ce qui pourrait expliquer leur spectre d'hôte étroit (O'Brien *et al.*, 2011).

Des travaux préliminaires réalisés chez *P. syringae* montrent que les ET3 sont distribués de façon hétérogène au sein des différents pathovar. Cette distribution hétérogène pourrait être à la base de l'adaptation de certaines souches sur leurs plantes hôtes et donc de la classification en pathovar. (Guttman *et al.*, 2002). Afin de confirmer cette hypothèse, Sarkar et ses collègues (Sarkar *et al.*, 2006) ont réalisé une étude de comparaison génomique par hybridation par le biais de puce à ADN (microarray-based comparative génomique ; CGH). Dans cette étude, l'ADN génomique de diverses souches est hybridée sur une puce à ADN contenant des séquences génomiques d'une souche de référence. Dans leur étude les auteurs ont utilisé 91 souches de *P. syringae* isolées à partir de 39 plantes hôtes. Cette étude fut la première à utiliser le CGH dans le but de rechercher des gènes associés à l'adaptation des souches sur leur plante hôte. Les principaux résultats de cette étude montrent que certains ET3 sont fortement associés avec la structuration en pathovar de certaines souches, suggérant leur implication dans l'adaptation de l'hôte. Par exemple, les 9 souches de soja utilisées dans leur étude (*P. syringae* pv. *glycinea*) ont montré une association significative avec les ET3 *hopA1* et *hopAj1*, suggérant que ces deux

ET3 sont requis pour le pouvoir pathogène sur le soja (Sarkar *et al.*, 2006). Dans une autre étude, Hajri *et al.* (2009) ont émis une hypothèse intéressante qu'ils ont formalisé dans le modèle du « répertoire pour répertoire » (Hajri *et al.*, 2009). Ce modèle prédit que le répertoire d'ET3 de chaque souche correspond à l'adaptation de ces dernières sur leur plante hôte. Dans leur étude les auteurs ont analysé le répertoire d'ET3 de 132 souches de *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*). Grâce à cette analyse, ils ont pu observer une corrélation entre la composition du répertoire d'ET3 et les pathovar de *X. axonopodis*. L'exemple le plus intéressant provient du pathovar *phaseoli*. Comme cité ci-dessus le pathovar *phaseoli* est polyphylétique mais les souches de ce pathovar possèdent un répertoire d'ET3 très similaire qui est corrélé avec la classification de ces souches au sein du même pathovar (Hajri *et al.*, 2009).

En plus des ET3, d'autres facteurs pourraient être impliqués dans l'adaptation à l'hôte tel que les phytotoxines. En effet, ces facteurs de virulence possèdent également une distribution hétérogène. Ces molécules peuvent également différer dans leur composition et de ce fait influencer la virulence selon l'hôte (Baltrus *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2006).

Une fois que les facteurs de virulence spécifiques d'un hôte seront identifiés, il restera à savoir à quel niveau ces facteurs agissent. Par exemple, ils pourraient être impliqués dans la colonisation de tissus éloignés du site primaire d'infection ou dans le mode d'entrée préférentiel du pathogène à l'intérieur de son hôte (spécificité tissulaire).

II.2.7.2 Traits génétiques impliqués dans la spécificité tissulaire

Les pathogènes du mésophile ont fait l'objet de nombreuses attentions permettant ainsi d'identifier les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans la réponse immunitaire des plantes (Nishimura and Dangl, 2010). A la différence, les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire face aux pathogènes vasculaires ont été peu étudiés. En conséquence, les données permettant de comprendre et d'expliquer les différences qui pourraient exister entre les deux types de colonisation sont très limitées. Une des hypothèses formulées est que la réponse immunitaire qui a lieu dans le mésophile serait différente de celle du système vasculaire. Toutefois, la résistance face à *R. solanacearum* (pathogène vasculaire) chez *A. thaliana* impliquant le gène R *RRS1* requiert des réponses similaires à celles retrouvées dans le mésophile. La résistance passant par *RRS1* dépend de la présence du gène *NDR1* ainsi que de l'accumulation de SA (Deslandes *et al.*, 2002).

La différence pourrait se faire au niveau de l'entrée à l'intérieur de la plante hôte. Les pathogènes du mésophile pénètrent à l'intérieur des feuilles *via* les stomates. Afin d'induire l'ouverture des stomates certains pathovar de l'espèce *P. syringae* synthétisent une phytotoxine : COR (Young *et al.*, 1992). Cette phytotoxine permet la réouverture des

stomates 3h après leur fermeture suite à la reconnaissance de *P. syringae* afin que ce dernier puisse à nouveau envahir le mésophyle (Melotto *et al.*, 2006). La phytotoxine COR est donc nécessaire à la multiplication *in planta* ainsi qu'à la production des symptômes (Brooks *et al.*, 2004; Mittal and Davis, 1995). En plus de la phytotoxine COR, certains ET3 vont également cibler la protéine RIN4 qui est impliquée dans l'ouverture des stomates (Axtell and Staskawicz, 2003; Deslandes and Rivas, 2012; Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Wilton *et al.*, 2010). Une raison pour laquelle les pathogènes vasculaires ne pourraient pas coloniser le mésophyle pourrait être due au fait qu'ils ne sont pas capables de produire la phytotoxine COR (ou une molécule avec un rôle similaire). Réciproquement, les pathogènes du mésophyle ne pourraient pas coloniser le xylème car ils n'auraient pas de facteurs le permettant. Cependant, la spécificité tissulaire des pathogènes est très difficile à analyser car chez certains pathogènes on peut observer une colonisation des deux tissus. Par exemple, bien que ne synthétisant pas la phytotoxine COR, la bactérie *Xcc* ainsi qu'un surnageant de culture provenant de cette bactérie sont capables d'induire la réouverture des stomates chez *A. thaliana* (Gudesblat *et al.*, 2009b). Le surnageant de culture de *Xcc* est aussi capable de rétablir le défaut de multiplication *in planta* d'une souche *Pto* DC3118 incapable de synthétiser la phytotoxine COR (Gudesblat *et al.*, 2009b). Ces résultats suggèrent que *Xcc* produit une molécule sécrétée (non caractérisée) capable d'induire la réouverture des stomates. De façon intéressante, une étude récente montre que *Pto* DC3000 est capable de coloniser le xylème de *N. benthamiana* (Misas-Villamil *et al.*, 2011). De plus, cette étude montre que *Pto* DC3000 peut utiliser le xylème pour coloniser des tissus éloignés du site d'inoculation (Misas-Villamil *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que *Pto* DC3000 possède les facteurs nécessaires à la colonisation du système vasculaire et donc faire face aux réponses immunitaires qui pourraient s'y dérouler. Reste à savoir si cette colonisation du xylème a réellement lieu dans la nature. Dans leur étude, les auteurs ont réalisé leurs inoculations avec des cure-dents contrairement à l'inoculation traditionnelle par infiltration. Cette infiltration massive de bactéries dans les espaces intercellulaires masquerait la colonisation de sites distants par la bactérie. L'inoculation avec un cure-dent pourrait s'apparenter à l'entrée de la bactérie *via* des blessures au niveau des feuilles et se rapprocherait donc d'un mode d'infection naturel. Le fait de mimer un mode d'entrée naturel de la bactérie suppose que *Pto* DC3000 pourrait coloniser le xylème de ces plantes hôtes dans la nature.

Les travaux actuels privilégient les facteurs présentant une répartition hétérogène comme étant à la base de la spécificité. En effet, les facteurs conservés (ET3 et autres facteurs de virulence) pourraient être nécessaires pour la virulence basale de toutes les

souches et ne contribueraient donc pas à la spécificité d'hôte. A la différence des gènes conservés, les gènes variables peuvent être spécifiques d'une souche (ou pathovar) et pourraient être donc considérés comme des facteurs qui ont été acquis pour l'adaptation à un hôte particulier (Baltrus *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que les gènes ou loci conservés pourraient aussi être responsables de l'adaptation des agents pathogènes sur leurs plantes hôtes. Les gènes conservés peuvent présenter des polymorphismes qui peuvent impacter la fonction ou la reconnaissance du gène. Par exemple, il existe deux ET3 (AvrE et HopM1) qui sont présents chez les 19 souches de *P. syringae* étudiées par Baltrus *et al.* (2011). Ces deux ET3 sont fonctionnellement redondants dans leur fonction de virulence. Dans leur étude les auteurs ont identifié plusieurs allèles de l'ET3 *hopM1*. L'allèle *hopM1* de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* n'est pas capable de rétablir la perte de virulence du double mutant (Δ *avrE*- Δ *hopM1*) de *Pto* DC3000 sur *A. thaliana* alors que l'allèle *hopM1*_{*Pto*DC3000} en est capable (Baltrus *et al.*, 2011). Bien que l'ET3 HopM1 soit présent chez toutes les souches de *P. syringae*, ce gène affiche des divergences fonctionnelles au sein de cette espèce.

En plus des études sur la spécificité d'hôte, d'autres études se concentrent sur les événements qui ont permis les changements d'hôtes. Certaines souches bien qu'étant phylogénétiquement très proches infectent des hôtes différents. Ces changements d'hôtes sont très problématiques car ils entraînent l'émergence de nouvelles espèces pathogènes. Les mécanismes de ces changements d'hôtes ne sont pas encore très clairs. De plus, la majorité des études sur la spécificité d'hôte se fait au niveau de l'espèce. Cependant, on peut observer des différences d'agressivité sur un même hôte au niveau intrapathovar. L'étude au niveau de l'espèce constitue donc le premier palier avant d'étudier la diversité au niveau intrapathovar.

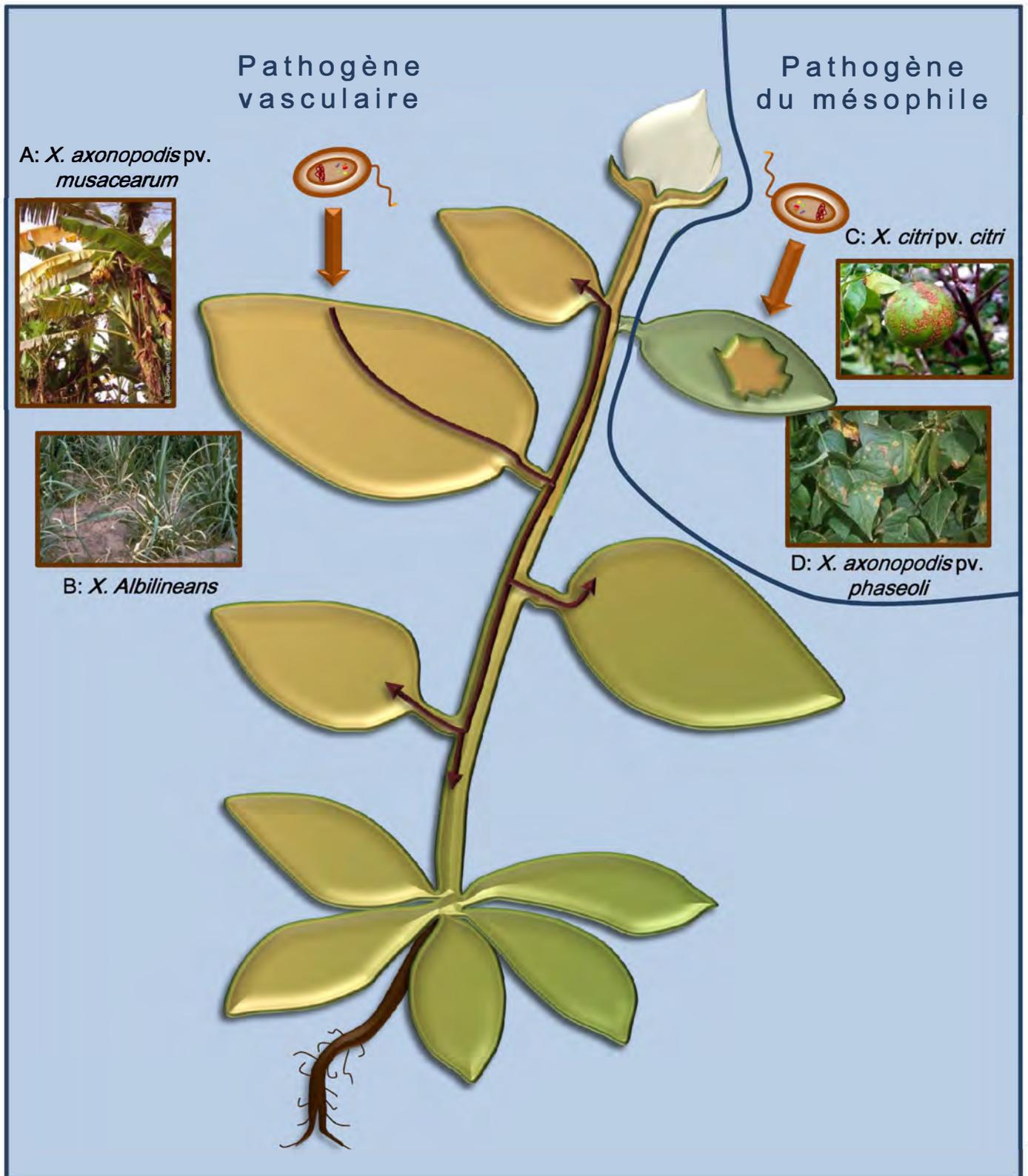


Figure T : Exemples de symptômes produits par les bactéries du genre *Xanthomonas* sur leur plante hôte. A) Symptôme de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre causée par *Xanthomonas albilineans* (<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.cirad.fr/var/cirad/storage/images/site-cirad.fr>). B) Symptôme du flétrissement du bananier causé par *Xanthomonas axonopodis* pv. *musacearum* (<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.musarama.org>). C) Symptôme de chancre du citron causé par *Xanthomonas citri* pv. *citri* (<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.caripestnetwork.org>). D) Tâches bactériennes sur des feuilles de haricot causées par *Xanthomonas axnopodis* pv. *phaseoli* (<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.eppo.int>). Les pathogènes vasculaires (A et D) entrent dans les feuilles via les hydathodes (pores aqueux à la marge des feuilles) ou des blessures. Après leur entrée, ils colonisent le xylème et se propagent à l'intérieur de ce dernier afin de coloniser des tissus distants et causer une infection systémique. Les pathogènes colonisant le mésophile (B et C) pénètrent à l'intérieur de la feuille via les stomates ou des blessures. Ils se multiplient dans les espaces intercellulaires et causent une infection localisée.

III. Présentation de notre modèle d'étude, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et du travail de thèse

III.1 Le genre *Xanthomonas* : un bon modèle pour étudier les interactions plantes-bactéries pathogènes

L'étude des processus ou des facteurs de virulence qui permettent aux bactéries de s'adapter à leurs plantes hôtes nécessite la sélection d'organismes modèles. L'étude de ces organismes modèles autorise par la suite la compréhension de certains processus clés de la virulence des bactéries phytopathogènes. Le genre *Xanthomonas* est composé de bactéries avec des particularités intéressantes faisant de ce genre un bon modèle pour étudier les mécanismes de pathogénie et l'adaptation des bactéries phytopathogènes à leurs hôtes.

III.1.1 Caractéristiques générales des *Xanthomonas*

Les bactéries du genre *Xanthomonas* (du grecque *xanthos* : jaune et *monas* : entité) sont des bactéries à caractère Gram négatif appartenant à la subdivision gamma des Protéobactéries. Les cellules ont une forme de bâtonnet avec un unique flagelle polaire. Les bactéries mesurent entre 0,7 et 2 µm de longueur et ont une largeur qui varie entre 0,4 et 0,7 µm de largeur. Elles sont aérobies strictes et ont une croissance optimale entre 25-30°C (Meyer and Bogdanove, 2009). Les cellules sont généralement jaunâtres en raison de la forte production d'un pigment jaune appelé xanthomonadine (Rajagopal *et al.*, 1997). En plus de leur couleur jaune, les cellules ont aussi un aspect très muqueux sur un milieu riche en sucre dû à la forte production d'EPS (appelé gomme de xanthane ; Becker *et al.*, 1998). La xanthomonadine et la gomme de xanthane ont un rôle dans la vie épiphyte car elles sont impliquées dans la protection contre les UV, le gel, la dessiccation mais elles ont également un rôle dans le pouvoir pathogène (Chou *et al.*, 1997; Katzen *et al.*, 1998; Poplawsky and Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 2000). En plus de son rôle dans la physiologie des *Xanthomonas*, la gomme de xanthane est également très utilisée dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Becker *et al.*, 1998). L'uniformité au niveau morphologique et physiologique a fortement compliqué la classification au sein des *Xanthomonas*. Les nouvelles techniques de typage [AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), rep-PCR...] ont été utilisées afin de définir une classification claire et

Tableau B : Liste et caractéristiques des principaux génomes séquencés du genre *Xanthomonas*.

| Pathovar | Souche | Taille (Mbp) | GC% | Nombre de CDS | Nombre de CDS avec fonction assignée | Nombre de CDS putatifs | Nombre d'opéron ARNr | Nombre d'ARNt | Plasmide ^a | Référence |
|-------------------------|------------|--------------|------|---------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|
| <i>Xcv</i> | 85-10 | 5,2 | 64,7 | 4487 | 2965 | 864 | 2 | 54 | + | Thieme <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Xac</i> | 306 | 5,3 | 64,7 | 4427 | 2779 | 262 | 2 | 54 | + | Da silva <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>citrumelo</i> | F1 | 4,9 | 64,9 | 4202 | 3087 | ? | 5 | 54 | - | Jalan <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>XauB^b</i> | 11122 | 4,9 | 64,9 | 3804 | 2,694 | 117 | 2 | 51 | + | Moreira <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>XauC^b</i> | 10535 | 5 | 64,8 | 3921 | 2728 | 184 | 2 | 51 | + | Moreira <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Xcc</i> | ATCC33913 | 5,1 | 65 | 4181 | 2708 | 198 | 2 | 53 | - | Da silva <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Xcc</i> | 8004 | 5,1 | 64,9 | 4273 | 2671 | 79 | 2 | 53 | - | Qian <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Xcc</i> | B100 | 5 | 65 | 4471 | 2878 | ? | 2 | 54 | - | Vorholter <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Xcr</i> | 756C | 4,9 | 65,2 | 4535 | 3139 | ? | 2 | 57 | - | Bogdanove <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Xoo</i> | KACC10331 | 4,9 | 63,7 | 4637 | 3340 | 146 | 2 | 54 | - | Lee <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Xoo</i> | MAFF311018 | 4,9 | 63,7 | 4372 | 2799 | 190 | 2 | 53 | - | Ochiai <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Xoo</i> | PXO99A | 5,3 | 63,6 | 5083 | ? | ? | ? | ? | - | Salzberg <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Xoc</i> | BLS256 | 4,8 | 64 | 4480 | 3232 | ? | 2 | 54 | - | Bogdanove <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Xam^b</i> | LMG 941 | 5,1 | 64,8 | 4521 | ? | ? | 3 | 51 | - | Midha <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Xap^b</i> | LMG859 | 4,9 | 64,9 | 4385 | ? | ? | 3 | 50 | - | Sharma <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>X. alibilineans</i> | GPE PC73 | 3,8 | 63 | 3115 | ? | ? | 2 | 51 | - | Pieretti <i>et al.</i> , 2009 |

^a, + : présence ; - : absence.

^b, le séquençage des génomes de ces souches n'est pas complet.

X : *Xanthomonas*. *Xcv* : *X. campestris* pv. *vesicatoria* ; *Xac* : *X. citri* pv. *citri* ; *citrumelo* : *X. axonopodis* pv. *citrumelo* ; *Xcc* : *X. campestris* pv. *campestris* ; *Xcr* : *X. campestris* pv. *raphani* ; *Xoo* : *X. oryzae* pv. *oryzae* ; *Xoc* : *X. oryzae* pv. *oryzicola* ; *Xam* : *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* ; *Xcm* : *X. campestris* pv. *musacearum* ; *XauB* : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain B ; *XauA* : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain A.

précise. La classification actuelle propose 20 espèces et 140 « pathovar » répartis au sein de ces espèces mais cette classification est en constante évolution et remaniement (Rademaker *et al.*, 2005; Vauterin *et al.*, 2000).

Collectivement les bactéries du genre *Xanthomonas* causent des maladies sur approximativement 400 espèces plantes incluant des dicotylédones et monocotylédones. Elles provoquent une variété de symptômes (nécroses, chancres...) et infectent différentes parties des plantes (feuilles, fruits, graines, racines et tiges ; **Figure A et T**). Dans les étapes précoces, les bactéries persistent à la surface des feuilles avant de pénétrer à l'intérieur de ces dernières. L'entrée dans les feuilles se fait *via* des ouvertures naturelles telles que les stomates, hydathodes (pore aqueux en marge des feuilles) ou des blessures. A l'intérieur de la plante, les bactéries se multiplient localement dans les espaces intercellulaires ou colonisent le xylème et prolifèrent à travers ce dernier pour causer une infection systémique (**Figure T**).

Bien qu'étant capable d'infecter un très grand nombre de plantes et de tissus, chaque espèce ou pathovar possède un spectre d'hôte et tissulaire restreint. De façon intéressante, des souches au sein du même pathovar bien qu'ayant le même hôte peuvent avoir une spécificité tissulaire différente et des symptômes distincts. Un exemple est illustré par les bactéries du pathovar *oryzae* : *Xoo* et *Xoc*. La bactérie *Xoo* est un pathogène vasculaire, responsable de la bactériose vasculaire du riz tandis que *Xoc* colonise le mésophyle et est l'agent causal des stries bactériennes du riz (Nino-Liu *et al.*, 2006). Le genre *Xanthomonas* représente donc un bon modèle d'étude pour étudier la spécificité d'hôte et tissulaire car au sein du même genre on retrouve divers modes d'adaptation. De nombreux projets de séquençage des génomes de *Xanthomonas* ont vu le jour (www.xanthomonas.org et **Tableau B**). Les séquences disponibles (et celles à venir), permettront de réaliser des études de génomique comparative afin d'identifier des facteurs de virulence communs entre les bactéries du genre *Xanthomonas* mais également ceux uniques à chaque espèce ou pathovar.

III.1.2 Génomique comparative des Xanthomonas

De façon générale, les bactéries du genre *Xanthomonas* ont un génome riche en GC (GC% ~65%) d'une taille d'environ 5 Mbp. Cependant, des différences telles que l'absence ou la présence de plasmides peuvent être observées. Au niveau des séquences obtenues, le génome des bactéries code des facteurs de virulence classiques : adhésines, enzymes de dégradation de la paroi... (**Figure C**). Certains facteurs de virulence ont une répartition hétérogène au sein des *Xanthomonas* ou sont spécifiques d'une espèce tels que la toxine

Tableau C : Distribution de quelques PAMPs ainsi que de certaines enzymes secrétées par le système de sécrétion de type 2 (SST2) au sein du genre *Xanthomonas*.

| Pathovar | Xcv | Xv | Xg | Xp | Xac | <i>citrumelo</i> | XauB | XauC | Xcc | Xcc | Xcc | Xcr | Xoo | Xoo | Xoo | Xoc | Xam | Xcm | Xvv | Xap |
|---|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|-----------|-----------|--------------------------|--------|--------|-----------|-----------|------------|--------|-----------|-----------|---------------|----------|--------|
| Souche | 85-10 | 1111 | ATCC19865 | 91-118 | 306 | F1 | 11122 | 10535 | ATCC33913 | 8004 | B100 | 756C | KACC10331 | MAFF311018 | PXO99A | BLS256 | LMG 941 | NCPPB4381 | NCPPB702 | LMG859 |
| Tissu ^a | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Mésophile | Xylème | Xylème | Xylème | Mésophile | Xylème | Xylème | Xylème | Mésophile | Mésophile | Xylème | Xylème | ? |
| Hôte ^b | Tomate, poivron | | Tomate | | Citron | | | | Chou, <i>A. thaliana</i> | | | Riz | | | | Mangue | Banane | Canne à sucre | Grenade | |
| PAMPs ^c | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| axY ²² (Ax21) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| efl18 (EF-Tu) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| flg22 (FlgC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dégradation de la paroi (SST2) ^d | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Xylanase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xyn10A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xyn10B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xyn10C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aguA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xyn51A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xyn5A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glucanase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cel8A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cel9A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pectate lyase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel1A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel1B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel1C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel4A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel9A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pel10A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

La présence ou l'absence d'un orthologue de chaque gène sélectionné a été déterminée par Blast sur le site du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

^a, tissu infecté par les souches citées.

^b, plantes infectées par les souches citées.

^c, peptides démontrés comme étant actifs dans l'activation des PRR Xa21 (axY22), FLS2 (flg22) et EFR (efl18). Cases vertes foncées : présence d'un peptide potentiellement actif ; cases vertes pales : présence d'un peptide ne possédant pas un des acides aminés importants pour la reconnaissance ; cases blanches : absence d'un peptide actif (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009).

^d, cases vertes foncées : présence du gène correspondant ; cases vertes pales : présence d'une séquence divergente du gène correspondant ; cases blanches : absence du gène correspondant. Dans ce dernier cas la séquence est peut être absente ou trop divergente pour être considérée comme étant présente.

X : *Xanthomonas*. Xcv : *X. campestris* pv. *vesicatoria* ; Xv : *X. vesicatoria* ; Xp : *X. perforans* ; Xg : *X. gardneri* ; Xac : *X. citri* pv. *citri* ; *citrumelo* : *X. axonopodis* pv. *citrumelo* ; Xcc : *X. campestris* pv. *campestris* ; Xcr : *X. campestris* pv. *raphani* ; Xoo : *X. oryzae* pv. *oryzae* ; Xoc : *X. oryzae* pv. *oryzicola* ; Xam : *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* ; Xcm : *X. campestris* pv. *musacearum* ; Xvv : *X. axonopodis* pv. *vasculorum* ; XauB : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain B ; XauA : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain A ; PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern.

albicidine. Cette dernière est une toxine sécrétée exclusivement par *X. albilineans* et qui participe à la formation de chloroses sur la canne à sucre (Rott *et al.*, 1996). Les enzymes sécrétées par le SST2 ont une distribution hétérogène suggérant que les différentes bactéries du genre *Xanthomonas* ne sont pas capables de dégrader la paroi des plantes de la même façon (**Tableau C**). Cette distribution hétérogène suggère également que la présence d'une ou plusieurs enzymes pourrait être impliquée dans l'adaptation d'une espèce ou d'un pathovar à sa plante hôte. De façon intéressante, de nombreuses espèces (**Tableau C**) ont évolué afin de produire des PAMPs qui ne sont plus (ou moins efficacement) reconnus par les PRR FLS2 et EFR. Ces bactéries n'activeraient donc plus (ou peu) de défenses par les PRR concernés (**Tableau C**).

On retrouve également un système Hrp chez les souches séquencées (excepté *X. albilineans*; Pieretti *et al.*, 2009). Le SST3 est nécessaire au pouvoir pathogène des bactéries du genre *Xanthomonas* (Büttner and Bonas, 2009; Ryan *et al.*, 2011). Le séquençage des génomes a permis d'identifier de nouveaux ET3 dont certains spécifiques du genre *Xanthomonas* (www.xanthomonas.org et **Tableau D**). Actuellement, on dénombre plus de 65 ET3 [TALs non inclus; (www.xanthomonas.org et **Tableau D**)] dénommés *Xanthomonas* outer protein (Noel *et al.*, 2001) ou Avr (avirulent). Le nombre d'ET3 chez le genre *Xanthomonas* est probablement sous-estimé pour plusieurs raisons; i) tous les gènes des ET3 ne possèdent pas de PIP-box (Plant-Inducible Promoter-box, séquence promotrice reconnue par les régulateurs du SST3) dans leur promoteur et ne sont pas tous co-régulés avec le SST3 (**Tableau**; Gurlebeck *et al.*, 2006); ii) une séquence signal de sécrétion et de translocation n'a pas encore été clairement identifiée chez le genre *Xanthomonas* comme chez les autres bactéries phytopathogènes possédant un SST3 (Gurlebeck *et al.*, 2006). Toutes ces raisons compliquent fortement l'identification des ET3 chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. On retrouve deux types d'ET3 (**Tableau E**):

- Des ET3 conservés (au nombre de 15) car ils sont présents chez plus de 80% des souches séquencées (**Tableau E**).
- Des ET3 variables (au nombre de 50) car ils ne sont pas présents chez toutes les souches séquencées (**Tableau E**).

Les ET3 conservés pourraient être nécessaires à la virulence basale de ces souches. Parmi les ET3 non conservés, certains sont spécifiques d'une espèce, tel que l'ET3 *xopU* chez l'espèce *X. oryzae* et *xopAC* chez *X. campestris* (**Tableau E**). D'autres sont spécifiques d'un pathovar tel que l'ET3 *xopAH* chez les souches de *Xcc* (**Tableau E**). La présence de ces ET3 pourrait être corrélée avec l'adaptation de ces souches à leurs plantes hôtes.

Tableau D : Effecteurs de type 3 connus chez les *Xanthomonas* (voire légende page suivante).

| Effecteur | Autre nom | Homologue ^a | Activité enzymatique | PIP-box ^b | HrpG/X ^c | Sécrétion ^d | Trancllocation ^e | Phénotype ^f | Référence |
|--------------------|-----------|---|---|----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|--|--|
| AvrBs1* | | AvrA | Putative tyrosine phosphatase | - | - | + | + | Avirulence (Pepper) | Escobar <i>et al.</i> , 2001 |
| AvrBs2* | | | Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase | + | - | + | + | Avirulence (Pepper) | Casper-Lindley <i>et al.</i> , 2002 ; Mudgett <i>et al.</i> , 2000 |
| AvrBs3 | | | AvrBs3/PthA-type transcription activator | - | - | + | + | Avirulence (Pepper) | Knoop <i>et al.</i> , 1991 ; Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1966 ; Szurek <i>et al.</i> , 2002 |
| AvrXccA1* | AvrXca | | | - | ? | ? | ? | Avirulence (A. th) | Parker <i>et al.</i> , 1993 |
| AvrXccA2* | | | | - | ? | ? | ? | ? | ? |
| HpaA ^{9*} | | | | + | ? | + | + | Virulence (Pepper) | Huguet <i>et al.</i> , 1998 ; Lorenz <i>et al.</i> , 2008 |
| HprW ^{9*} | | | Harpin, pectate lyase | - | ? | + | ? | Hypersensitive response (Tabac) | Charkowski <i>et al.</i> , 1998 |
| XopAA | Ecf | HopAE1 (HolPsyAE) | Early chlorosis factor; Proteasome/cyclosome repeat | (+) | - | + | + | Virulence (Tomato) | Morales <i>et al.</i> , 2005 |
| XopAB | | (XopN) | | - | + | + | + | ? | Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopAC* | AvrAC | | Fido family | (+) | + | + | + | Avirulence (A. th) | Xu <i>et al.</i> , 2008 |
| XopAD | | RSc3401 | SKWP repeat protein | ? | ? | ? | ? | ? | Song and Yand, 2010 |
| XopAE | HpaF/HpaG | PopC | LRR protein | + | + | ? | ? | ? | Noel <i>et al.</i> , 2003 |
| XopAF | AvrXv3 | HopAF1 (HopPtoJ) | | (+) | + | ? | ? | Avirulence (Tomato) | Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a ; Gibby <i>et al.</i> , 2004 |
| XopAG* | AvrGf1 | HopG1 (HopPtoG), HolPtoW | | ? | ? | ? | ? | ? | Rybak <i>et al.</i> , 2009 |
| XopAH* | AvrXccC | AvrB/AvrC (AvrPphC) | Fido family | + | + | + | + | Avirulence (Mustard) and virulence (cabbage) | Castaneda <i>et al.</i> , 2005 ; Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| XopAl | | HopO1 (HopPtoO, HopPtoS), HopAl1 (HolPtoAl) | Putative ADP-ribosyltransferase | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| XopAJ | AvrRxo1 | | | (+) | ? | ? | ? | Avirulence (Maïze) | Zhao <i>et al.</i> , 2004 |
| XopAK | | HopK1 (HopPtoK, HolPtoAB) | | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| XopAL1* | | Eop3 | | + | + | + | + | Virulence (Chinese Radish) | Jiang <i>et al.</i> , 2009 |
| XopAL2* | | Eop3 | | + | ? | ? | ? | ? | ? |
| XopAM* | | HopR1 | | + | + | + | + | Virulence (Chinese Radish) | Jiang <i>et al.</i> , 2009 |
| XopAN* | | | | - | + | + | + | ? | N. Messad and L. Noel, unpublished data |
| XopAO | | | | ? | ? | ? | + | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |
| XopAP | | | | ? | ? | ? | ? | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |
| XopAQ | | | | ? | ? | ? | ? | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |
| XopAR | | | | ? | ? | ? | ? | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |
| XopAS | | | | ? | ? | ? | ? | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |
| XopA* | Hpa1/HpaG | | Harpin | + | + | + | ? | Virulence (Pepper) | Noel <i>et al.</i> , 2002 |
| XopB | | HopD1 (HopPtoD1, AvrPphD1) | | + | + | + | + | Virulence (Pepper) | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopC1 | | | Haloacid dehalogenase-like hydrolase | ? | + | + | + | ? | Noel <i>et al.</i> , 2003 |
| XopC2 | | RSp1239 | Haloacid dehalogenase-like hydrolase | - | ? | ? | ? | ? | Song and Yand, 2010 |
| XopD1* | | | C48-family SUMO cysteine protease | - | (+) | + | + | virulence (Tomato, A. th) | Noel <i>et al.</i> , 2002 ; Canonne <i>et al.</i> , 2010 ; Canonne <i>et al.</i> , 2011 |

Les facteurs de virulence qui sont partagés entre plusieurs espèces renseignent sur les stratégies qui sont mises au point de façon générale par les bactéries du genre *Xanthomonas* pour infecter leurs plantes hôtes. Toutefois, les facteurs de virulence conservés ne renseignent pas sur les stratégies qui sont mises en place de façon spécifique par chaque espèce ou pathovar pour infecter leurs plantes hôtes. Le séquençage des différents génomes du genre *Xanthomonas* montre que certains ET3 et loci génomiques sont spécifiques d'une espèce, d'un pathovar voire d'une souche. Un des enjeux actuels est de savoir de quelle façon ces déterminants spécifiques vont influencer la spécificité d'hôte et/ou tissulaire. Notre équipe a décidé d'étudier la bactérie *Xcc* afin de savoir quelles sont les stratégies infectieuses qui sont mises au point par cette bactérie pour coloniser ses hôtes. L'objectif de ces travaux de recherche vise à identifier et caractériser les déterminants qui sont nécessaires au pouvoir pathogène et à l'adaptation de cette bactérie sur ses plantes hôtes.

III.2 Présentation de notre modèle d'étude : *Xanthomonas campestris pv. campestris*

III.2.1 La nervation noire des Brassicacées : cycle de vie de *Xcc*

La nervation noire des Brassicacées est une maladie causée par le pathogène vasculaire *Xcc* (**Figure UA et B**). Cette maladie, de distribution mondiale, est considérée comme une des plus destructrices des Brassicacées. La bactérie *Xcc* est capable d'infecter à peu près toutes les plantes de la famille des Brassicacées notamment des plantes d'intérêt agronomique (tel que le chou, le navet, la moutarde...) mais elle est également capable d'infecter la plante modèle *A. thaliana* (Schaad and Dianese, 1981 ; Simpson and Johnson, 1990). *Xcc* est une bactérie épiphyte et tellurique (**Figure V**), elle persiste à la surface des feuilles en attendant les conditions optimales pour pénétrer à l'intérieur de ces dernières. Afin de pénétrer à l'intérieur des feuilles de ses plantes hôtes, *Xcc* utilise des ouvertures naturelles. Les portes d'entrée par excellence de la bactérie sont les hydathodes à l'aboutissement des nervures en marge des feuilles qui permettent la guttation (**Figure UC** ; Hugouvieux *et al.*, 1998). La plante transpire sous des conditions d'humidité très élevée et au moment de la rosée matinale, de multiples gouttelettes suintent en marge des feuilles. Les bactéries incorporées dans ces gouttes pénètrent dans le xylème lorsque la transpiration redémarre. *Xcc* utilise d'autres portes d'entrée telles que les stomates (Gudesblat *et al.*, 2009b) ou les blessures causées par des vents violents, la grêle, des insectes... L'infection *via* des blessures racinaires est aussi possible lorsque le sol est saturé en eau (Vicente and Holub, 2012).

Suite du Tableau D : Effecteurs de type 3 connus chez les *Xanthomonas*.

| | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|---------------------------------|---|---|-----|---|---|---|--|
| XopD2* | | | C48-family SUMO cysteine protease | - | (+) | + | + | ? | Noel <i>et al.</i> , 2002 ; Canonne <i>et al.</i> , 2010 ; Canonne <i>et al.</i> , 2011 |
| XopE1 | AvrXacE1 | HopX (AvrPphE) | Putative transglutaminase | + | + | + | + | Cell death activity (N. Bent) | Thieme <i>et al.</i> , 2007 |
| XopE2* | AvrXacE3, AvrXccE1 | HopX (AvrPphE) | Putative transglutaminase | + | + | + | + | Avirulence (Chinese cabbage) | Thieme <i>et al.</i> , 2007 ; He <i>et al.</i> , 2007 |
| XopE3 | AvrXacE2 | HopX (AvrPphE) | Putative transglutaminase | ? | ? | ? | ? | ? | Nimchuk <i>et al.</i> , 2007 |
| XopE4 | | HopX (AvrPphE) | Putative transglutaminase | ? | ? | ? | ? | ? | Moreira <i>et al.</i> , 2010 |
| XopF1* | Hpa4 | | | ? | + | + | + | ? | Roden <i>et al.</i> , 2004 ; Buttner <i>et</i> <i>al.</i> , 2007 |
| XopF2 | | | | ? | ? | ? | + | ? | Roden <i>et al.</i> , 2004 |
| XopG* | | HopH (HopPtoH), HopAP | M27-family peptidase | - | - | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopH* | AvrBs1.1 | HopAO1 (HopPtoD2) | Putative tyrosine phosphatase | ? | ? | ? | ? | Avirulence (Pepper) | Thieme <i>et al.</i> , 2005 |
| XopI | | | F-box protein | + | + | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopJ1 | | | C55-family cysteine protease | ? | + | + | + | ? | Noel <i>et al.</i> , 2003 |
| XopJ2 | AvrBsT | HopZ2 | C55-family cysteine protease | ? | - | + | + | Avirulence (Pepper) | Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999 ; Escolar <i>et al.</i> , 2001 |
| XopJ3 | AvrRxv | | C55-family cysteine protease | + | - | + | + | Avirulence (Haricot) | Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999 |
| XopJ4 | AvrXv4 | PopP1 | C55-family cysteine protease | + | ? | + | + | Avirulence (tomato) | Roden <i>et al.</i> , 2004 |
| XopJ5* | AvrXccB | | C55-family cysteine protease | + | + | + | + | ? | Jiang <i>et al.</i> , 2009 |
| XopK* | | | | - | + | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopL* | | | LRR protein | + | + | + | + | Virulence (Chinese Radish) | Jiang <i>et al.</i> , 2009 |
| XopM | | | | - | + | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopN* | | HopAU1 | ARM/HEAT repeat | + | + | + | + | Virulence (tomato, Chinese Radish) | Roden <i>et al.</i> , 2004 ; Jiang <i>et</i> <i>al.</i> , 2008 |
| XopO | | HopK1 (HopPtoK, HolPtoAB) | | ? | ? | ? | + | ? | Roden <i>et al.</i> , 2004 |
| XopP* | | Hlk | | + | + | + | + | Virulence (Chinese Radish) | Jiang <i>et al.</i> , 2009 ; Roden <i>et</i> <i>al.</i> , 2004 |
| XopQ* | | HopQ1 (HolPtoQ), RipB | Putative inosine- uridine nucleoside N- ribohydrolase | + | + | + | + | Virulence (Chinese Radish) | Roden <i>et al.</i> , 2004 ; Jiang <i>et</i> <i>al.</i> , 2009 |
| XopR* | | | | + | + | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopS | | | | + | + | + | + | Virulence (Pepper) | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopT | | | | - | + | + | + | ? | Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopU | | | | + | + | + | + | ? | Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopV | | | | + | + | + | + | ? | Schuzle <i>et al.</i> , 2012 |
| XopW | | | | - | + | + | + | ? | Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopX1* | | HopAE1 (HolPsyAE) | | + | + | + | + | virulence (Pepper, tomato) | Metz <i>et al.</i> , 2005 ; Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopX2* | | | | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| XopY | | | | - | + | + | + | ? | Furutani <i>et al.</i> , 2009 |
| XopZ1* | | HopAS1 | | + | + | ? | ? | Virulence (Rice) | Song and Yand, 2010 |
| XopZ2 | | | | ? | ? | ? | + | ? | Potnis <i>et al.</i> , 2011 |

^a, effecteurs homologues chez d'autres genres bactériens.

^b, séquence promotrice (TTTCG-N16-TTTCG) reconnue par le régulateur HrpX du SST3. PIP-box : Plant-Inducible Promoter-box ; + : présence d'une PIP-box dans le promoteur ; (+) : présence d'une PIP-box imparfaite dans le promoteur ; - : absence d'une PIP-box dans le promoteur.

^c, + : la régulation du gène est dépendante des régulateurs du SST3, HrpG et HrpX ; (+) : la régulation du gène est en partie dépendante des régulateurs du SST3 ; - : la régulation du gène est indépendante des régulateurs du SST3, HrpG et HrpX.

^d, + : la sécrétion *in vitro* par le SST3 a été démontrée ; - : la sécrétion *in vitro* par le SST3 n'a pas été démontrée.

^e, + : la translocation *in planta* par le SST3 a été démontrée ; la translocation *in planta* par le SST3 n'a pas été démontrée.

^f, phénotype sur plante qui a initialement permis la découverte de l'effecteur. A. th : *A. thaliana* ; N. bent : *Nicotiana benthamiana*.

^g, ces gènes ne sont probablement pas des gènes codant des effecteurs.

^{*}, ET3 identifiés chez les 3 génomes séquencés de *Xcc*.

Lorsque les conditions climatiques sont propices à l'établissement de la maladie (25-28°C et une humidité élevée), *Xcc* se multiplie et prolifère à l'intérieur du xylème (**Figure WA et B**). Durant leur multiplication, les bactéries produisent en forte quantité un EPS (le xanthane). La production d'EPS, en combinaison avec les amas des bactéries, obstrueraient partiellement les vaisseaux de xylème avec comme conséquence de restreindre le flux d'eau et d'éléments nutritifs ce qui entraînerait l'apparition des symptômes de la maladie. Les symptômes de la maladie sont représentés par le développement d'une chlorose et l'apparition de lésions de couleur jaunâtre en forme de V très caractéristique à l'extrémité des feuilles (**Figure WC**). Le nom de la pourriture noire provient du noircissement des nervures qui résulte de leur macération par les bactéries. La maladie se poursuit jusqu'à une nécrose complète des feuilles qui finissent par pourrir et tomber sur le sol aboutissant à la libération des bactéries dans le sol (**Figure V**).

Xcc est capable de survivre pendant plusieurs années en saprophyte sur des débris végétaux et dans le sol (**Figure V**), et se transmet à la graine lors de la production des semences. Les jeunes plants cultivés à partir de ces graines contaminées sont souvent infectés de façon systémique (Shaad *et al.*, 1980). Les semences infectées et l'eau de pluie sont la source majeure de dissémination de la bactérie.

De nombreuses mesures ont été prises afin de limiter la progression de la maladie dans les champs de récoltes ou pour la décontamination des graines. Par exemple, le contrôle des mauvaises herbes (réservoir pour la bactérie), rotation des cultures, contrôle sanitaire des graines, traitement des graines (chaleur, antibiotiques, peroxyde d'hydrogène... ; Vicente and Holub, 2012). Toutefois, ces mesures ne sont pas totalement efficaces car elles sont soit limitées dans le temps ou ont des effets sur le rendement des cultures et sur l'environnement. Afin de lutter de façon efficace et durable contre cette bactérie, il est nécessaire de bien maîtriser tous les aspects du cycle de vie de la bactérie notamment ceux impliqués dans l'interaction avec l'hôte.

III.2.2 Facteurs impliqués dans l'interaction plantes hôtes-Xcc

Afin d'identifier des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *Xcc* sur ses plantes hôtes, de nombreuses équipes ont entrepris de séquencer des souches de *Xcc*. Actuellement, il existe 3 souches dont les génomes sont séquencés [8004, ATCC33913 et B100 (**Tableau B** ; da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008)]. Les génomes des souches de *Xcc* codent des facteurs de virulence qui sont présents chez de nombreuses bactéries phytopathogènes à caractère Gram négatif. Par exemple, des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des adhésines, des systèmes d'acquisition de nutriments (TBDT), le xanthane, des systèmes de sécrétion (SST1, SST2, SST3, SST4...).

Tableau E : Distribution des gènes codant des effecteurs (effecteurs de type TAL non inclus) connus de *Xanthomonas* chez les souches séquencées.

| Effecteurs variables (n =50) ^f | Effecteurs conservés (n=15 ; ≥80%) ^c | | | | | Hôte ^b | Tissu ^a | Souche | Pathovar | | | | | | | | | | | |
|---|---|------|------|-------|-------|-------------------|--------------------|------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | xopAN | xopI | xopV | xopAB | xopAE | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopR | | | | | | | | 85-10 | Xcv | | | | | | | | | | | |
| xopM | | | | | | | M | 1111 | Xv | | | | | | | | | | | |
| avrBs2 | | | | | | | | ATCC19865 | Xg | | | | | | | | | | | |
| xopK | | | | | | | | ATCC91-118 | Xp | | | | | | | | | | | |
| xopL | | | | | | | | 306 | Xac | | | | | | | | | | | |
| xopX1 | | | | | | | | F1 | citrumelo | | | | | | | | | | | |
| hpaA | | | | | | | | 11122 | XauB | | | | | | | | | | | |
| xopN | | | | | | | | 10535 | XauC | | | | | | | | | | | |
| xopQ | | | | | | | | ATCC33913 | Xcc | | | | | | | | | | | |
| xopAD | | | | | | | X | 8004 | Xcc | | | | | | | | | | | |
| xopF2 | | | | | | | | B100 | Xcc | | | | | | | | | | | |
| xopF1 | | | | | | | M | 756C | Xcr | | | | | | | | | | | |
| xopP | | | | | | | | KACC10331 | Xoo | | | | | | | | | | | |
| xopZ1 | | | | | | | | MAFF311018 | Xoo | | | | | | | | | | | |
| xopAN | | | | | | | | PX099A | Xoo | | | | | | | | | | | |
| xopI | | | | | | | | BLS256 | Xoc | | | | | | | | | | | |
| xopV | | | | | | | | LMG 941 | Xam | | | | | | | | | | | |
| xopAB | | | | | | | | NCPBP4381 | Xcm | | | | | | | | | | | |
| xopAE | | | | | | | | NCPBP702 | Xw | | | | | | | | | | | |
| xopAK | | | | | | | | LMG859 | Xap | | | | | | | | | | | |
| xopE2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| hprW | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopE1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| avrBs3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopX2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopC2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| avrXccA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopJ5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAF | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopD1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| avrXccA2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopW | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| avrBs1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAL1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAL2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopY | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopC1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopE3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopU | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAJ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopE4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopZ2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopD2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopJ3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopJ1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopJ2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopJ4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAQ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| xopAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total | 35 | 23 | 25 | 30 | 27 | 29 | 31 | 28 | 30 | 30 | 29 | 14 | 24 | 28 | 25 | 30 | 28 | 30 | 26 | 29 |

La présence ou l'absence d'un orthologue de chaque ET3 sélectionné a été déterminée par Blast sur le site du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, www.xanthomonas.org). Cases vertes foncées : présence du gène correspondant ; cases vertes pâles : présence d'une séquence divergente ou partielle ; cases blanches : absence du gène correspondant. Dans ce dernier cas la séquence est peut être absente ou trop divergente pour être considérée comme étant présente.

^a, tissu infecté par les souches citées. V : pathogène vasculaire ; M : pathogène colonisant le mésophile.

^b, plantes infectées par les souches citées.

^c, les effecteurs présents chez au moins de 80% des souches sont considérés comme étant non conservés.

^d, les effecteurs présents chez au moins de 80% des souches sont considérés comme étant non conservés.

X : *Xanthomonas*. Xcv : *X. campestris* pv. *vesicatoria* ; Xv : *X. vesicatoria* ; Xp : *X. perforans* ; Xg : *X. gardneri* ; Xac : *X. citri* pv. *citri* ; citrumelo : *X. axonopodis* pv. *citrumelo* ; Xcc : *X. campestris* pv. *citrumelo* ; Xcr : *X. campestris* pv. *raphani* ; Xoo : *X. oryzae* pv. *oryzicola* ; Xam : *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* ; Xcm : *X. campestris* pv. *musacearum* ; Xwv : *X. axonopodis* pv. *vasculorum* ; XauB : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain B ; XauA : *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* strain A ; PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern.

La **Figure X** montre un schéma détaillé des facteurs de virulence qui sont impliqués dans l'interaction de la souche 8004 de *Xcc* avec la cellule hôte (Qian *et al.*, 2005). Le SST3 joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de *Xcc* et fait l'objet de nombreuses attentions qui visent à identifier tous les ET3 (effectome) ainsi que leur rôle au cours de l'interaction avec les plantes.

III.2.3 Composition et fonction de l'effectome de *Xcc*

Le SST3 de *Xcc* possède une organisation et une régulation similaire à celles des autres bactéries possédant un SST3 du groupe II (Arlat *et al.*, 1991; Gurlebeck *et al.*, 2006). Actuellement, 28 ET3 sont prédits chez *Xcc* dont 12 sont conservés entre toutes les souches séquencées du genre *Xanthomonas* (www.xanthomonas.org; White *et al.*, 2009). De façon intéressante, excepté trois ET3 (*xopD*, *xopE2*, *xopJ5*; **Tableau E**), les trois souches séquencées possèdent le même effectome, suggérant des stratégies de virulence similaires. La plupart des ET3 recensés chez *Xcc* ont été identifiés par homologie de séquence avec des ET3 de *Xcv* ou d'autres bactéries possédant un SST3 (Gurlebeck *et al.*, 2006; Kay and Bonas, 2009; White *et al.*, 2009). De ce fait, l'analyse fonctionnelle de bon nombre d'ET3 de *Xcc* provient d'études réalisées chez d'autres organismes. Les génomes des trois souches séquencées ne codent pas d'ET3 de type TAL, suggérant que *Xcc* ne serait pas capable de moduler directement le transcriptome de ces cellules hôtes par les TALs. La sécrétion par le SST3 et la translocation *in planta* ont été démontrées pour seulement une douzaine d'ET3 de *Xcc*. Pour les autres ET3, les données de sécrétion et de translocation disponibles ont été obtenues chez d'autres espèces notamment chez *Xcv* (White *et al.*, 2009). La fonction et le mode d'action au cours de l'interaction avec la plante hôte restent à identifier pour la majeure partie des ET3 de *Xcc* (**Tableau D**).

Des données sur l'impact des ET3 de *Xcc* dans la virulence ou dans l'avirulence commencent à éclaircir le rôle de ces ET3 au cours de l'infection de ses différentes plantes hôtes (**Tableau D**). Par exemple, l'ET3 *xopAC* contribue au pouvoir pathogène de la souche 8004 de *Xcc* (*Xcc* 8004) sur certains cultivars de chou en inhibant par uridylylation (transfert d'un groupement UMP sur un résidu thréonine) deux kinases végétales impliquées dans l'immunité : RIPK et BIK1 (Feng *et al.*, 2012). L'effecteur *xopD* contribue au pouvoir pathogène de la souche B100 de *Xcc* (*Xcc* B100) sur la tomate et *A. thaliana* (Canonne *et al.*, 2010; Canonne *et al.*, 2011). *xopD* contribue au pouvoir pathogène de *Xcc* B100 en inhibant le facteur de transcription ATMYB30 qui permet l'induction de gènes associés à l'immunité chez *A. thaliana* (Canonne *et al.*, 2011). Une contribution dans le pouvoir pathogène de *Xcc* 8004 sur sa plante hôte, le radis chinois, a été démontrée pour les ET3 *xopN*, *xopP*, *xopAM*, *xopAL1*, *xopQ* et *xopL* (Jiang *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Le dernier

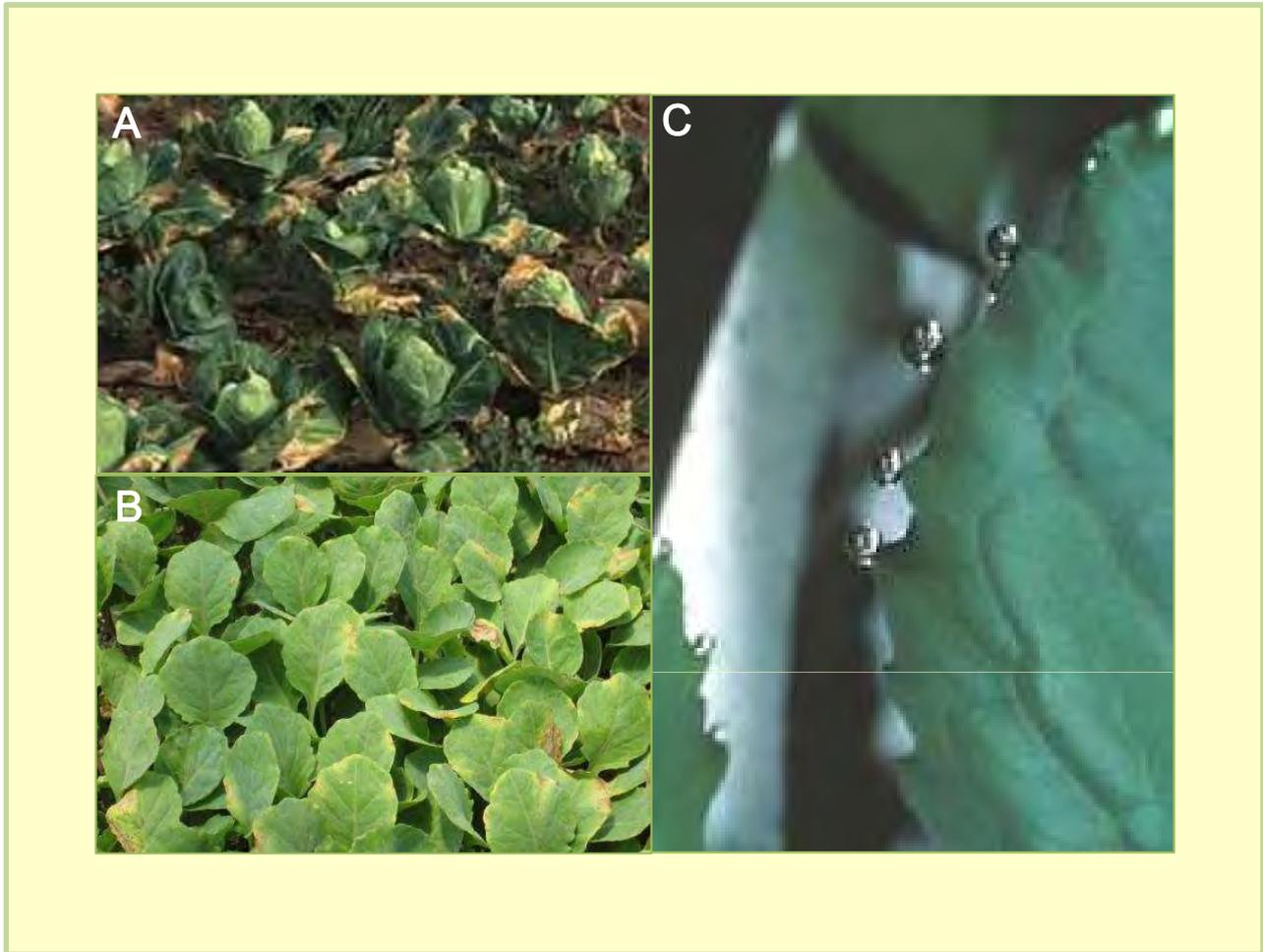


Figure U : Symptômes de la nervation noire sur chou et photo de gouttes de guttation de chou

A) Symptômes de la nervation noire causée par *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) dans un chou (Vicente *et al.*, 2012).

B) Symptômes de la nervation noire causée par *Xcc* sur des feuilles de chou (photos de Holly Lange, Cornell University).

C) Les hydathodes (pores aqueux) exsudent de la sève de xylème ou des gouttes de guttation durant la rosée matinale. Les hydathodes sont les portes d'entrée principales de *Xcc*. (<http://www.extension.org/pages/29925/managing-black-rot-of-cabbage-and-other-crucifer-crops-in-organic-farming-systems>).

exemple est représenté par l'ET3 *xopAH* qui contribue au pouvoir pathogène de *Xcc* 8004 sur le chou (Wang *et al.*, 2007). Contrairement à *xopAC* et *xopD*, la façon dont les autres ET3 contribuant au pouvoir pathogène de *Xcc* sur ces différentes plantes hôtes n'a pas encore été élucidée.

D'autres ET3 sont impliqués dans la reconnaissance de *Xcc* chez ses plantes hôtes (**Tableau A** et **D**). Le gène *xopE2* code une protéine d'avirulence qui entraîne la reconnaissance de *Xcc* lorsque les bactéries sont inoculées sur du chou chinois (He *et al.*, 2007). De façon intéressante, les ET3 *xopAH* et *xopAC* induisent également la reconnaissance de *Xcc* 8004 chez la moutarde et chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, respectivement (Wang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Ces deux derniers exemples montrent que certains ET3 conférant un avantage sur une plante hôte peuvent s'avérer être délétères pour la bactérie chez une autre plante hôte. De la même façon, les mécanismes permettant la reconnaissance des ET3 *xopE2*, *xopAH* et *xopAC* chez ces différentes plantes hôtes restent à déterminer.

Bien que le mode d'action de la majorité des ET3 de *Xcc* reste à identifier, certains ET3 font partie de familles enzymatiques qui laissent présumer de leur mode d'action au cours de l'infection. L'ET3 *XopAH* fait partie de la famille Fido. Les protéines de cette famille possèdent un domaine Fic ou un domaine avec une structure similaire à celle du domaine Fic. Les protéines ayant un domaine Fic réalisent diverses activités enzymatiques telles que l'adénylylation, la phosphocholination, l'uridylylation ou la phosphorylation (Feng *et al.*, 2012; Kinch *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2011; Yarbrough *et al.*, 2009). D'autres ET3 tels que *XopJ5* et *XopD* font partie de la famille des protéases à cystéine. Les membres de cette famille affichent également différentes activités enzymatiques telles que le clivage de protéine, l'acétylation ou le clivage de groupement SUMO (Kim *et al.*, 2005a; Mukherjee *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons déjà vu, les ET3 jouent un rôle prépondérant dans la virulence des bactéries. Cela signifie que le nombre et la fonction des ET3 qui composent l'effectome de chaque bactérie aura une grande importance durant l'interaction avec la plante hôte. Cet effectome a plusieurs rôles supposés. Il est notamment impliqué dans la virulence *via* la suppression des défenses végétales mais également dans la reconnaissance des bactéries par l'intermédiaire des protéines de résistance. De plus, il pourrait également jouer un rôle dans le spectre d'hôte. En d'autres termes, l'infection d'un hôte dépend donc de la présence/absence d'un ou plusieurs ET3 et des défenses auxquelles la bactérie devra faire face. Comme cité ci-dessus *Xcc* possède au moins 28 ET3 prédits. Nous avons voulu savoir de quelle façon ces ET3 modulent l'agressivité de *Xcc* sur la plante modèle *A. thaliana*. De

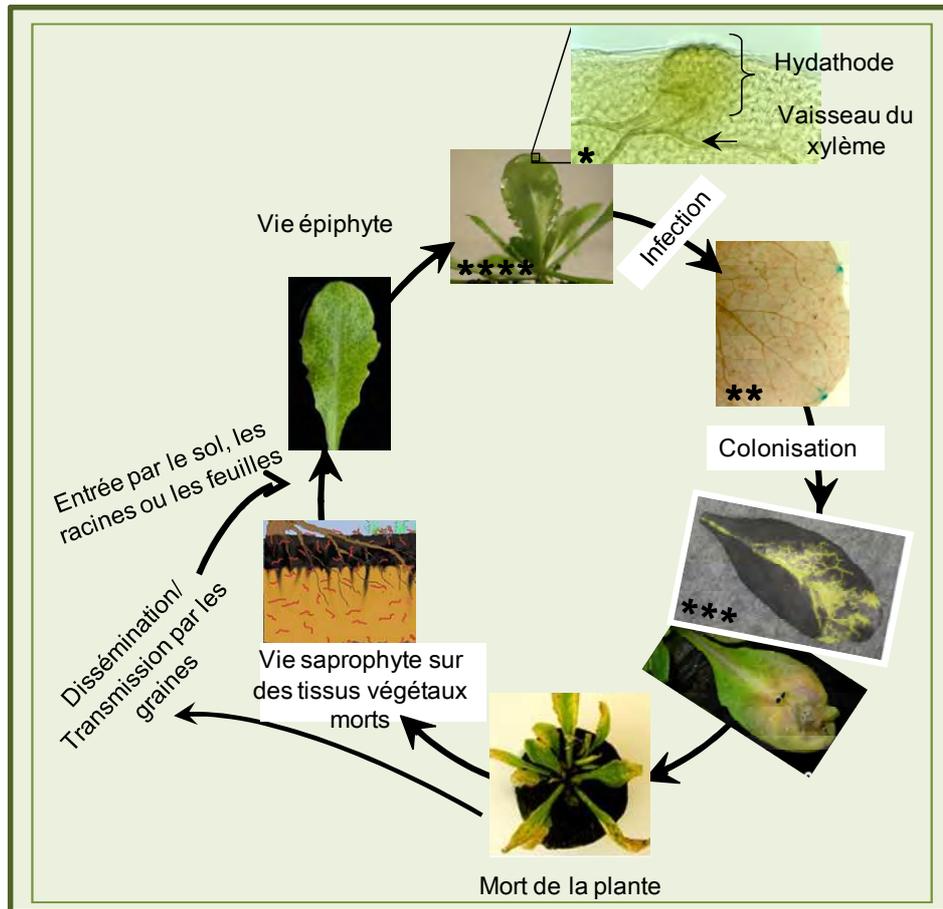


Figure V : Représentation schématique du cycle de vie de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) lors d'une interaction avec *Arabidopsis thaliana*. Après une phase de vie épiphyte, *Xcc* va pénétrer à l'intérieur des tissus végétaux par les hydathodes. La bactérie va ensuite pouvoir envahir les vaisseaux du xylème et induire les symptômes de la maladie. Enfin, la bactérie va survivre dans le sol et sur les débris végétaux après l'infection. La dissémination des bactéries s'effectue par le vent, la pluie, les insectes, mais aussi et surtout par le transport et l'utilisation de graines contaminées. * : Vue en microscopie d'un hydathode d'*A. thaliana* (Photo de Jacques Vasse, LIPM). ** : *Xcc* exprimant constitutivement le gène *uidA* codant la glucuronidase (Hugouvieux *et al.*, 1998). Les bactéries sont présentes au niveau des hydathodes. *** : *Xcc* exprimant constitutivement le gène de la luciférase (*Lux* ; Meyer *et al.*, 2005). Cette photo illustre la colonisation des vaisseaux du xylème par les bactéries. **** : Gouttes de guttation présentes à la marge d'une feuille d'*A. thaliana*. (Blanvillain, thèse 2007).

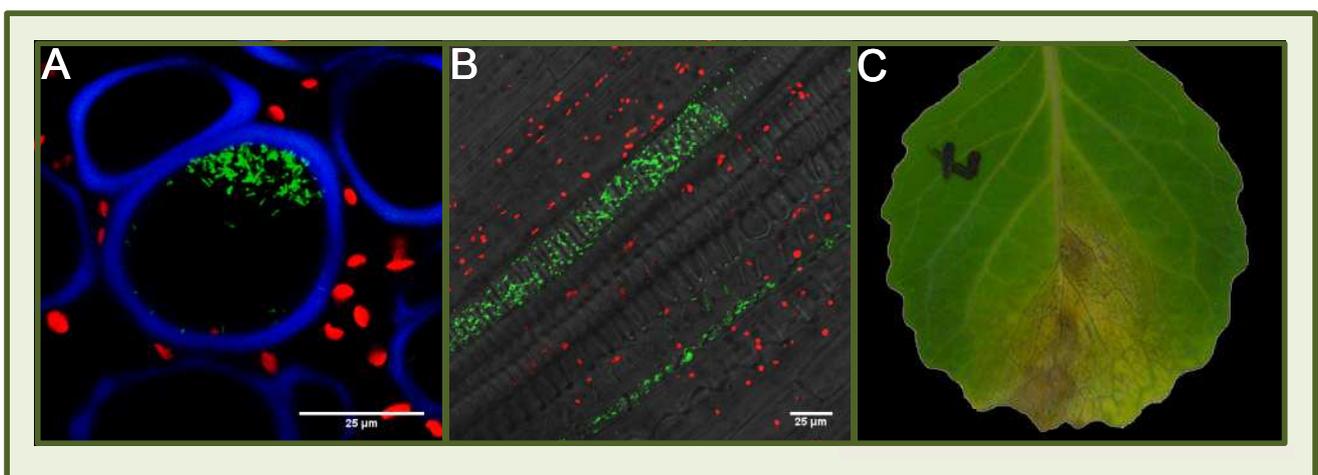


Figure W : Observations microscopiques et macroscopiques de la nervation noire des Brassicacées. Coupes transversale (A) et longitudinale (B) de pétiole infecté par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). Les bactéries apparaissent en vert (fluorescence GFP) et regroupées dans les vaisseaux du xylème. La fluorescence rouge correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle. En A, le bleu correspond à l'autofluorescence de la lignine présente dans les parois du xylème lors de l'excitation aux UV. Ces photos ont été prises par Thomas Duge de Bernonville et Philippe Laporte, LIPM. Symptômes de la nervation noire sur chou cv « Bartolo » 10 jours après inoculation par souche la souche *Xcc* 8004 (C).

Présentation de notre bactérie modèle

plus, nous avons voulu caractériser plus en détail l'ETI induite par *xopAC* chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*.

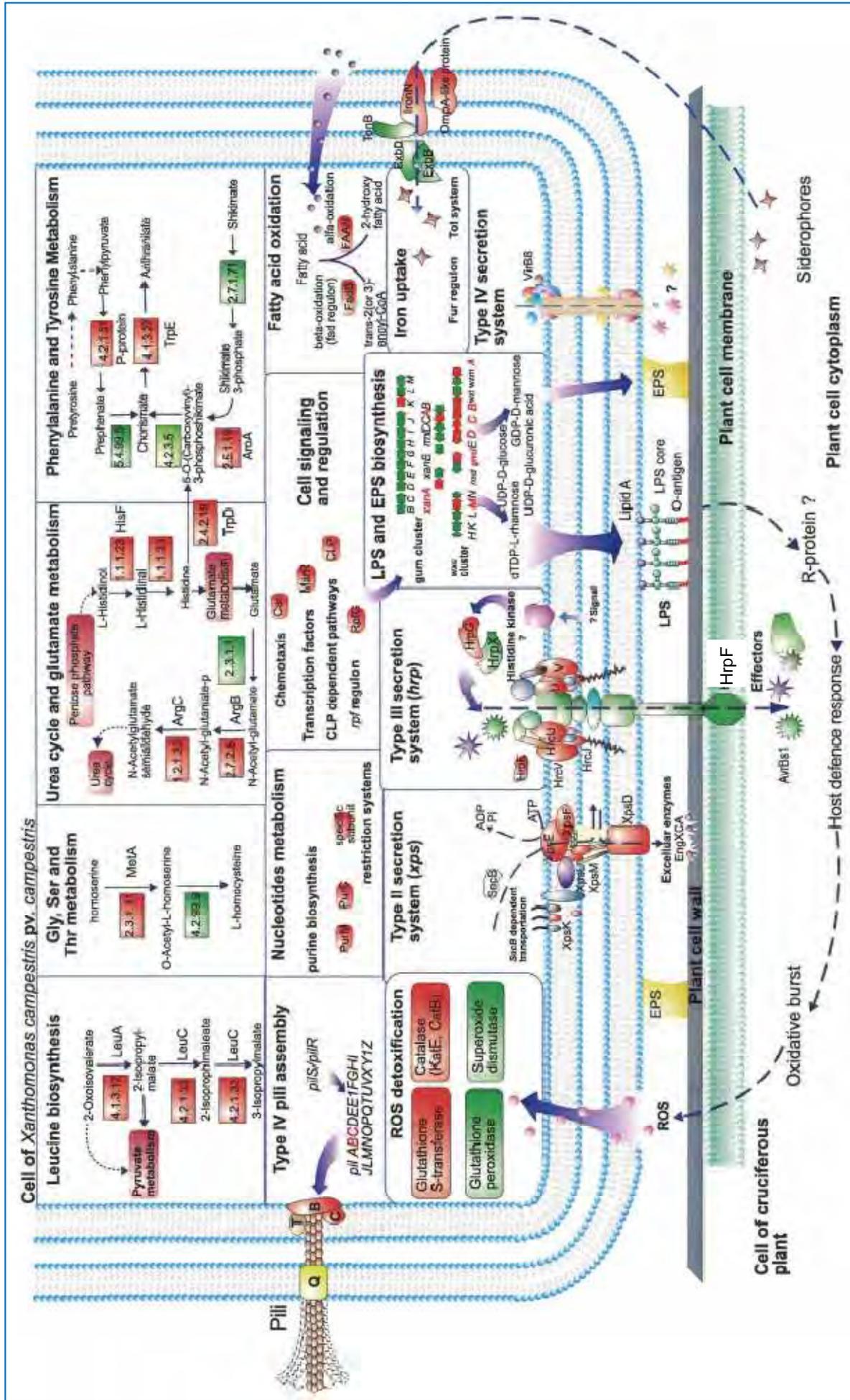


Figure X : Illustration des interactions entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et une plante-hôte. EPS, Exopolysaccharides ; FAAH, Fatty Acid Hydroxylase ; hrp, hypersensitive response and pathogenicity genes ; LPS, Lipopolysaccharides ; ROS, Reactive Oxygen Species ; R-protein, Resistance protein ; Xps, Xanthomonas protein secretion (Qian et al., 2005).

IV. Problématique du travail de thèse

IV.1 Questions et importance du travail de thèse

Les études visant à caractériser la virulence de *Xcc* utilisaient initialement l'infiltration de la bactérie dans le mésophile. Ces études favorisaient donc l'entrée de la bactérie par les stomates qui ne sont pas le mode d'entrée préférentiel de *Xcc* (Hugouvieux *et al.*, 1998). Des études réalisées sur *Xcc* ainsi que d'autres bactéries phytopathogènes montrent que les symptômes observés ne sont pas les mêmes selon le mode d'entrée des bactéries chez la plante (Shaw and Kado, 1988). L'entrée par les hydathodes est le mode d'entrée qui reproduit de façon la plus efficace les symptômes de la nervation noire induits par *Xcc* chez ses plantes hôtes (Shaw and Kado, 1988). Cette spécificité tissulaire suggère que *Xcc* a mis en place des mécanismes spécifiques pour l'entrée par les hydathodes.

L'équipe « Stratégie Infectieuse des *Xanthomonas* » dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a optimisé le pathosystème *A. thaliana*-*Xcc*. Cette optimisation vise à mimer de façon reproductible et au laboratoire le mode de propagation de *Xcc* dans la feuille et la colonisation de cette dernière. La méthode d'inoculation employée dite « inoculation par piercing » consiste à inoculer les bactéries directement dans la nervure centrale des feuilles, c'est à dire au niveau du système vasculaire. Ce mode d'inoculation provoque une colonisation du xylème, une chlorose en forme de V et un noircissement des veines (typique de la nervation noire causée par *Xcc*) chez les écotypes Kashmire (Kas) et Sf-2 d'*A. thaliana* (Meyer *et al.*, 2005). Aussi, l'inoculation par piercing est une méthode qui permet de reproduire les symptômes de la nervation noire et donc de pouvoir étudier les déterminants génétiques impliqués dans la virulence de *Xcc*. Basée sur les résultats obtenus par l'inoculation par piercing, ma thèse s'est articulée autour de deux axes.

Le premier axe a consisté à rechercher les déterminants (avec un focus sur les ET3) nécessaires à l'agressivité de *Xcc* sur *A. thaliana*. Le deuxième axe a porté sur la caractérisation fonctionnelle d'un ET3 nommé *xopAC*.

IV.1.1 Quels sont les loci impliqués dans la virulence de *Xcc* sur *A. thaliana* ?

Les études visant à identifier les déterminants du pouvoir pathogène de *Xcc* sont réalisées essentiellement de façon binaire en utilisant une souche de référence telle que *Xcc* 8004 et un écotype d'une plante modèle telle que *A. thaliana*. Qian *et al* (2005) ont montré que les souches 8004 et ATCC33913 ne se comportent pas de la même façon selon l'hôte.

Une autre étude comparative entre les génomes des souches B100, 8004 et ATCC33913 a établi que la souche B100 possède 496 séquences codantes qui lui sont propres tandis que les souches 8004 et ATCC33913 en possèdent 113 chacune. De plus, l'effectome de la souche B100 diffère de trois ET3 (*xopD*, *xopJ5*, *xopE2*) par rapport aux deux autres souches séquencées (8004 et ATCC33913 ; **Tableau E**). De quelles façons les différences présentes au sein du génome de chaque souche (en particulier les ET3) vont-elles impacter leur agressivité sur leurs plantes hôtes ? Les résultats obtenus à partir d'une souche vont ils être pertinents/transposables à l'échelle d'une population ? Afin d'appréhender la virulence de *Xcc* sur ses plantes hôtes, il devient nécessaire d'analyser cet aspect à l'échelle d'une population. Les méthodes de génétique classique n'étant pas applicables à l'échelle d'une espèce, nous avons opté pour la GWA qui est une alternative en adéquation avec les objectifs de cette étude. De plus la GWA, contrairement aux études de génétique classique, permet l'identification de marqueurs ayant un impact mineur sur l'agressivité.

Cette étude est, non seulement, la première à adapter le GWA sur des microorganismes pathogènes. Elle est également l'une des premières à étudier la diversité du pouvoir pathogène au niveau intrapathovar.

IV.1.2 Existe-il une spécificité tissulaire pour la réponse immunitaire : utilisation de *xopAC* comme outil pour étudier l'immunité vasculaire chez *A. thaliana*

Durant la mise au point de l'inoculation par piercing, notre équipe a observé que l'écotype Col-0 est résistant à la souche ATCC33913 de *Xcc* avec cette méthode d'inoculation alors qu'avec la méthode d'infiltration cet écotype est sensible à *Xcc* ATCC33913 (Meyer *et al.*, 2005). Ces résultats montrent que l'écotype Col-0 présente une spécificité tissulaire pour la reconnaissance de *Xcc*. Les études de mutagenèse réalisées plus tard ont permis d'identifier l'ET3 *xopAC* (*avrAC*) comme étant à la base de la reconnaissance de la souche 8004 de *Xcc* dans le système vasculaire de *Xcc* chez l'écotype Col-0 (Xu *et al.*, 2008). En effet, la mutagenèse de l'ET3 *xopAC* de *Xcc* 8004 produit des symptômes caractéristiques de la nécrose noire lorsque les bactéries sont inoculées dans la nervure centrale des feuilles de l'écotype Col-0 (Xu *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la reconnaissance de *xopAC* chez l'écotype de Col-0 est de type gène-pour-gène. L'ET3 *xopAC* induit donc une ETI chez l'écotype Col-0 que nous appelons V-ETI (Vascular-ETI) car cette reconnaissance n'a lieu que lorsque les bactéries sont inoculées dans la nervure centrale de la feuille. La V-ETI induite par l'ET3 *xopAC* chez l'écotype Col-0 est le premier exemple de reconnaissance d'une bactérie avec une spécificité tissulaire. Ce résultat suggère que les mécanismes de défense du mésophile et du tissu vasculaire seraient

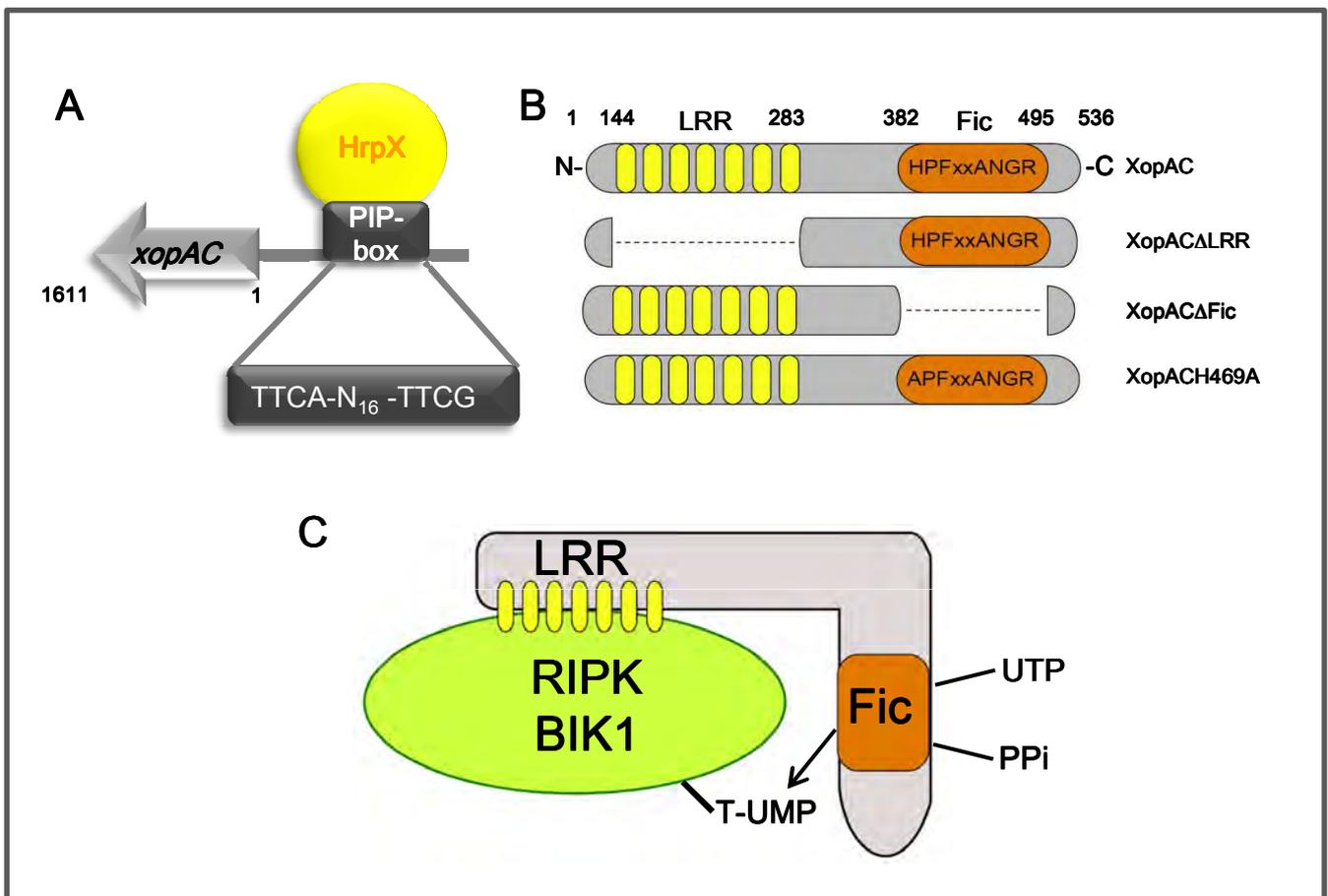


Figure Y : Représentation schématique de la protéine XopAC et de son mode d'action. A) Le gène *xopAC* est un gène monocistronique de 1611 pb qui est co-régulé avec le SST3. L'expression du gène est activée par le facteur de transcription HrpX qui se fixe sur la PIP-box imparfaite présente dans le promoteur du gène *xopAC*. B) Représentation schématique de la protéine XopAC. N (N-terminal) et C (C-terminal) désignent les limites de la protéine. LRR : Leucine Rich Repeats ; Fic : Filamentation induced by cAMP ; XopAC Δ LRR : protéine XopAC possédant une délétion du domaine LRR ; XopAC Δ Fic : protéine XopAC possédant une délétion du domaine Fic ; XopACH469A : protéine XopAC où l'histidine H469 (domaine Fic) est remplacée par une alanine. C) Modèle illustrant l'activité enzymatique de XopAC sur ses cibles végétales (protéines de la sous famille VII des RLCK). XopAC interagit avec ses cibles végétales *via* son domaine LRR et il modifie ses cibles par uridylylation (ajout d'un groupement UMP sur un résidu thréonine) grâce à son domaine Fic.

différents. Les plantes auraient donc mis en place différentes stratégies de reconnaissance et de défense dans leurs différents tissus. A ce jour, l'immunité vasculaire a très peu été étudiée et décrite dans la littérature, probablement à cause de l'absence d'outils permettant de discriminer les réponses du mésophile face à celles du tissu vasculaire. De ce fait, il n'est pas clair si une telle immunité est réellement mise en place dans le xylème (tissu mort) et si une HR vasculaire est également présente dans ce tissu. Nous avons donc décidé d'utiliser l'ET3 *xopAC* comme un outil afin d'étudier génétiquement l'immunité vasculaire chez *A. thaliana*.

IV.2 Etat des lieux/modèle

Avant mon arrivée dans l'équipe, l'ET3 *xopAC* avait été identifié comme étant le gène d'aviorulence responsable de la reconnaissance de *Xcc* 8004 chez l'écotype Col-0. L'ET3 *xopAC* est reconnu uniquement dans le système vasculaire de l'écotype Col-0. Cette reconnaissance présente donc une spécificité tissulaire. Aucune donnée n'était disponible sur l'existence d'une reconnaissance avec une spécificité tissulaire des bactéries. Le gène *xopAC* fait 1611 pb. Son promoteur possède une PIP-box imparfaite. L'expression du gène *xopAC* est co-réglée avec les gènes du SST3 par HrpX. Le gène *xopAC* était spécifique des bactéries *Xcc* (**Figure YA**). La séquence protéique fait 536 aa et elle possède deux domaines : LRR et Fic. Le domaine LRR est un domaine qui permet l'interaction entre une protéine et un ligand. Le domaine Fic est un domaine qui resta sans activité enzymatique décrite pendant longtemps. Une activité enzymatique du domaine Fic fut identifiée en 2009. Les domaines Fic de deux protéines de virulence bactérienne (*VopS* de *Vibrio parahaemolyticus* et *IbpA* de *Histophilus somni*) modifient post-traductionnellement des protéines animales par adénylylation (ajout d'un groupement AMP *via* un ATP sur un résidu thréonine ou tyrosine). Aucune donnée n'étant disponible sur la fonction de XopAC, le modèle suivant fut émis : XopAC interagit avec une protéine *via* son domaine LRR et modifie cette dernière par adénylylation *via* son domaine Fic. Le domaine Fic ou l'activité d'adénylylation n'ayant jamais été reportés chez les plantes, nous avons donc voulu savoir : 1) de quelle façon l'activité enzymatique du domaine Fic contribue-t-elle à l'agressivité de *Xcc* sur ses plantes hôtes et 2) est ce que cette activité enzymatique est responsable de la reconnaissance de *Xcc* dans le système vasculaire de l'écotype Col-0.

Afin de répondre à ces questions l'analyse fonctionnelle de XopAC ainsi que la recherche des cibles végétales de cet ET3 ont été entreprises. Dans ce but, certains outils étaient déjà disponibles à mon arrivée dans l'équipe. La mutagénèse des domaines Fic et LRR a été réalisée afin d'évaluer l'impact de ces deux domaines sur la fonction de virulence et d'aviorulence de XopAC (M. Chabannes, LIPM). Des plantes transgéniques exprimant le

gène *xopAC* chez les écotypes Col-0 et Kas d'*A. thaliana* avaient été construites (M. Chabannes, LIPM; Zuo *et al.*, 2000). De façon intéressante, seules des plantes transgéniques exprimant le gène de façon conditionnelle ont été obtenues. Ces résultats suggèrent que l'expression constitutive de *xopAC* est toxique pour la cellule. Des vecteurs permettant la recherche ou la validation de cibles de XopAC ou ses variants (XopAC Δ LRR et XopAC Δ Fic) par double hybride chez les levures avaient également été construits (M. Chabannes, LIPM). Durant ma thèse (et mon M2R), ces outils et d'autres que j'ai générés, ont été utilisés afin de comprendre le rôle de XopAC au cours de l'infection et d'identifier les déterminants génétiques impliqués dans la reconnaissance de cet ET3 chez *A. thaliana*.

En plus de l'étude de l'ET3 *xopAC* de la souche 8004, la diversité génétique présente au sein des souches de *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*) a également été étudiée afin d'identifier des loci impliqués dans l'adaptation de cette bactérie sur ses plantes hôtes. Une collection de 29 souches de *Xcc* disponibles dans l'équipe avait été utilisée afin d'évaluer leur agressivité sur deux écotypes d'*A. thaliana* (Col-0 et Kas) comme plantes hôtes durant mon M2R. Afin d'obtenir plus de puissance statistique, 16 souches de *Xcc* ont été rajoutées à cette collection durant ma thèse.

IV.3 Stratégies employées durant la thèse

IV.3.1 Recherche de loci impliqués dans l'adaptation de *Xcc* sur sa plante hôte *A. thaliana*

Afin d'identifier des loci impliqués ou associés à un changement d'agressivité de *Xcc* sur *A. thaliana*, nous avons exploité la diversité naturelle présente au sein du pathovar *campestris*. Les souches de *Xcc* sont présentes sur tous les continents et sont réparties en 9 races basées sur des interactions discriminantes avec des cultivars résistants ou sensibles de Brassicacées (Fargier and Manceau, 2007; Vicente *et al.*, 2001). Une collection mondiale de 45 souches de *Xcc* a été utilisée pour la recherche de marqueurs associés à la virulence de *Xcc* sur *A. thaliana*. Ces souches proviennent de différentes collections [CN, National Collection; CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes; HRI, Horticulture Research International; (He *et al.*, 2007)] et certaines sont typées en race (HRI et CFBP).

Deux approches ont été utilisées afin d'identifier ces marqueurs. La première est une approche de génétique inverse qui a consisté à réaliser des délétions simple ou double des ET3 afin d'identifier des ET3 associés à un changement d'agressivité de *Xcc* 8004 sur *A. thaliana*. La deuxième approche a consisté à déterminer l'agressivité des 45 souches de *Xcc* sur deux écotypes d'*A. thaliana* (Kas et Col-0) et étudier la distribution des T3SP connues des 3 souches séquencées (B100, 8004 et ATCC33913) au sein de cette collection de

souches. Ces deux paramètres (agressivité et T3SP polymorphes) ont été utilisées dans une étude de génétique d'association (GWA) afin d'identifier des ET3 qui sont associés à une variation de l'agressivité de *Xcc* sur *A. thaliana*. En plus des ET3, nous avons également inclus dans l'étude de GWA, 929 marqueurs polymorphiques de types AFLP (marqueurs neutres et répartis de façon aléatoire sur les génomes des *Xcc*).

IV.3.2 Analyse fonctionnelle de L'ET3 XopAC

Afin d'élucider le rôle de l'ET3 XopAC au cours de l'infection nous avons entrepris de rechercher les cibles végétales de cet ET3 ainsi que son analyse fonctionnelle. Dans ce but nous avons combiné plusieurs approches. Dans un premier temps, nous avons étudié la diversité de ce gène chez 30 souches de *Xcc* en combinaison de la mutagenèse des domaines Fic et LRR afin d'identifier les aa et domaines importants pour la fonction de virulence et avirulence de XopAC (**Figure YB**). De plus, l'Histidine 469 (importante pour l'activité enzymatique du domaine Fic) a été remplacée par une alanine afin de savoir si l'activité enzymatique de ce domaine est importante pour la fonction de la protéine (virulence et d'avirulence ; **Figure YB**). Dans un second temps, nous avons cherché à identifier la localisation de la protéine *in planta* chez *N. benthamiana* grâce à une fusion YFP. Pour finir, des plantes transgéniques de l'écotype Col-0 exprimant le gène *xopAC* sous le contrôle d'un promoteur inductible au β -œstradiol (Col-0 pER8::*xopAC*) ont été analysées. Ces plantes ont été utilisées afin d'étudier (morphologiquement et cytologiquement) l'effet de la protéine chez des plantules de l'écotype Col-0 (plante résistante).

Afin de rechercher les cibles végétales de XopAC deux approches ont été utilisées. La première est une approche de double hybride chez la levure afin de rechercher des interacteurs physiques de XopAC. Le crible a été réalisé avec le système LexA en utilisant une banque universelle normalisée d'*A. thaliana* (Dualsystem P02403) contenant $5.6 \cdot 10^6$ clones avec une longueur moyenne de 1.6 kb. Ce crible a été réalisé par la compagnie Dualsystems Biotech. Dans la deuxième approche, les plantes transgéniques (Col-0 pER8::*xopAC*) ont été utilisées afin de rechercher des interacteurs génétiques *xopAC*. En effet, l'expression de *xopAC* chez des plantules de l'écotype Col-0 induit un arrêt de croissance de la racine primaire et de la partie aérienne. Une chlorose des cotylédons est également observée. Afin de rechercher des supprimeurs du phénotype induit par XopAC chez les plantes Col-0 pER8::*xopAC*, une mutagenèse aléatoire à l'EMS (Ethyl Méthane Sulfonate) a été entreprise.

Problématique du travail de thèse

Les résultats de ces travaux de recherche sont présentés sous forme d'articles dans la partie « Résultats ». Des données supplémentaires ont été éventuellement rajoutées en complément de ces articles.

Résultats

V. Quels sont les déterminants nécessaires au pouvoir pathogène de *Xcc* sur *A. thaliana*

Les bactéries possèdent un ensemble de déterminants génétiques leur permettant de coloniser leurs plantes hôtes. L'implication de ces déterminants dans le pouvoir pathogène et dans la spécificité d'hôte commence à être élucidée. Cependant, les études sur les bases génétiques et moléculaires à la base de la spécificité d'hôte se sont essentiellement concentrées au niveau de l'espèce tandis que celles au niveau intrapathovar ont été négligées. L'étude à l'échelle intrapathovar est une échelle pertinente car elle peut permettre d'identifier des gènes/loci à la base de la virulence des pathogènes. Dans cette étude, nous avons utilisé la diversité génétique naturelle présente chez 45 souches *Xcc*. Cette collection a été utilisée afin d'identifier des marqueurs génétiques associés à une modification de l'agressivité des souches sur deux écotypes d'*A. thaliana* (Col-0 et Kas).

De façon très surprenante, l'agressivité de ces souches est très contrastée sur les deux écotypes. De plus, l'effectome basé sur les génomes séquencés de trois souches est extrêmement hétérogène car il varie de 18 à 28 T3SP par souche. En utilisant la GWA et la mutagenèse d'ET3 chez *Xcc* 8004, nous avons pu identifier plusieurs ET3 dont *xopAC* et *xopAM* ainsi que 106 marqueurs AFLP neutres associés à une variation du pouvoir pathogène de *Xcc*.

Cette étude démontre la faisabilité de l'utilisation du GWA pour l'identification de nouveaux déterminants génétiques associés au pouvoir pathogène chez les bactéries phytopathogènes.

Les travaux réalisés sur la diversité naturelle des souches de *Xcc* font l'objet d'un article soumis dans la revue mBio (Guy *et al.*, soumis). Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec A. Genissel (LIPM) et l'équipe de C. Manceau (UMR1345 IRHS). Les études de génétique d'association et de statistique ont été réalisées par A. Genissel. L'étude de diversité de l'effectome a été entreprise à partir des travaux réalisés dans l'équipe de C. Manceau. Le séquençage des allèles *xopAC* chez les souches CFBP a été réalisé par l'équipe de C. Manceau. Le séquençage des allèles *fliC*, la mutagenèse des ET3 ainsi que l'étude AFLP ont été réalisées par L. Noël. J'ai réalisé l'étude de l'effectome des souches de *Xcc*, les tests de pouvoir pathogène et l'analyse fonctionnelle de l'ET3 *xopAC*. J'ai également participé à la rédaction de l'article. Les résultats de ces travaux sont présentés sous forme d'article ci-dessous.

Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics

Running Title: *Xcc* effectome and pathogenicity

Endrick Guy ^{a,b,#}, Anne Genissel ^{a,b,g,#,*}, Ahmed Hajri ^{c,h}, Matthieu Chabannes ^{a,b,i}, Perrine David ^{c,j}, Sébastien Carrere ^{a,b}, Martine Lautier ^{a,b,d}, Brice Roux ^{a,b}, Tristan Boureau ^e, Matthieu Arlat ^{a,b,d}, Stéphane Poussier ^{f,k} and Laurent D. Noël ^{a,b,*}

^a INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 441, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

^b CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

^c INRA, UMR 1345 IRHS, Bat. C, 42 rue Georges Morel, BP 60057, F-49071 BEAUCOUZE Cedex, France.

^d Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, France

^e Université d'Angers, UMR 1345 IRHS, Bat. C, 42 rue Georges Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé cedex, France.

^f Département de Sciences Biologiques, Agrocampus Ouest - centre d'Angers, Institut National d'Horticulture et de Paysage, UMR 1345 IRHS, Bat. C, 42 rue Georges Morel, F-49071 Beaucouzé cedex, France.

^g present address: INRA-AgroParisTech BIOGER, Avenue Lucien Bretignieres, F-78850 Thiverval Grignon, France.

^h present address: INRA, UMR1349 IGEPP, F-35653 Le Rheu, France.

ⁱ present address: CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France.

^j present address: HM. Clause, F-49800 La Bohalle, France.

^k present address: Département de Biologie, Université de la Réunion, UMR C53 PVBMT, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint-Denis Cedex 9, La Réunion, France.

[#] These authors contributed equally to the work.

^{*} To whom correspondence should be addressed: Laurent D. Noël, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F-31326 Castanet-Tolosan, France. Email: laurent.noel@toulouse.inra.fr; Phone: +33 5 61 28 50 47; Fax: +33 5 61 28 50 61; Anne Genissel, INRA-AgroParisTech BIOGER,

UR 1290, Avenue Lucien Bretignieres, F-78850 Thiverval Grignon, France. Email: anne.genissel@versailles.inra.fr; Phone +33 1 30 81 45 60; Fax: +33 1 30 81 53 06.

Word count: Abstract= 246; importance= 128; Text body= 7539.

Abstract

The pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), the causal agent of black rot of Brassicaceae, manipulates the physiology and the innate immunity of its hosts. Association genetics and reverse genetics on a world panel of 45 *Xcc* strains were used to gain understanding in the genetic basis of bacterial pathogenicity on *Arabidopsis thaliana*. We found that the composition of the minimal predicted type III secretome varied extensively from 18 to 28 proteins per strain. There were clear differences in aggressiveness of those *Xcc* strains on two *Arabidopsis* natural accessions. We identified 8 effector genes (*xopAC*, *avrBs1*, *xopE2*, *xopH*, *xopP*, *xopAH*, *xopF* and *xopJ5*) and 106 AFLP markers that were associated with the variation of the disease symptoms. The nature and distribution of the AFLP markers remain to be determined but we observed a low linkage disequilibrium level between predicted effectors and other significant markers, suggesting that additional genetic factors have a meaningful contribution to pathogenicity. Mutagenesis of type III effectors in *Xcc* confirmed *xopAC* functions both as a virulence and avirulence gene in *Arabidopsis* and *xopAM* as a second avirulence gene on Col-0. Yet, we did not detect the effect of any other effector in the *Xcc* 8004 strain likely due to other genetic background effects. These results highlight the complex genetic basis of pathogenicity at the pathovar level and encourage us to challenge the agronomical relevance of some virulence determinants identified solely in model strains.

Importance

The identification and understanding of the genetic determinants of bacterial virulence are essential to design efficient protection strategies for the infected plants. The recent availability of genomic resources for a limited number of pathogen isolates and host genotypes has strongly biased our research towards genotype-specific approaches. Indeed, these do not consider the natural variation in both pathogens and hosts so that their applied relevance should be challenged. In our study, we exploited the genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), the causal agent of black

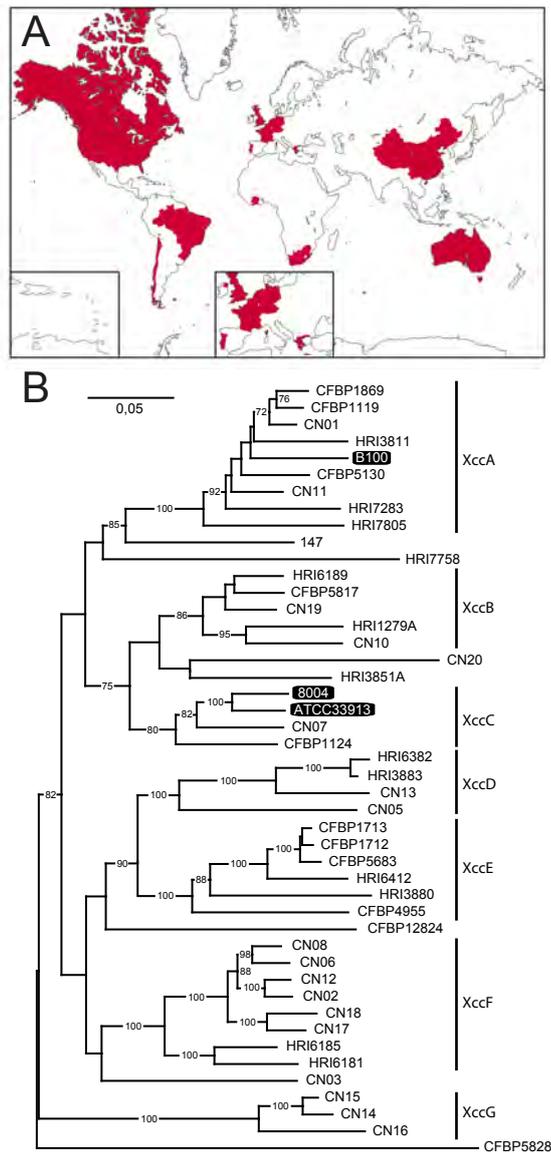


Fig. 1: Origin and neutral phylogeny of a world collection of 45 *Xcc* strains. (A) Countries of origin for the different *Xcc* strains of the collection are colored in purple. (B) Neighbor-joining tree based on Dice similarity indices inferred from 1942 AFLP markers shows the phylogenetic relationships among *Xcc* strains. Bootstrap values higher than 70% are indicated. *Xcc* strains with genome sequence available are boxed in black. On the right, lines indicate AFLP-based clades of *Xcc*. *X. campestris* pv. *raphani* strain CFBP5828 was used to root the tree.

rot on Brassicaceae (e.g. cabbage), to mine for pathogenicity determinants. This work evidenced the contribution of known and unknown loci to pathogenicity relevant at the pathovar level and identified these virulence determinants as prime targets for breeding resistance against *Xcc* in Brassicaceae.

Keywords: *Xanthomonas*, pathogenicity, natural variation, *xopAC*, *xopAM*, AFLP, phylogeny, quantitative genetics, genome-wide association, *avrAC*

Sequence data: Accession numbers for the 29 *xopAC* loci and the 44 5' sequence of *fliC* from *X. campestris* are JX453111 to JX453139 and JX453140 to JX453183, respectively.

Introduction

Phenotypic variation is central for species adaptation and is due to environmental and genetic variation. The latter often arises from complex interactions between multiple loci. Understanding the molecular mechanisms underlying most complex traits thus remains a main challenge in evolutionary biology (1, 2). The first step towards this goal is to perform linkage or association studies. Association studies seek to identify the joint distribution between genotype and phenotype, in order to characterize the genetic variants responsible for phenotypic variation. Genome-wide association (GWA) studies have proven to guarantee the detection of significant associations in humans (2) and other model species (3, 4). Such an approach begins to emerge in the field of plant-pathogen interaction, with all the promise it can offer (4, 5). With the dropping cost of genotyping and sequencing technologies, GWA studies in plant pathogen genomes become accessible.

Among plant pathogens the *Xanthomonas* genus is a complex and large group of Gamma proteobacteria, which comprises at least 19 species pathogenic on more than 400 host plants (6, 7). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is a seed-borne pathogen distributed worldwide and the causal agent of black rot on leaves of Brassicaceae of economic importance such as cabbage, mustard, radish, as well as the model plant *Arabidopsis thaliana* (8). Currently there are four complete *Xcc* genomes available (9-12). *Xcc* strains have been classified in 9 races based on a discriminant set of resistant/susceptible Brassica cultivars (13, 14) but the molecular basis for the race annotation remains elusive.

To infect their host plants, bacteria of the *Xanthomonas* genus rely on a large arsenal of virulence factors such as adhesion factors, cell wall degrading enzymes, extracellular- and lipo-polysaccharides, and a type three secretion (TTS) system and associated type three effector proteins (T3Es) (6, 7). The TTS system is a protein secretion apparatus used by animal and plant pathogens or mutualists to deliver T3Es virulence proteins directly into host cells where they can modulate the host physiology to suppress or to evade the host immune system. This TTS system and T3Es are essential for virulence since mutation in the TTS machinery limits pathogen growth and symptom development. Yet, the loss of single effector genes has often no or limited impact on pathogenicity likely due to important functional redundancy.

Plant innate immunity is a multilayer system (15): (i) Plants monitor for the presence of conserved/generic pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and activate PAMP-triggered immunity (PTI) (16). For instance, flagellin is a PAMP perceived by FLS2 receptor at the Arabidopsis plasma membrane (17). (ii) Plants can detect the presence of strain-specific T3Es, which trigger a rapid and specific immune response (Effector-triggered immunity, ETI). (iii) Importantly, T3Es are known to be able to suppress both PTI and ETI caused by PAMPs and T3Es, respectively (18). Therefore, T3Es are considered as prime pathogenicity determinants for plant pathogens. In *Xanthomonas*, T3Es were called either Xop (*Xanthomonas* outer protein) (19) or Avr (Avirulence) proteins depending on their mode of identification (see <http://www.xanthomonas.org/t3e.html>). In available genomes, the T3E repertoires (called type III effectome) can be predicted based on homology to known T3Es, and screens for eukaryotic features and/or promoter motifs necessary for co-expression with the TTS system. T3Es can also be identified experimentally using screens for TTS system-co-expressed genes, *in vitro* demonstration of type three-dependent secretion and *in planta* demonstration of translocation. Such analyses predict at least 72 T3Es in *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (20), 39 in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (21) and 36 in *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) 85-10 (22). So far, only 20 T3Es were reported in *Xcc* ATCC33913 (22). Yet, a subset of these T3Es are family- or species-specific: for instance, *xopAC* (originally called *avrAC*) is exclusively found in *X. campestris* species and cannot be found by simple homology searches with effectors from other *Xanthomonas* species (22, 23). T3Es are distributed heterogeneously in bacterial populations. Thus, effectomes as determined from sequenced strains are underestimates of the species or pathovar T3E repertoires. Individual genomes are shaped by horizontal gene transfer

(HGT), mechanism by which the virulence factors are distributed throughout the genomes via transposable elements, plasmids, and pathogenicity islands. Because T3Es display characteristics of heterogeneous distribution among strains, participate in host defense suppression, and promote pathogen multiplication and dispersion, T3Es are good candidates to in part explain host specificity in plant pathogenic species *P. syringae* (24) and *X. axonopodis* (25). To date, the genetic basis of *X. campestris* host specificity remains unknown.

In this study we report our findings of the natural genetic variation of *Xcc* using a panel of 45 strains harvested worldwide on different host cultivars. Our goal was to identify genes or loci with large virulence or avirulence effects relevant at the pathovar level. The aggressiveness of these 45 natural strains was tested on two natural accessions of *Arabidopsis thaliana*, and association studies were performed using the presence/absence of T3E genes and a large set of AFLP markers. The function of candidate T3Es on pathogenicity was also tested by reverse genetics. This study identified a set of T3E genes and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers associated with pathogenicity. Our results highlight the complexity of *Xcc* pathogenicity, and demonstrate the dual virulence or avirulence role of T3Es.

Results

High-resolution AFLP-based phylogeny and molecular evolutionary genetics reveal a high genomic diversity in a world panel of 45 *Xcc* strains

We aimed at investigating the genetic diversity within a collection of 45 *Xcc* strains, selected as to maximize the diversity based on geographic origin, host plant, year of isolation and race (see Table S1, Fig. 1A). Multi-locus sequence analysis (MLSA) performed on genes *efp* and *glnA* confirmed that the selected strains were genuine *Xcc* (Table S1) (26). An AFLP analysis, which generates markers throughout the genomes, was performed to determine precisely the phylogenetic relationships among these 45 *Xcc* strains (Fig. 1B). The *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*) strain CFBP5828 was used as outgroup. Among the 1942 neutral markers identified, 929 polymorphic markers had a minor allele frequency (maf) > 5%. Based upon the AFLP results, seven *Xcc* clades (A-G) including 39 strains of a total 45 were supported by high bootstrap values (>80%). The remaining strains could not be assigned unambiguously to any of those clades. Still, AFLP analysis was highly discriminative relative to the MLSA analysis (Fig. S1A) and was thus preferred for subsequent analyses. The gene

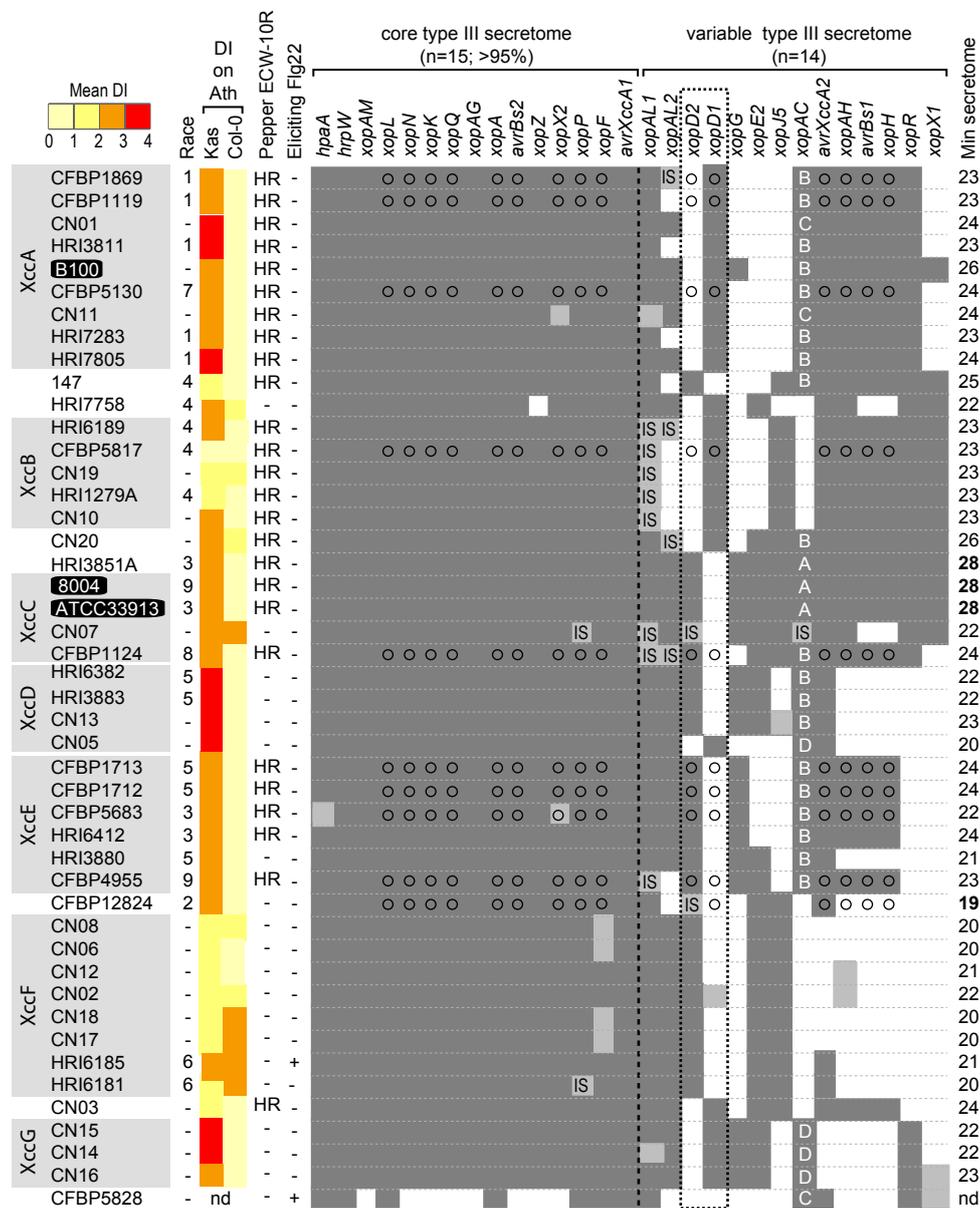


Fig. 2: Distribution of genes coding for type III secreted proteins among Xcc strains and Xcc pathogenicity on Arabidopsis and pepper. Phylogeny of Xcc Strains is indicated in the left as determined (Fig. 1B). Pathogenicity of these Xcc strains on Arabidopsis natural accessions Col-0 and Kas plants (Mean disease index at 7dpi) is indicated by color-coding. For Arabidopsis: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. Strains were also inoculated on nonhost ECW-10R pepper carrying the *Bs1 R* gene: "HR", hypersensitive response; "-", no HR. The presence of a flagellin protein eliciting FLS2 receptor in Arabidopsis was inferred from *fljC* partial DNA sequence (Fig. S2) as described (28). The presence or absence of a homologous T3SP gene sequence was determined by PCR either on the 5' or 3' part of the gene or on the entire gene (FL). Dark grey squares represent presence of the corresponding genes with both primer combinations at the expected size, whereas white squares represent absence of PCR amplification or with a different amplicon size. Light grey squares indicate that the expected PCR amplicons were only detected with one of the two primer combinations. The circles indicate that these results are corroborated by dot blot analyses. The core (present in more than 95% of the strains studied) and variable type III secretomes are separated by a vertical dashed line. The dotted frame shows the mutually exclusive presence/absence of *xopD1* and *xopD2* in Xcc. A, B, C and D correspond to the different protein XopAC haplotypes (see Fig.5). Genes detected but interrupted by an insertion sequence are noted IS: IS1477, IS1478 and IS1995 in *xopAL1*, IS1479 in *xopAC*, IS1404 in *xopAL2*, IS1404 and IS1481 in *xopP* and IS1404 and IS1477 in *xopD2*. Right column indicates the minimal size of the predicted type III secretome for each strain. nd: not determined.

Fig. 2
Guy et al.

diversity in the panel of the 45 strains is high (estimated $h = 0.185$), considering that all strains belong to the same pathovar. Irrespective of the distance between markers, a very low averaged pair-wise linkage disequilibrium $R^2V=0.015$ (non corrected LD was $R^2=0.02$) was found across the genome, which was close to the expected value under complete equilibrium ($1/n=0.02$, $n=45$ strains). These results are possibly a consequence of the complex evolution of the bacterial genome, where horizontal transfer, gene duplication, gene gain and gene loss are common features. Interestingly, the two *Xcc* reference strains 8004 and ATCC33913 (clade C) shared more than 96% of marker identity whereas the strain B100 belonged to a distinct clade (A). *Xcc* strains harvested in China were present in all clades except clade E, suggestive of a worldwide and human-based expansion of those strains. Finally, clade G strains, though less closely related to the other *Xcc*, were still classified as *Xcc* based on MLSA definition established by Fargier *et al.* (26) and also because these strains caused typical black rot symptoms on cabbage and chinese radish (27). Thus, clade G strains might represent a more distant lineage of *Xcc*, which had not been reported so far in the literature.

The Spearman rho rank correlation coefficient was calculated to evaluate if the clade distribution might be consistent with life history traits of the bacteria, factors including geographical origin, host of harvest, and race. At the clade level, significant correlations were found with the country of origin ($\rho = -0.39$, $P = 0.01$) and with the race distribution ($\rho = 0.44$, $P = 0.004$). Because *Xcc* races were defined by the host range on different Brassicas, a significant clade/race correlation suggests that the host may shape the evolution of *Xcc*.

Xcc* flagellin does not elicit *FLS2*-dependent innate immunity in *Arabidopsis

The bacterial flagellin FliC and its 22-amino acid peptide, flg22, have been shown to be potent elicitors of *Arabidopsis* innate immunity. Previous studies have reported that eliciting and non-eliciting variants of flg22 were present in *Xcc* (28) and might impact the interaction with host plants. Thus, flg22 conservation in 43 *Xcc* strains and 1 *Xcr* was studied by sequencing the 5' region of *fliC*. Only two DNA haplotypes could be identified (accession numbers JX453140 to JX453183). All *Xcc* strains but HRI6185 were predicted to produce a flg22 peptide which avoids recognition by the *Arabidopsis* FLS2 receptor (Fig. S2) (28). The HRI6185 flagellin was identical to that observed in *Xcr* strain CFBP5828 and was predicted to elicit FLS2-dependent immune responses. Thus, any variation in pathogenicity that might be observed

Non eliciting Flg22

| | |
|----------------------------------|---|
| All Xcc (n=43) but HRI6185 (98%) | AQRNLNTINS S SM A L S I Q Q L SS G K R I T S A S V DAAGLAISERF [*] TTQIRGLDVASRNANDGISLAQTAEGAMVEIG N NLQRI |
| Xcc HRI6185 and Xcr CFBP5828 | AQRNLNTSSASM Q T S I Q RLSS G LRINS A K D DAAGLAISERF [*] TTQIRGLDVASRNANDGISLAQTAEGAMVEIG S NLQRI |

Eliciting Flg22

Figure S2: FliC amino-acids 14 to 92 were deduced by partial *fliC* sequencing in the 45 Xcc and 1 Xcr strains studied (Table 1). Amino-acid differences are boxed in black. Position of the Flg22 peptide potentially recognized by Arabidopsis FLS2 receptor is indicated. Eliciting and non-eliciting allelic variants of FliC are indicated including the critical residue D43 (red asterisk) essential for recognition (28).

Figure S2
Guy *et al.*

among those 42 bacterial strains should not be attributed to polymorphisms in the N terminus of *Xcc* flagellin as most strains are predicted to escape recognition by FLS2.

***Xcc* strains harbour a highly variable predicted type III secretome**

Because T3Es are globally essential for pathogenicity and are proposed to contribute to the host specificity (25, 29), we aimed at identifying and comparing the type III secretome in our panel of 45 *Xcc* strains. The genomes of the 3 sequenced strains B100, ATCC33913 and 8004 were first mined by searching by blast for homologs of known type III effectors/secreted proteins (22, www.xanthomonas.org). In parallel, plant-inducible promoter (PIP) boxes (consensus TTCG-N₁₆-TTCG) which control the *in planta* expression of a large *hrpX* regulon in *Xanthomonas* including the TTS system and numerous T3Es were searched (19, 30). Twenty-nine genes encoding 11 validated T3Es (demonstrated translocation), 15 effector candidates (predicted translocation) and 3 type III secreted proteins (no translocation evidenced) were identified. We preferred to categorize these proteins as type III secretome or type III substrate proteins (T3SP). The three *Xcc* strains have at least 25 T3SP-encoding genes in common. In addition, the closely related strains ATCC33913 and 8004 both contain *xopD2*, *xopE2* and *xopJ5* (adding up to at least 28 putative T3SP), while the strain B100 contains *xopD1* (at least 26 putative T3SP).

To investigate the natural genetic variation at these genes, PCR-based detection of both partial and full-length sequences was performed (Fig. 2). We defined a core type III secretome composed of at least 15 genes, which are present in more than 95% of the strains, and a variable type III secretome consisting of 14 genes. An accuracy rate estimated from a dot blot analysis on a subset of 10 strains for 51% of the effectome (9 genes in core effectome and 6 in variable effectome) was 99.4%, representing 1 conflict out of 150 events: a *xopX2* amplicon was present but no hybridization signal was visualized for strain CFBP5683. Minimal type III secretome size varied considerably among the strains ranging from 18 to 28 genes (average = 23). Genes encoding the variable T3SP were present on average in 58% of the strains. These results revealed an important and formerly unknown diversity of the *Xcc* type III secretome composition at the intra-pathovar level. The gene *xopX1* was only present in 31% of the strains tested while *xopD* was present with two mutually exclusive alleles, which were defined as *xopD2* (as found in *Xcv* 85-10 and *Xcc* 8004) (31) and *xopD1* (as found in *Xcc* B100) (32). We also classified the strains based on their type III secretome composition (Fig. S1B). The type III secretome composition is a good

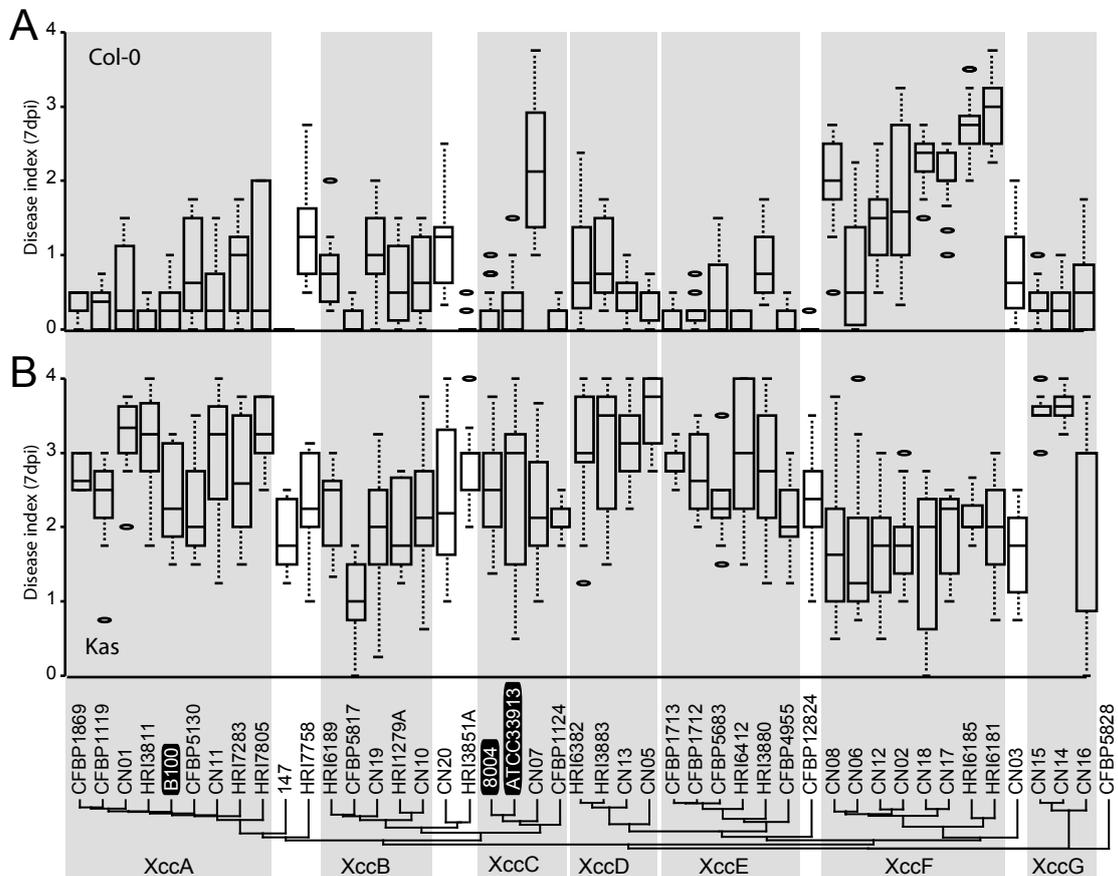


Figure S3: Boxplot representation of pathogenicity of 45 *Xcc* strains on Col-0 (A) and Kas (B) ecotypes of *Arabidopsis thaliana* was assayed by piercing in the central vein and infection symptoms scored 7 days post inoculation. Disease index indicates: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. Experiment performed at least in triplicates and 16 independent blocks. Each time at least 4 plants were inoculated on at least 3 leaves.

Figure S3
Guy *et al.*

descriptor of clades A, B, D, F and G, suggesting that it results for the most part from vertically inherited genes as observed in other phytopathogenic bacteria (e.g. *Xanthomonas axonopodis* (25) and *Pseudomonas syringae* (21)). Identical insertions of IS1478 (Insertion Sequence) in *xopAL1* in 5 strains of clade B further illustrates the vertical inheritance of T3SP. Yet, some incongruence for clades C and E was observed, indicating that horizontal gene transfer also shaped the variable type III secretome. Furthermore, the GC content of the variable T3SP genes based on the three sequenced strains was significantly lower (56.3% +/- 7; $P = 1.10^{-5}$; N=14) than the rest of the genes (65% +/- 4) or the core type III secretome (62% +/- 4; $P = 0.0054$; N=15). This result suggests the existence of a relatively recent horizontal gene transfers within the variable type III secretome. IS were observed in 5 different T3SP genes with an average frequency per gene of 7%. Insertions were predominant in the variable type III secretome (15 out of 17 insertions). Interestingly, the strain CN07 carries four genes interrupted by IS elements, which might impact its host range.

In conclusion, both type III secretomes and genomes of these *Xcc* isolates show important natural variation at the intra-pathovar level, which could be exploited for genetic approaches.

Genome-wide association study of pathogenicity of *Xcc* on *Arabidopsis*

In order to identify natural genetic variants associated with pathogenicity traits on *Arabidopsis*, we inoculated by piercing all 45 strains on both Columbia-0 (Col-0) and Kashmir (Kas) natural accessions. The aggressiveness among strains varied on each accession, from avirulence (disease index (DI) < 1) to full virulence (DI > 3), and infection outcomes were very contrasted between both natural accessions (Fig. 2, Fig. S3). A general loss of virulence cannot explain the weak aggressiveness of some strains on *Arabidopsis*: most strains were virulent on at least one host plant (13, 14, 27) and all strains carrying *avrBs1* caused a TTS-dependent hypersensitive response (HR) in resistant pepper ECW-10R indicating that their TTS system was functional (Fig. 2).

We were first interested in investigating the natural genetic variation of the strains for pathogenicity on Col-0 and Kas ecotypes at 7 days post inoculation (dpi), the time at which symptoms were the strongest. Phenotyping data quality was assessed by calculating the upper bound of the broad sense heritability (H^2) (33). We found suitable values of H^2 from our three replicates ($H^2 = 0.74$ for Col-0 and $H^2 = 0.94$ for

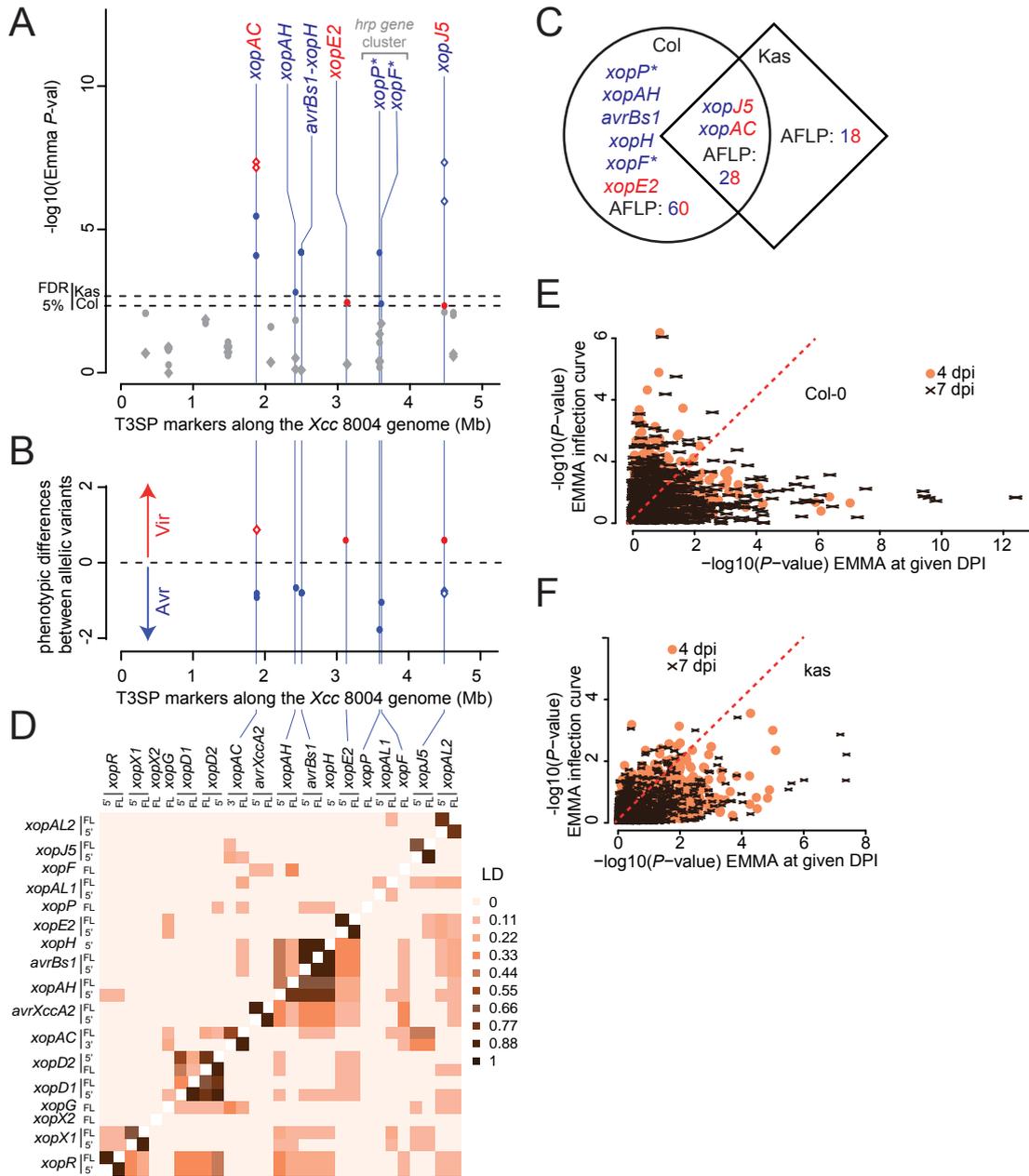


Fig. 3: Association study results 7 days after inoculation on Col (Dot) and Kas (Diamond). (A) $-\log_{10}$ of the P -values from association test among the effector markers along the chromosome of Xcc 8004 reference strain. (B) Average phenotypic differences measured between the two alleles at each significant effector. The significant markers (FDR at 5%) and their respective effects are in red (pathogenicity effect) or blue (avirulence effect). Dashed lines indicate q -values. (C) The overlap between the AFLP and T3SP markers associated with gain (red) or loss (blue) of pathogenicity in Col-0 and Kas is represented using a Venn diagram. Asterisks indicate effectors from core type III secretome. (D) Pairwise linkage disequilibrium among all effector PCR markers ($N=31$) (R^2 under the diagonal, R^2_V above the diagonal). (E, F) Comparison of P -values from association tests when using disease index at 4 and 7 dpi versus the rate of change of symptoms between days 3-7 on Col-0 (E) and Kas (F).

Kas). Genome-wide association study was performed with 30 T3SP markers (16 full length CDS, 14 5' CDS) and 929 AFLP markers. Three of the core effectome genes (*xopX2*, *xopP* and *xopF*) were included in the analysis because polymorphic amplification patterns were observed for one of the PCR markers. To limit the chance of making type I errors, a false discovery rate (FDR) of 0.05 ($P = 0.0026$ for Kas, $P = 0.0058$ for Col-0) was used. Non-parametric Wilcoxon rank tests with FDR correction at 5% were also performed assuming non-normal distribution. These tests showed 100% and 82% of congruent significant markers with the efficient-mixed model for Col-0 and Kas data, respectively.

With a FDR value of 0.05, 99 (11 T3SP markers/88 AFLP) and 50 (4 T3SP markers/46 AFLP) significant variants for each trait at a threshold of 7 dpi were detected on Col-0 and Kas, respectively (Fig. 3A and D, Fig. S4A, Table S2). Pairwise linkage disequilibrium (LD, defined as any non-random association between markers) was estimated among all significant markers (average LD $R^2V=0.06$) (Fig. 3C, Fig. S5). No complete linkage between T3SP and AFLP markers was observed, suggesting that more DNA variants other than the currently known T3SP in the genome were detected. These markers with known physical position based on the reference strain 8004 presented an average LD value of 0.14, much higher than average LD observed for all markers ($R^2V=0.015$) (Fig. 3C). This result may suggest some epistatic interactions between the T3SP loci or their simultaneous acquisition in the genome.

The effectors *xopAC* (also called *avrAC*) and *xopJ5* on Kas and *xopAC*, *avrBs1*, *xopP*, *xopH*, *xopJ5*, *xopF*, *xopE2* and *xopAH* on Col-0 (Fig. 3A and B) were significantly associated with variation in pathogenicity at 7 dpi. All these T3E markers were fairly common (with a maf between 18 and 49%), except *xopF* (9%) and *xopP* (4%). The contribution of these T3E loci to the pathogenicity in Arabidopsis was previously unknown except for *xopAC* (34). However one has to be cautious in interpreting these results with a sample size of 45 strains. Sufficient statistical power (~80%) can only be reached for QTL (Quantitative Trait Loci) of very large effect, which explain more than 50% of the total phenotypic variance (3). When we consider a more stringent nominal significance threshold at 10^{-5} , only 6 markers are significant on Kas (including the effectors *xopAC* and *xopJ5*) and 25 markers are significant on Col-0 (including *xopAC*). The direction and size of the effects estimated from the difference between the mean phenotypic values of the two alleles at each locus are presented in Fig. 3B and Fig. S4B. More effects are associated with increased pathogenicity on

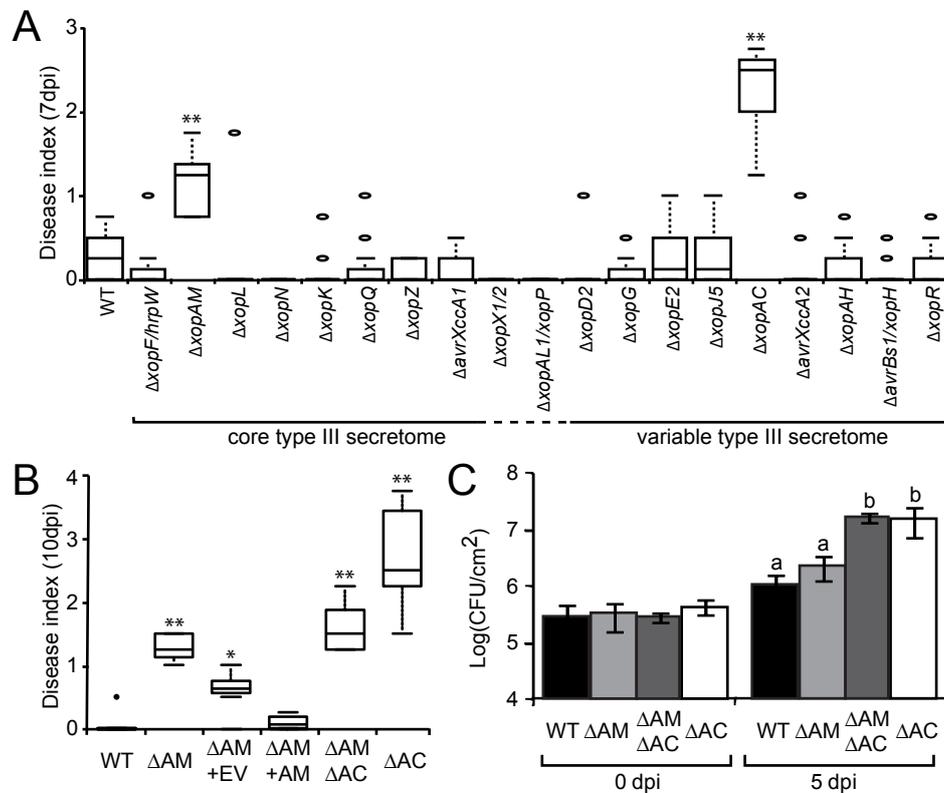


Fig. 4: Pathogenicity of T3SP mutants in *Xcc* strain 8004 inoculated on *Arabidopsis* plants of the Col-0 ecotype. (A,B) Bacteria were inoculated by piercing in the central vein and infection symptoms scored over 10 days. Disease index indicates: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. Boxplot representation of symptoms: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. (A) Inoculation of deletion mutants. (B) Complementation of the *xopAM* mutant (ΔAM) by pFAJ1700-*xopAM* ($\Delta AM+AM$) and phenotypes of the double *xopAM-xopAC* deletion mutant ($\Delta AM\Delta AC$) and *xopAC* mutant (ΔAC). EV: empty vector. Statistical analysis was performed using a Tukey HSD test (**, $P < 0,001$; *, $P < 0,05$). (C) Wild-type (WT) *Xcc* strain 8004 and its deletion mutant derivatives in *xopAM* (ΔAM), in *xopAC* (ΔAC) and in *xopAM-xopAC* ($\Delta AM\Delta AC$) were inoculated by piercing in leaves of Col-0 plants at a bacterial density of 10^8 cfu/ml. *In planta* bacterial populations around the inoculated areas were determined 0 and 5 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on three independent experiments with three samples of two leaf discs from different plants for each strain. Statistical groups identified using a Wilcoxon test ($P < 0,01$) are indicated by different letters.

Col-0 than on Kas ($Chi^2 = 5$, $P = 0.03$), and the intensity of virulence effects was higher on Col-0 than on Kas (Wilcoxon test, $W = 162$, $P = 8.3 \cdot 10^{-6}$). Also, the intensity of the virulence effect was higher than avirulence effects on Col-0 (Wilcoxon test, $W = 1657$, $P = 0.0002$). Interestingly, the markers significantly associated with *Xcc* pathogenicity in Col or Kas are essentially different with only 26% of the markers being common to both responses (Fig. 3D). These 30 markers include *xopJ5* and *xopAC* loci. Interestingly both showed opposite effects between the two plants, e.g. *xopAC* contributes to pathogenicity on Kas but is associated with a reduced pathogenicity (i.e. avirulence) on Col-0 and vice-versa for *xopJ5*. Thus, these findings illustrate the dual roles of effectors, which depend on host genotype.

Second, the disease curves (from 0 to 7 dpi) were analyzed using a logistic function and we used the time at inflection point of the fitted model as a quantitative trait. Only three significant markers on Col-0 were detected and none on Kas. The correlations between the results from the first model at 4 and 7 dpi and the logistic function analysis are showed in Fig. 3E and F and Table S3. We did not find any common significant marker between the two analyses, suggesting the logistic function model might reveal different variants associated with the rate of symptom evolution.

A reverse genetics approach indicates that *xopAM* confers partial avirulence to *Xcc* 8004 on Arabidopsis ecotype Col-0

We assessed the contribution to pathogenicity of the predicted T3SP genes of *Xcc* 8004 by constructing single or double T3SP gene deletions: all 28 genes were studied except *xopAL2*, *xopA*, *hpaA*, *avrBs2* and *xopAG* from the core type III secretome. Col-0 and Kas plants were inoculated with each mutant (Fig. 4, Fig. S6). No significant effect was observed on Kas plants (Fig. S6A). Only the $\Delta xopAC$ and $\Delta xopAM$ mutants showed a significantly increased aggressiveness on Col-0 compared to wild-type strain and all other mutants, (Tukey HSD tests, $P < 10^{-12}$ for all significant comparisons, Fig. 4A). Both mutant phenotypes could be complemented (Fig. 4B, Fig. 5C). These results indicate that *xopAC* and *xopAM* contribute to the avirulence of *Xcc* 8004 on Col-0. Yet, *xopAM* seems to confer a limited avirulence on Col-0 (average mean difference $\Delta xopAM - wt = -1.25$) compared to *xopAC* ($\Delta xopAC - wt = -2.25$, Fig. 4B). Interestingly, the double mutant $\Delta xopAC/xopAM$ behaved like the *xopAM* mutant so that the *xopAM* mutation was epistatic on the *xopAC* mutation in terms of symptoms development. Yet, bacterial growth of the *xopAM* deletion mutant *in planta* was not significantly increased in Col-0 leaves in contrast to the $\Delta xopAC$

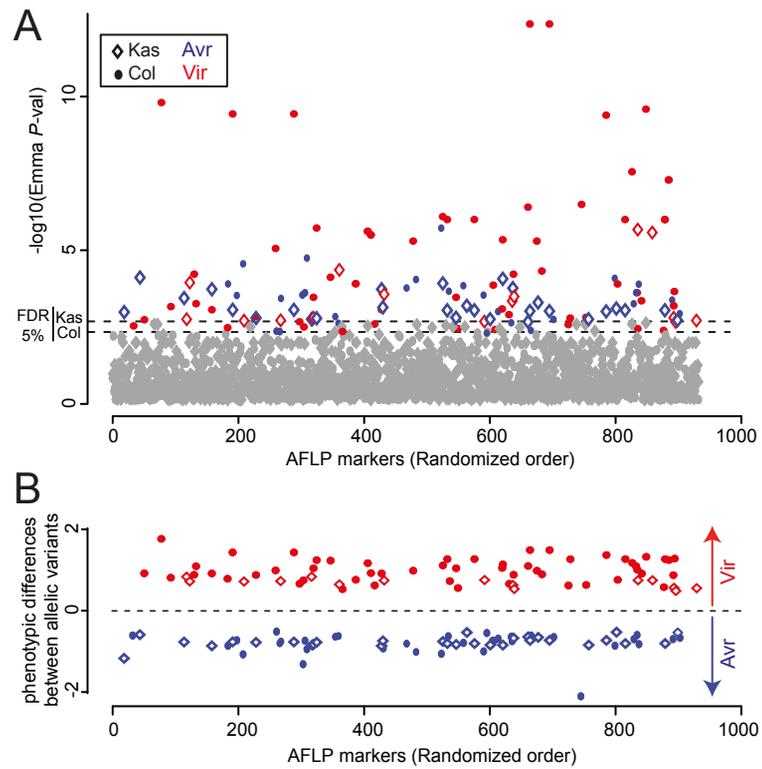


Figure S4: Association study results 7 days after inoculation on Col (dot) and Kas (Diamond). (A) $-\log_{10}$ of the P -values from association test among the AFLP markers (randomized ordered along the x axis). (B) Average phenotypic differences measured between the two alleles at each significant AFLP marker. The significant markers (FDR at 5%) and their respective effects are in red (pathogenicity effect) or blue (avirulence effect). Dashed lines indicate q -values.

Figure S4
Guy *et al.*

and $\Delta xopAC/\Delta xopAM$ mutants (Fig. 4C). In conclusion, the conserved effector XopAM is a novel determinant of *Xcc* 8004 avirulence on Col-0 which does not affect bacterial growth in the conditions tested.

Natural genetic variation at the *xopAC* locus

Our association data based on presence or absence of *xopAC* suggest that all *xopAC* allelic variants are able to confer avirulence to *Xcc* on Col-0. We thus sequenced the *xopAC* locus for the 29 *xopAC*-containing *Xcc* strains (Fig. 5A, accession numbers JX453111 to JX453139). Sequencing data covered 473 bp upstream of the annotated start to 53 bp after the stop codon. 7 bi-allelic SNPs were identified: 2 in the *cis*-regulatory regions and 5 non-synonymous substitutions in *xopAC* coding sequence. The XopAC protein is composed of a N-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain and a C-terminal filamentation induced by cAMP (Fic) domain. Four out of these five substitutions occur in the Fic domain and none in the LRRs (Fig. 5A and B). Yet, core residues of the fic domain were absolutely conserved suggesting that these polymorphisms should not abolish enzymatic functions of the four XopAC haplotypes (A to D; Fig. 5). The haplotype B (20 out of 29 occurrences) is present throughout the phylogenetic tree (Fig. 2). The haplotype D was exclusively found in 4 Chinese strains, but Chinese strains also expressed XopAC of the B and C haplotypes. The haplotype C was also found in *Xcr* strain CFBP5828. In order to test the functionality of all four haplotypes, complementation tests were performed in *Xcc* 8004 $\Delta xopAC$. Strains were inoculated on Col-0 plants (Fig. 5C). While *xopAC*-deleted strains were virulent, all four complemented mutants were able to confer avirulence to *Xcc* 8004 $\Delta xopAC$ to a similar extent ($P < 0.001$). The same complementation tests on Kas did not reveal any significant variation of pathogenicity (Fig. 5E). These experiments indicate that all four XopAC haplotypes are functionally equivalent for their avirulence function on ecotype Col-0.

These sequences were then used to perform association tests on haplotype variants of *xopAC* sequence (N=28 strains). A significant haplotype effect was evidenced on both plants at 7 dpi ($P = 7.451e-09$ on Col-0 and $P = 0.00149$ on Kas). Association test for the SNP effect showed one significant association with Kas for the nonsynonymous SNP I409V present in the Fic domain ($P = 0.009$ and $P = 0.03$ using mixed model and non-parametric tests, respectively). The substitution from V (minor allele) to I was associated with a decrease of DI. Pair-wise linkage disequilibrium at the locus is intermediate (average R^2V of 0.26; Table S4).

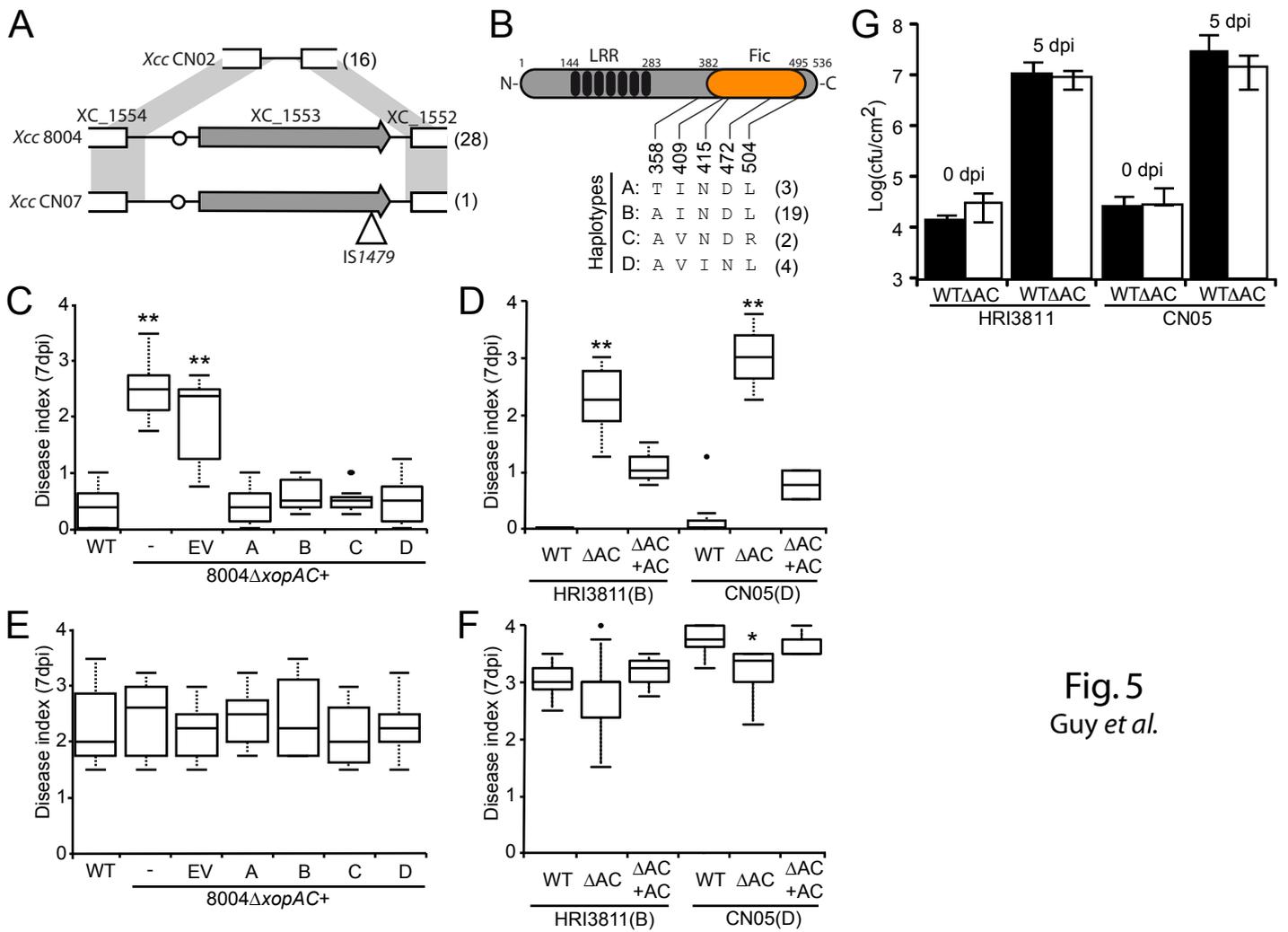


Fig. 5
Guy et al.

Fig. 5: *xopAC* sequence diversity and functionality of the different XopAC haplotypes. (A) Schematic representation of the XC_1552/XC_1554 locus in *Xcc* strain 8004 and orthologous regions in strains CN02 and CN07. Arrows indicate *xopAC* and circle the PIP box promoter element. IS1479 (triangle) is inserted at the 3' end of *xopAC* coding region in strain CN07. Haplotype occurrence is indicated in brackets. (B) Schematic illustration of XopAC functional domains: N-terminal leucine-rich repeats (LRR) and C-terminal Fic domain (filamentation induced by cAMP). Numbers indicate domain borders. The different polymorphisms shared by at least two XopAC haplotypes are represented and their position within XopAC indicated. Four haplotypes (A-D) can be distinguished in *Xcc* and their occurrence in the 29 *xopAC*-containing strains is indicated in brackets. (C-F) Functionality of the different XopAC haplotypes was tested by inoculations on Col-0 (C, D) and Kas (E, F) natural accessions of *Arabidopsis*. Disease symptoms were scored at 7 dpi. Each inoculated leaves were individually scored as: no symptoms=0, weak chlorosis surrounding the wound sites=1, strong V-shaped chlorosis=2, developing necrosis=3, leaf death=4. The represented average disease scored and the standard deviations were calculated from the values of four plants with four inoculated leaves per plant. Experiments were reproduced at least 3 times. (C, E) Complementation of the strain 8004Δ*xopAC* with the pCZ917 empty vector (EV) containing the respective haplotypes of *xopAC* as defined in (B). (D, F) Deletion of *xopAC* was obtained in Rif^R derivatives of HRI3811 and CN05 strains (ΔAC) and complemented with pCZ917 carrying the haplotype A of *xopAC* (ΔAC+AC). *Xcc* genotypes are indicated below the graph and the haplotype of the endogenous *xopAC* is indicated in brackets. Statistical analysis was performed using a fixed effect model and a Tukey HSD test (**, $P < 0,001$; *, $P < 0,05$). (G) Wild-type (WT) and *xopAC* deletion mutant (ΔAC) of *Xcc* strains HRI3811 and CN05 were inoculated by piercing in leaves of Col-0 plants at a bacterial density of 10^8 cfu/ml. *In planta* bacterial populations around the inoculated areas were determined 0 and 5 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on three independent experiments with three samples of two leaf discs from different plants for each strain. Statistical groups identified using a Wilcoxon test ($P < 0,01$) are indicated by different letters.

Since the four haplotypes seem functionally equivalent in conferring avirulence to *Xcc* 8004, either the detected association is not causal or there are other haplotype-specific genetic factors interacting, which are absent/present from *Xcc* 8004 genetic background.

Visualisation of *xopAC* virulence functions in *Arabidopsis* depend on *Xcc* strain genotype.

To test these latter hypotheses, *xopAC* deletion was also created in two other *Xcc* strains (HRI3811 and CN05), which differ in the composition of their variable type III secretome. Again, the deletion event rendered the strains virulent on Col-0 with the same phenotypic differences as previously observed (Fig. 5D), demonstrating that haplotypes B and D in their respective background are functional ($P < 0,001$). The insertion of haplotype A in both deleted strains rescued the avirulent phenotype (Fig. 5D). On Kas, CN05 $\Delta xopAC$ (but not HRI3811 $\Delta xopAC$) was weakly but significantly less aggressive than its wild type ($P = 0,01$ and $\text{diff} = -0,58$; Fig. 5F), suggesting that in this particular genetic background we may observe a significant contribution of *xopAC* to pathogenicity. Interestingly, CN05 is a very virulent strain with only 5 predicted variable T3SP. To study this phenotype further, *in planta* bacterial populations of the *xopAC* mutants were measured in Kas leaves inoculated by piercing. At 5dpi, the $\Delta xopAC$ mutation did not affect significantly the growth of strains HRI3811 and CN05 (Fig. 5G). Thus, the virulence role of *xopAC* on Kas could be visualized by forward genetics in one but not two other *Xcc* strains and for symptoms development but not *in planta* growth. This suggests that *xopAC* contribution to pathogenicity might be masked by some genetic background effects in several strains due to functional redundancy or slightly different virulence strategies.

Discussion

***Xcc* genetic diversity was unsuspected based on the available reference genomes**

In this study we observed substantial genetic and phenotypic variation in our collection of *Xcc*, likely illustrating the potential of adaptation of the species to infect different hosts and to adjust to environmental heterogeneity. A world collection of 45 *Xcc* strains collected over 55 years mostly on diseased *Brassica oleracea* and *rapa* was gathered. Their identification as *Xcc* was confirmed by MLSA. Yet, robust phylogenetic relationships could only be inferred from detailed AFLP analysis, which generates marker throughout the genome. This approach clearly identified one

coherent genomic group encompassing all *Xcc* strains. It also unraveled a significant level of genetic diversity and a low LD among markers suggesting that recombination could be common in *Xcc* population. Another explanation for a low LD could be a high level of HGT and insertion-deletions (indels). Clade G strains seem quite distinct at the genomic level from other *Xcc* clades. Yet, those strains were unambiguously identified as *Xcc* by MLSA and caused typical black rot symptoms Chinese radish (27). Thus, clade G might represent an uncharacterized group of *Xcc* for which genome sequence data would be very informative. Interestingly, *Xcc* phylogeny was only partially accounted for by the geographic origin of the strains. For instance, Chinese strains (CN) were distributed in all *Xcc* clades but one, which suggests an efficient introduction in China of strains from worldwide origin or vice versa. Finally, we also observed that the two *Xcc* reference strains 8004 and ATCC33913 are very closely related and both belong to clade C while *Xcc* B100 belonged to clade A. Thus, these three *Xcc* reference genomes are not representative of the natural diversity of this pathogen. Whether this diversity originates from large indels, gene gain or gene loss, SNPs or the presence of plasmid would have to be determined by whole genome sequencing.

High diversity of the type III secretome composition is observed within *Xcc*

The type III secretome predictions performed in *Xcc* can only provide an estimate about effectome minimal size. It varied from 18 type III substrates for strain CFBP12824, up to 28 for the strains 8004, ATCC33913 and HRI3851A. We did not find a significant correlation between the type III secretome size and aggressivity on Kas ($P = 0.32$, $\rho = 0.15$). Genetic diversity observed among *Xcc* suggests that genome sequencing could unravel other T3SP, which are absent from the genomes of the 3 *Xcc* reference strains or other *Xanthomonas* pathovars (12). Furthermore, no systematic experimental T3SP mining has been reported in *Xcc* yet. Thus, the size and composition of these type III secretomes are likely underestimated: *Xcc* type III secretome sizes are increasing compared to earlier estimates (20 T3SP in *Xcc* ATCC33913) (22) and are now in the range of many other *Xanthomonas* (20 to 34 non-TAL T3Es) (22, 35) and *P. syringae* pathovars (9 to 39 Hop) (21). Only functional screens and analyses of the complete genomes would fully uncover *Xcc* type III secretome as done in *X. axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (35).

Interestingly, *Xcc* type III secretome is very polymorphic: *Xcc* core type III secretome is essentially identical to *Xanthomonas* core type III secretome (22). Within the

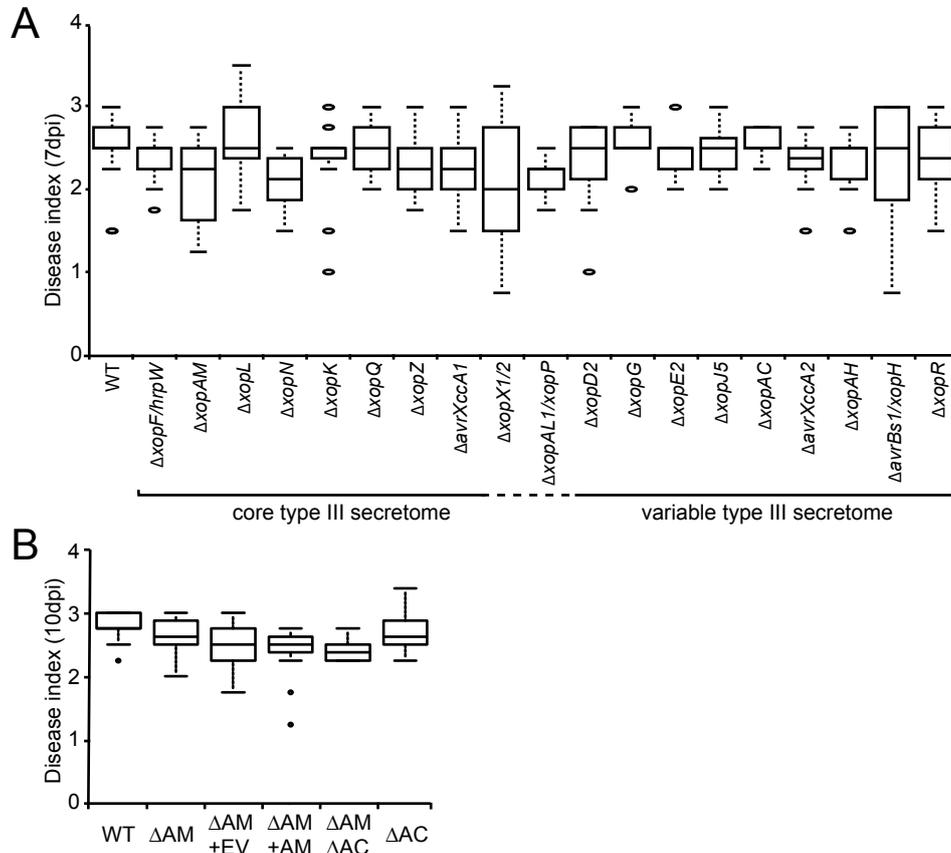


Figure S6: Pathogenicity of T3SP mutants in *Xcc* strain 8004 10 days post inoculation of *Arabidopsis* plants of the Kas ecotype. Bacteria were inoculated by piercing in the central vein and infection symptoms scored over 10 days. Disease index indicates: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. Boxplot representation of symptoms: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. (A) Inoculation of single mutants. (B) Complementation of the *xopAM* mutant (ΔAM) by pFAJ1700-*xopAM* ($\Delta AM+AM$) and phenotypes of the double *xopAM-xopAC* deletion mutant ($\Delta AM\Delta AC$) and *xopAC* mutant (ΔAC). EV: empty vector. Statistical analysis was performed using a Tukey HSD test (**, $P < 0,001$; *, $P < 0,05$).

variable type III secretome, XopD is present under two variants XopD1 and XopD2, which differ in their N-terminal extension and which distribution is mutually exclusive. Importantly, it was recently reported that both isoforms are not functionally equivalent (36). These observations of high type III secretome diversity at the pathovar level are in agreement with other recent observations in *Xam* or in *P. syringae* pv. *avellanae* (35, 37). These observations contrast with earlier work performed in *X. axonopodis* where little variation in type III secretome composition was observed at the pathovar level (25). Both vertical and horizontal inheritances of T3SP in *Xcc* are suggested by our analysis: On the one hand, IS1478 insertion in *xopALI* throughout clade B does indicate that vertical inheritance of T3SP plays a role in *Xcc*. On the other hand, low GC content of the variable type III secretome of *Xcc* 8004 and variability of type III secretome within genomic clades (e.g. XccE) suggest the occurrence of horizontal gene transfers (Fig. 2).

Genome-wide approach on *Xcc* to identify pathovar-relevant rather than strain-specific pathogenicity determinants

The observed genomic diversity among these 45 *Xcc* strains indicates that the three reference genomes are not representative of the natural *Xcc* diversity. Thus, some of the knowledge acquired on those three strains might not be transferrable to many other *Xcc* strains and could have a limited interest to understand *Xcc* biology and pathogenicity evolution. Similarly, several biologically relevant processes might be ignored because absent from those three strains.

GWA was performed on candidate genes and AFLP markers, leading to the identification of 117 significant markers with low LD. These results suggest that *Xcc* pathogenicity is controlled by many genetic determinants rather than by a few factors. However, these findings are not contradictory with the hypothesis that a proportion of these genetic determinants could be located within genomic islands as observed in *P. syringae* and *P. viridiflava* (5, 38). Genomic islands can indeed harbor many loci acquired independently via HGT. The exact coverage of our study is unfortunately unknown. Assuming a random distribution of the 929 AFLP markers on *Xcc* genome (average LD = 0.015), we would have a marker every 5,5 kb (*Xcc* 8004 genome is ~ 5.15Mb). However this estimate is highly unlikely because of the poor correspondence between LD and chromosomal distance in bacterial genomes. With only 45 strains and a low LD among markers across the genome, our GWA certainly lacks some statistical power so that true associations are likely being missed. In best-

case scenarios, only QTL with large effects can be identified (3, 39). In further studies, using larger sample size and genome data should greatly improve this GWA approach, confirm how many of the detected associations are true ones and detect variants associated with smaller phenotypic effects. Presence of a T3SP does not preclude functionality and whole genome data will have the advantage of studying polymorphisms within T3SP sequences. For instance, a significant haplotype effect at the *xopAC* locus was detected and could be pinpointed to one SNP corresponding to amino acid position 409 located in the Fic domain. This polymorphism was associated with a change in both avirulence on Arabidopsis ecotype Col-0 and pathogenicity on Kas. It might be worth testing thoroughly by site-directed mutagenesis on the chromosome itself whether it impacts *xopAC* virulence and avirulence functions in several *Xcc* strains.

Functional validation of these associations between T3SP presence and increased aggressiveness was tested experimentally in single or double deletion mutants in *Xcc* 8004. Except for *xopAC*, none could be confirmed because either the effect is too small to be detected with the current patho-assay or the T3SP gene is not the causal determinant of the association but a linked polymorphism. Alternatively, *Xcc* 8004 genetic background might mask these subtle virulence effects. In support of this later hypothesis, *xopAC* virulence functions on Arabidopsis could only be observed for strains CN05 (ecotype Kas) and B186 (Col-0) (34) but not strains HRI3811 and 8004. Both strains B186 and CN05 have in common to be highly aggressive on Arabidopsis and CN05 has one of the smallest predicted effectome of the 45 *Xcc* strains studied here. Yet, *xopAC* virulence functions on cabbage were easily detected in *Xcc* 8004 (34) suggesting that these genetic background effects are both strain- and host-specific. Detecting avirulence functions can also be problematic since many effectors suppress ETI themselves as observed in *P. syringae* (40) or *X. axonopodis* (41). The effect of such suppressors may explain why we did not validate *xopJ5* avirulence function on Arabidopsis ecotype Kas in strain 8004. Finally, our results show differences in intensity and direction of effects of markers depending on the plant genetic background, suggesting these bacterial genes meet different proteins/networks in the plant. All these observations suggest that complex genetic interactions might complicate the validation of the GWA results and that mutational approaches should be performed in multiple strains to make solid conclusions.

Avirulence of *Xcc* 8004 on Col-0 is mediated by both *xopAC* and *xopAM*

XopAC avirulence role in *Xcc* strain 8004 was well known from previous studies (23). Our association studies confirmed that *xopAC* is a major avirulence gene in *Xcc* natural isolates and suggests that the 4 haplotypes are functionally equivalent in respect of their avirulence properties. Protein sequence alignments showed that the LRR necessary for interaction to potential substrates such as RIPK and BIK1 (34) are highly conserved. Only a few polymorphisms were identified around the Fic region without affecting the Fic consensus motif important for uridylylation of substrate proteins. The avirulence function of these four haplotypes was confirmed on Col-0 by deletion and complementation approaches. Importantly, XopAH (also called AvrXccC), a T3E of the fido family (like XopAC) (42), did not confer avirulence in our assays in contrast to published results with the same strain (43) and it was only weakly associated to avirulence on Col-0 in GWA studies at the population level. Thus, this GWA analysis confirms that *xopAC* is the major determinant of avirulence on Arabidopsis Col-0 for *Xcc*.

Yet, conserved-invariable genes are not amendable to GWA studies and conserved T3SP were studied by reverse genetics in *Xcc* 8004. This approach revealed an avirulence function on Col-0 for the conserved effector gene *xopAM* which adds up to its known pathogenicity function on Chinese radish (10). Thus, *xopAM* is a prime target for breeding resistance into Brassicaceae. XopAM is a 2049-amino acid protein highly conserved in *Xcc* with homologies to HopR1 from *P. syringae*. This T3E belongs to the AvrE/DspA/E/HopR family of effector, which is widely distributed in type III-containing phytopathogenic bacteria (44). *dspA/E* was shown to be essential for *Erwinia amylovora* virulence (45). In *N. benthamiana*, *hopR1* was also shown to be important for suppression of callose deposition and growth of a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant with compromised pathogenicity (44). Virulence targets of members of the AvrE/DspA/E/HopR are yet unknown. Interestingly, the *xopAM* mutation was epistatic on the *xopAC* mutation for virulence but not bacterial growth. Several scenarios could be proposed to explain such observations. For instance, both *xopAM* and *xopAC* could have avirulence activity and epistasis could explain the reduced virulence of the double mutant. Yet, such virulence functions are not visible in the susceptible ecotype Kas (Fig. S6) and other Arabidopsis genotypes should be tested to exclude genotype-specific susceptibility in Kas vs. Col-0. Alternatively, *xopAM* and *xopAC* might suppress recognition of a yet-unknown avirulence gene on Col-0 similar to the suppression of *avrBs1*-dependent HR on pepper by *avrBsT* in *Xav* (41). Obviously, prime candidates are the T3E genes identified in our GWA analysis.

Table S1: Genotype and origin of natural strains of *Xanthomonas campestris* used in this study.

| Strains (Other names) | Race ^a | Plasmids (kb) | Allelic profiles ^b | Isolation ^c | | Reference or source ^d |
|---|-------------------|-----------------|-------------------------------|--|-------------|----------------------------------|
| | | | | Host | Country | |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | | | | | | |
| 147 (HRI3964) | 4 | nd ^f | 6-1 | <i>B. oleracea</i> | Brazil | - |
| 8004 (LMG8004, HRI3961, NCPPB1145) | 9 | - | 6-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | UK | 1912 (62) |
| ATCC33913 (CFBP5241, LMG568) | 3 | - | 6-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> | UK | 1957 (9) |
| B100 | - ^e | - | 6-1 | - | - | - (11) |
| CFBP1119 | 1 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | France | 1967 CFBP |
| CFBP1124 (LMG8032) | 8 | 35 | 6-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | France | 1967 CFBP |
| CFBP12824 | 2 | nd | 6-12 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | Netherlands | - CFBP |
| CFBP1712 (LMG8034) | 5 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | France | 1975 CFBP |
| CFBP1713 | 5 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | France | 1975 CFBP |
| CFBP1869 (LMG8035) | 1 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Ivory coast | 1976 CFBP |
| CFBP4955 | 9 | 180 | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Belgium | 1999 CFBP |
| CFBP5130 (SNES3430) | 7 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> | - | 2000 CFBP |
| CFBP5683 | 3 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> | France | 1979 CFBP |
| CFBP5817 (Clause 658pCS1) | 4 | 32 | 4-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Chile | 2001 CFBP |
| CN01 | - | nd | 6-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN02 | - | nd | 6-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN03 | - | 70 | 6-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN05 | - | 180 | 6-10 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN06 | - | 105 | 6-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN07 | - | 39 | 6-10 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN08 | - | 50 | 6-1 | <i>R. sativus longipinnatus</i> | China | 2002 (27) |
| CN10 | - | 35 | 4-10 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2002 (27) |
| CN11 | - | 35 | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | China | 2002 (27) |
| CN12 | - | nd | 6-1 | <i>B. napus</i> subsp. <i>oleifera</i> | China | 2002 (27) |
| CN13 | - | 195 | 6-10 | - | - | - (27) |
| CN14 | - | 20/50 | 4-1 | <i>B. juncea</i> var. <i>foliosa</i> | China | 2003 (27) |

Yet, many other hypotheses could be envisaged for the moment, but only detailed genetic and biochemical analyses will resolve these questions in the future.

This genome-wide association study on a bacterial plant pathogen evidences the relevance of using complementary multi-disciplinary approaches: GWA has its advantages but also its own limitations which have to be filled with other classical strain-specific genetic approaches. With the decreasing cost of whole-genome sequencing and genotyping, such generic GWA studies could allow us to dissect our favorite biological questions with new perspectives and broader relevance.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Xcc strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. *Xcc* cells were grown at 28°C in MOKA medium (46). *Escherichia coli* cells were grown on Luria-Bertani medium at 37°C. For solid media, agar was added at a final concentration of 1.5% (w/v). Antibiotics were used at the following concentrations: for *Xcc*, 50 µg/ml rifampicin, 50 µg/ml kanamycin, and 5 µg/ml tetracycline; for *E. coli*, 50 µg/ml ampicillin, 25 µg/ml kanamycin, 40 µg/ml spectinomycin and 10 µg/ml tetracycline. Spontaneous rifampicin-resistant derivatives of *Xcc* HRI3811 and CN05 were selected on MOKA rifampicin.

Plant material, growth conditions and infection tests

Arabidopsis plants were grown on Jiffy pots in a growth chamber at 22°C, with a 9-h light period and a light intensity of 192 µmol.m⁻².s⁻¹. Natural variation of *Xcc* pathogenicity was assayed on the *A. thaliana* natural accessions Columbia and Kashmir, by piercing inoculation of bacterial suspension at 10⁸ cfu/mL as described (47). Each of the 45 strains was tested on 4 plants per ecotype and 4 leaves per plant. Three independent repetitions were done in 16 blocks. After inoculation, plants were covered by a plastic film and kept at nearly 100% relative humidity. Disease development was scored from 3 to 7 dpi using a disease index ranging from 0 (no symptom), to 4 (full leaf necrosis) as described (47). Single deletion mutants and complemented strains in *Xcc* 8004, HRI3811 and CN05 background were tested on Col-0 and Kas using 4 plants and 16 leaves in 3 independent replicates. Annotations were done at 3 to 10 dpi (Fig. 4C and D). Nonhost ECW-10R pepper plants were

| | | | | | | | |
|--|----|--------|------|---|--------------|------|------|
| CN15 | - | 20/50 | 4-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i> | China | 2003 | (27) |
| CN16 | - | 20/50 | 4-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> | China | 2003 | (27) |
| CN17 | - | nd | 6-1 | <i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i> | China | 2003 | (27) |
| CN18 | - | 50 | 6-1 | <i>B. juncea</i> var. <i>foliosa</i> | China | 2003 | (27) |
| CN19 | - | 35 | 4-1 | - | - | - | (27) |
| CN20 | - | 180 | 4-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> | China | 2003 | (27) |
| HRI1279A | 4 | 37 | 4-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | UK | 1984 | (13) |
| HRI3811 (P. Williams; PHW1205) | 1 | 35 | 6-1 | <i>B. oleracea</i> | USA | - | (13) |
| HRI3851A (C. Grimm; Xcc168) | 3 | nd | 6-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Greece | 1989 | (13) |
| HRI3880 (NCPBP2986) | 5 | 70 | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | Australia | 1975 | (13) |
| HRI3883 (NCPBP1946) | 5 | 210 | 6-10 | <i>R. sativus</i> | USA | 1966 | (13) |
| HRI6181 (J. Vicente; Xcc551) | 6 | 50 | 6-1 | <i>B. rapa</i> | Portugal | 1996 | (13) |
| HRI6185 (J. Vicente; Xcc555) | 6 | nd | 6-1 | <i>B. rapa</i> | Portugal | 1996 | (13) |
| HRI6189 (J. Vicente; Xcc559) | 4 | nd | 4-10 | <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> | Portugal | 1996 | (13) |
| HRI6382 (NCPBP1711) | 5 | 195 | 6-10 | <i>B. rapa</i> | Canada | 1953 | (13) |
| HRI6412 (D. Silué; 1713) | 3 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | France | 1997 | (13) |
| HRI7283 | 1 | 37/195 | 6-1 | cruciferous weed | UK | 1997 | (13) |
| HRI7758 | 4 | nd | 4-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>trunchuda</i> | Brazil | 1999 | (13) |
| HRI7805 (K. Serfontein; BD102) | 1 | nd | 6-1 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | South Africa | 1998 | (13) |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> | | | | | | | |
| CFBP1228 | 3R | nd | 4-3 | <i>Raphanus sativus</i> | USA | - | CFBP |

^a as determined (13, 14)

^b according to the haplotypes defined (26)

^c host plant, country and year of isolation

^d CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; HRI-W, Horticulture Research International, Wellesbourne, UK.

^e unknown

^f Estimated plasmid sizes in kb; -: absent; nd: not detected.

grown and inoculated at OD_{600nm} 0.4 as described (48). HR was scored 36 hour post infiltration.

Detection and analysis of endogenous *Xcc* plasmids

Plasmids were isolated from overnight cultures in liquid Moka medium as described (49) and resolved by electrophoresis on a 0,7% agarose gel. Plasmids pXCV2, pXCV19, pXCV38 and pXCV183 isolated from *Xcc* 85-10 were used as size makers to estimate the size of *Xcc* plasmids.

PCR-based detection of T3E genes in *Xcc* strains and dot blotting

Two genomic DNA (gDNA) extractions were prepared independently for each strain as described by manufacturer (50) and used either for dot blot or PCR analyses. The presence of T3E genes was determined using 2 pairs of gene-specific primers designed from the *Xcc* 8004 orthologous sequence except for small genes such as *xopA*, *xopG* and *xopH*. For each gene, one of the primer pairs amplified the full-length T3SP DNA sequence, while the other one amplified a shorter sequence of ca. 300bp usually in the 5' coding region. All oligonucleotide sequences are available upon request. A reaction was considered positive (presence of the gene) if a single clear band with the expected size was observed after separation on 1 % agarose gel. Dot blot hybridizations were performed on a subset of genes (N=15) for 10 strains with the probe set and hybridization conditions described in (25). The estimated accuracy rate from consistency over replicated experiments and internal controls is ca. 99,4%.

Determination of *in planta* bacterial populations.

Six leaves from different plants were inoculated by piercing with an *Xcc* suspension of 10⁸ cfu/ml. Three pools of two leaf discs encompassing the inoculated zones were sampled using a cork borer (Area = 0.33 cm²) at 0 or 5 days after inoculation. Fresh tissues were homogenized in 200 µl sterile water. Serial dilutions of the homogenates were performed and a 5 µl drop was spotted for each dilution on plates supplemented with appropriate antibiotics. The plates were incubated at 28°C for 48 h and colonies were counted in spots containing 1 to 30 colonies. Experiments were performed at least three times.

Sequencing of T3SP genes, *fliC* fragment and sequence data analysis

xopAC locus and *fliC* 5' region were PCR amplified from genomic DNA using primers LN191/LN193 and LN625/LN626, respectively (sequences are available upon request). During PCR-based detection of T3E genes, single amplicons with an unexpectedly large size were excised from the gel and revealed the presence of IS elements in several T3E genes. After purification (Wizard SV Gel and PCR clean-up purification kit, Promega), each amplicon was sequenced and analyzed using Geneious software (Biomatters, New Zealand).

Average GC content of core and conserved type III secretome was calculated from GC content of each T3SP CDS as inferred from Geneious and compared to whole genome GC content.

***X. campestris* pv. *campestris* genotyping**

In order to confirm that all strains from our working collection were indeed *Xcc*, we performed a MLSA analysis with the *efp* and *glnA* amplicons as described (26).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) with the *SacI* and *MspI* restriction enzymes of *Xcc* gDNA was performed as described (51). One selective nucleotide was used on each adapter-specific primer. All 16 possible primer combinations but *Sac*+T/*Msp*+C were used. The presence/absence of DNA fragments was determined using GeneMapper (Applied Biosystems, CA) with the following criteria: size between 60 and 500bp; peak area > 1000; peak high > 800 relative fluorescence units, no signal in negative controls.

Phylogeny and molecular evolutionary genetics

Phylogenetic distances among strains were estimated from AFLP marker data using Dice similarity indices with 5000 bootstraps. The Dice coefficient of similarity among strains was used to construct a weighted neighbor-joining tree using Darwin software package (version 5.0.158, <http://darwin.cirad.fr/Home.php>). The robustness of the tree was assessed by bootstrapping (5000 resamplings).

Allelic frequency of non-null allele was set equal to the frequency of the AFLP fragment in the sample. The Nei gene diversity index h was estimated using the sample allele frequencies from all AFLP markers (52 p. 178). The estimate of the linkage disequilibrium between all pairs of polymorphic markers with minor allele frequency greater than 5% was calculated using an extension of the usual R^2 measure that accounts for the relatedness between the genotypes, R^2V in R package *LDcorSV*

(53). The kinship matrix used to estimate R^2V was calculated from the dissimilarity matrix produced by Neighbor-joining.

Mutagenesis of *Xcc*

Deletion mutants in *Xcc* were obtained using the SacB system with a pK18 suicide vector (54) modified for GoldenGate cloning (55). To this end, the pDONR207 *ccdB-Cm^R* cassette (Invitrogen) was amplified using primers LN431/432 (sequences are available upon request) and cloned *HindIII-XbaI* into pK18 giving p Δ 13. Primers used for amplification of sequences flanking the deleted region are available upon request. Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *Xcc* by triparental mating as described (56, 57). Deletion events were selected as described (54) and verified by PCR (Primer details available upon request).

Complementation of *xopAC* and *xopAM* deletion mutants

For complementation studies, *xopAC* promoter and coding sequence were amplified from *Xcc* 8004 (haplotype A), *Xcc* B100 (haplotype B), *Xcc* CN01 (haplotype C) and *Xcc* CN05 (haplotype D). Amplicons were cloned into pCZ917 (58), giving pCZ917-*xopAC_A*, pCZ917-*xopAC_B*, pCZ917-*xopAC_C* and pCZ917-*xopAC_D*. pCZ917 is a plasmid derived from pFAJ1700 (59) with the *lacI* gene, Ptac promoter, and T7 terminator. *xopAM* promoter and coding sequences were amplified from *Xcc* 8004, cloned into pCRII-Blunt vector (Invitrogen) and used for co-integration into pCZ917 giving pCZ917-*xopAM*. All primer sequences used for PCR amplification are available upon request. Cloning details are available upon request. DNA manipulations were performed with standard protocols as described (60). Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *Xcc* using pRK2073 as helper plasmid in triparental matings (56, 57).

Statistical analyses

The upper bound of the broad sense heritability (H^2) was calculated on the raw phenotypic data using the mean squares (33). At each dpi (3, 4, 5, 6, 7), adjusted means for each bacterial strain were calculated from the mean value of each plant using the following ANOVA model with *lm* function in R: $Y_{ijk} = \mu + s_i + e_j + p_k(e_j) + \varepsilon$, where Y_{ijk} is the disease index for strain i , experiment j , plant k ; μ is the overall mean of disease index; s is the strain effect, e is the experiment effect, p is the nested plant

effect within experiment e and ε is the error. Association studies were carried out using the adjusted means at 4 and 7 dpi.

In order to test if differences in symptom appearance through time would occur between the strains, we fitted a logistic function on the lsmeans and calculated the time at inflection point from each curve using Matlab (scripts are available upon request to AG). This parameter, representative of the speed of symptom development, was also used as a quantitative trait to carry out further association study.

An efficient mixed model analysis with a likelihood ratio test from the 'emma' package in R (function 'emma.ML.LRT') was used to test for an association between trait and genetic marker (3). All AFLP markers with a minor allele frequency $> 5\%$ were tested. For T3SP markers, singletons were excluded. A total of 960 markers were tested, marker by marker. To control for confounding effects of genetic relatedness in the sample, a similarity matrix, which is (1-dissimilarity matrix) constructed from the Neighbor-Joining tree, was used. We obtained a much greater statistical power using the phylogeny-based kinship matrix compared to the kinship matrix calculated in the 'emma' package.

A non-parametric Wilcoxon test (R function 'wilcox.test') was performed to see association results without correction for genetic relatedness. For the association tests using SNP data at the *xopAC* locus with only 28 strains, a Wilcoxon test was performed to compare the phenotypic values among the four haplotypes, and used the emma function to test for an association with SNPs.

To correct for false positives when hundreds of association tests were performed, significance thresholds were adjusted using False Discovery Rate set at 0.05 (61). The function 'mt.rawp2adjp' of 'multtest' package in Bioconductor was used. At each significant marker, effect size was defined as the difference between the mean phenotypic values of the two alleles.

The effects of the single gene deletions and complementations were assessed in a fixed effect model. We fit the model $Y_{ijk} = \mu + s_i + e_j + p_k(e_j) + \varepsilon$, where Y_{ijk} is the disease index for strain i , experiment j , plant k ; μ is the overall mean of disease index; s is the strain effect, e is the experiment effect, p is the nested plant effect within experiment e and ε is the error. All pair-wise differences among strains were tested using Tukey HSD with correction for multiple testing.

All analyses were performed using R software version 2.14.1 (www.r-project.org), except for the logistic function analysis (Matlab, release 2007b, www.mathworks.fr).

Acknowledgments

Authors are thankful to GD U'Ren for his help on logistic function for disease curve analysis, to Brigitte Mangin for statistical advice and to Lionel Gagnevin for help with AFLP analysis and to Joana Vicente (Warwick University) for contributing *Xanthomonas* strains. We also wish to thank the reviewers for their constructive comments to improve the manuscript.

AH was supported by a grant from the Tunisian Government, from the Conseil Général du Maine-et-Loire and from INRA. This work was supported by a PhD grant from the French Ministry of National Education and Research and French Guyana to EG, an INRA-SPE post-doctoral fellowship to MC, an INRA-SPE grant to SP and LDN, the LABEX TULIP (ANR-10-LABX-41) and an Agence Nationale de la Recherche–Jeunes Chercheurs grant (Xopaque ANR-10-JCJC-1703-01) to LDN.

References

1. **Glazier, A. M., J. H. Nadeau, and T. J. Aitman.** 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**:2345-2349.
2. **Flint, J., and T. F. Mackay.** 2009. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res* **19**:723-733.
3. **Kang, H. M., N. A. Zaitlen, C. M. Wade, A. Kirby, D. Heckerman, M. J. Daly, and E. Eskin.** 2008. Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* **178**:1709-1723.
4. **Atwell, S., Y. S. Huang, B. J. Vilhjalmsón, G. Willems, M. Horton, Y. Li, D. Meng, A. Platt, A. M. Tarone, T. T. Hu, R. Jiang, N. W. Muliyati, X. Zhang, M. A. Amer, I. Baxter, B. Brachi, J. Chory, C. Dean, M. Debieu, J. de Meaux, J. R. Ecker, N. Faure, J. M. Kniskern, J. D. Jones, T. Michael, A. Nemri, F. Roux, D. E. Salt, C. Tang, M. Todesco, M. B. Traw, D. Weigel, P. Marjoram, J. O. Borevitz, J. Bergelson, and M. Nordborg.** 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**:627-631.
5. **Araki, H., D. Tian, E. M. Goss, K. Jakob, S. S. Halldorsdottir, M. Kreitman, and J. Bergelson.** 2006. Presence/absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5887-5892.
6. **Ryan, R. P., F. J. Vorholter, N. Potnis, J. B. Jones, M. A. Van Sluys, A. J. Bogdanove, and J. M. Dow.** 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* **9**:344-355.
7. **Buttner, D., and U. Bonas.** 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**:107-133.
8. **Alvarez, A. M.** 2000. Black rot of crucifers, p. 21-52. In A. J. Slusarenka, R. S. S. Fraser, and L. C. van Loon (ed.), *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
9. **da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J.**

- Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-463.
10. Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B. L. Jiang, S. Zeng, W. Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G. P. Zhao, J. L. Tang, and C. He. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**:757-767.
 11. Vorholter, F. J., S. Schneiker, A. Goesmann, L. Krause, T. Bekel, O. Kaiser, B. Linke, T. Patschkowski, C. Ruckert, J. Schmid, V. K. Sidhu, V. Sieber, A. Tauch, S. A. Watt, B. Weisshaar, A. Becker, K. Niehaus, and A. Puhler. 2008. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* **134**:33-45.
 12. Bolot, S., E. Guy, S. Carrere, V. Barbe, M. Arlat, and L. D. Noël. 2013. Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain Xca5. *Genome Announc* **1**:e00032-00012.
 13. Vicente, J. G., J. Conway, S. J. Roberts, and J. D. Taylor. 2001. Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. *Phytopathology* **91**:492-499.
 14. Fargier, E., and C. Manceau. 2007. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* **56**:805-818.
 15. Jones, J. D., and J. L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.
 16. Boller, T., and G. Felix. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**:379-406.
 17. Gomez-Gomez, L., and T. Boller. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**:1003-1011.
 18. Deslandes, L., and S. Rivas. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci*.
 19. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **41**:1271-1281.
 20. Poueymiro, M., and S. Genin. 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* **12**:44-52.
 21. Baltrus, D. A., M. T. Nishimura, A. Romanchuk, J. H. Chang, M. S. Mukhtar, K. Cherkis, J. Roach, S. R. Grant, C. D. Jones, and J. L. Dangl. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7**:e1002132.
 22. White, F. F., N. Potnis, J. B. Jones, and R. Koebnik. 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol* **10**:749-766.

23. **Xu, R. Q., S. Blanvillain, J. X. Feng, B. L. Jiang, X. Z. Li, H. Y. Wei, T. Kroj, E. Lauber, D. Roby, B. Chen, Y. Q. He, G. T. Lu, D. J. Tang, J. Vasse, M. Arlat, and J. L. Tang.** 2008. AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol* **190**:343-355.
24. **Sarkar, S. F., J. S. Gordon, G. B. Martin, and D. S. Guttman.** 2006. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* **174**:1041-1056.
25. **Hajri, A., C. Brin, G. Hunault, F. Lardeux, C. Lemaire, C. Manceau, T. Boureau, and S. Poussier.** 2009. A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* **4**:e6632.
26. **Fargier, E., M. Fischer-Le Saux, and C. Manceau.** 2011. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst Appl Microbiol* **34**:156-165.
27. **He, Y. Q., L. Zhang, B. L. Jiang, Z. C. Zhang, R. Q. Xu, D. J. Tang, J. Qin, W. Jiang, X. Zhang, J. Liao, J. R. Cao, S. S. Zhang, M. L. Wei, X. X. Liang, G. T. Lu, J. X. Feng, B. Chen, J. Cheng, and J. L. Tang.** 2007. Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol* **8**:R218.
28. **Sun, W., F. M. Dunning, C. Pfund, R. Weingarten, and A. F. Bent.** 2006. Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* **18**:764-779.
29. **White, F. F., and B. Yang.** 2009. Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiol* **150**:1677-1686.
30. **Jiang, W., B. L. Jiang, R. Q. Xu, J. D. Huang, H. Y. Wei, G. F. Jiang, W. J. Cen, J. Liu, Y. Y. Ge, G. H. Li, L. L. Su, X. H. Hang, D. J. Tang, G. T. Lu, J. X. Feng, Y. Q. He, and J. L. Tang.** 2009. Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **22**:1401-1411.
31. **Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas.** 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol* **184**:1340-1348.
32. **Canonne, J., D. Marino, L. D. Noël, I. Arechaga, C. Pichereaux, M. Rossignol, D. Roby, and S. Rivas.** 2010. Detection and functional characterization of a 215 amino acid N-terminal extension in the *Xanthomonas* type III effector XopD. *PLoS One* **5**:e15773.
33. **Falconer, D. S., and T. F. C. Mackay.** 1996. Introduction to quantitative genetics, Longman ed. Longman, New York.
34. **Feng, F., F. Yang, W. Rong, X. Wu, J. Zhang, S. Chen, C. He, and J. M. Zhou.** 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**:114-118.
35. **Bart, R., M. Cohn, A. Kassen, E. J. McCallum, M. Shybut, A. Petriello, K. Krasileva, D. Dahlbeck, C. Medina, T. Alicai, L. Kumar, L. M. Moreira, J. R. Neto, V. Verdier, M. A. Santana, N. Kositcharoenkul, H. Vanderschuren, W. Gruissem, A. Bernal, and B. J. Staskawicz.** 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains

- identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:E1972-1979.
36. **Canonne, J., D. Marino, A. Jauneau, C. Pouzet, C. Briere, D. Roby, and S. Rivas.** 2011. The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the Arabidopsis transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *Plant Cell* **23**:3498-3511.
 37. **O'Brien, H. E., S. Thakur, Y. Gong, P. Fung, J. Zhang, L. Yuan, P. W. Wang, C. Yong, M. Scortichini, and D. S. Guttman.** 2012. Extensive remodeling of the *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* type III secretome associated with two independent host shifts onto hazelnut. *BMC Microbiol* **12**:141.
 38. **Alfano, J. R., A. O. Charkowski, W. L. Deng, J. L. Badel, T. Petnicki-Ocwieja, K. van Dijk, and A. Collmer.** 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4856-4861.
 39. **Long, A. D., and C. H. Langley.** 1999. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res* **9**:720-731.
 40. **Guo, M., F. Tian, Y. Wamboldt, and J. R. Alfano.** 2009. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* **22**:1069-1080.
 41. **Szczesny, R., D. Buttner, L. Escobar, S. Schulze, A. Seiferth, and U. Bonas.** 2010. Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol* **187**:1058-1074.
 42. **Kinch, L. N., M. L. Yarbrough, K. Orth, and N. V. Grishin.** 2009. Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB. *PLoS One* **4**:e5818.
 43. **Rong, W., F. Feng, J. Zhou, and C. He.** 2010. Effector-triggered innate immunity contributes Arabidopsis resistance to *Xanthomonas campestris*. *Mol Plant Pathol* **11**:783-793.
 44. **Kvitko, B. H., D. H. Park, A. C. Velasquez, C. F. Wei, A. B. Russell, G. B. Martin, D. J. Schneider, and A. Collmer.** 2009. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog* **5**:e1000388.
 45. **Gaudriault, S., L. Malandrin, J. P. Paulin, and M. A. Barny.** 1997. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol* **26**:1057-1069.
 46. **Blanvillain, S., D. Meyer, A. Boulanger, M. Lautier, C. Guynet, N. Denance, J. Vasse, E. Lauber, and M. Arlat.** 2007. Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* **2**:e224.
 47. **Meyer, D., E. Lauber, D. Roby, M. Arlat, and T. Kroj.** 2005. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Mol Plant Pathol* **6**:327-333.
 48. **Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Molecular plant microbe interactions* **4**:81-88.
 49. **Kado, C. I., and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* **145**:1365-1373.

50. **Boucher, C. A., F. Van Gijsegem, P. A. Barberis, M. Arlat, and C. Zischek.** 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J Bacteriol* **169**:5626-5632.
51. **Ah-You, N., L. Gagnevin, F. Chiroleu, E. Jouen, J. R. Neto, and O. Pruvost.** 2007. Pathological Variations Within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* Support Its Separation Into Three Distinct Pathovars that Can Be Distinguished by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Phytopathology* **97**:1568-1577.
52. **Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
53. **Mangin, B., A. Siberchicot, S. Nicolas, A. Doligez, P. This, and C. Cierco-Ayrolles.** 2012. Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity (Edinb)* **108**:285-291.
54. **Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
55. **Engler, C., R. Kandzia, and S. Marillonnet.** 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**:e3647.
56. **Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**:1648-1652.
57. **Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski.** 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**:7347-7351.
58. **Boulanger, A., G. Dejean, M. Lautier, M. Glories, C. Zischek, M. Arlat, and E. Lauber.** 2010. Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **192**:1487-1497.
59. **Dombrecht, B., J. Vanderleyden, and J. Michiels.** 2001. Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**:426-430.
60. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
61. **Benjamini, Y., and Y. Hochberg.** 2000. The adaptive control of the false discovery rate in multiple hypotheses testing. *J. Behav. Educ. Statist.* **25**:60-83.
62. **Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. Byrde, and A. H. Fielding.** 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *Embo J* **3**:3323-3328.

Supplemental Tables:

Table S1: Genotype and characteristics of *Xanthomonas campestris* strains used in this study.

Table S2: EMMA results on all markers at 7dpi (see Material and Methods).

Table S3: EMMA results on all markers, using the rate of change (time at inflection points from logistic regression as quantitative trait (see Material and Methods)).

Table S4: Pairwise linkage disequilibrium measures (R^2 and R^2V) using LDcorSV package in R (53) among SNPs present at the *xopAC* locus.

Tableau F : Origine des autres souches de *Xanthomonas campestris* récoltées sur Brassicacées utilisées dans cette étude.

| Souches (autres noms) | Race ^a | Isolement | | | | Source ^d |
|--|-------------------|---|-------------|-----------|------|--|
| | | Hôte | Famille | Pays | date | |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | | | | | | |
| Xca5 ^b | 1 | ? | Brassicacée | USA | ? | M. Daniels (Sainsbury Laboratory, Norwich, UK) |
| CFBP4953 ^c | 7 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i> | Brassicacée | Belgique | 1999 | CFBP |
| CFBP4954 ^c | 6 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>avisio</i> | Brassicacée | Belgique | 1999 | CFBP |
| CFBP6863 (NCPPB 875) ^c | 8 | <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Brassicacée | Allemagne | 1958 | CFBP |
| CFBP6865 (NCPPB 2986) ^c | 5 | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> | Brassicacée | Australie | 1975 | CFBP |
| <i>X. campestris</i> | | | | | | |
| CFBP5824 (LMG 7383, NCPPB 1930) | NP | <i>A Armoracia lapathifolia</i> | Brassicacée | USA | 1939 | CFBP |
| CFBP5825 (LMG 547, NCPPB 983) | NP | <i>Barbarea vulgaris</i> | Brassicacée | USA | 1939 | CFBP |
| CFBP5826 (LMG7385) | NP | <i>Barbarea vulgaris</i> | Brassicacée | USA | 1939 | CFBP |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i> | | | | | | |
| CFBP1606 | NP | <i>Cheiranthus cheiri</i> | Brassicacée | France | 1974 | CFBP |
| CFBP2527 (LMG 7490, NCPPB 937) | NP | <i>Matthiola incana</i> | Brassicacée | USA | 1950 | CFBP |
| CFBP1438 (NCPPB 1934) | NP | <i>Matthiola incana</i> | Brassicacée | USA | 1949 | CFBP |
| CFBP5686 (Shmit J. 10903) | NP | <i>Matthiola incana</i> | Brassicacée | France | 1981 | CFBP |
| CFBP1371 | NP | <i>Matthiola incana</i> | Brassicacée | France | 1972 | CFBP |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i> | | | | | | |
| CFBP5827 | R3 | <i>Raphanus sativus</i> | Brassicacée | USA | 1940 | CFBP |
| CFBP5828 | R3 | <i>Raphanus sativus</i> | Brassicacée | USA | ? | CFBP |
| CFBP5829 | R3 | <i>Raphanus sativus</i> | Brassicacée | USA | ? | CFBP |

^a, NP : non pathogène sur différents cultivars testés ; R : race. X : *Xanthomonas*

^b, souche premièrement décrite comme une souche du pathovar *armoraciae*.

^c, souches premièrement décrites comme des souches du pathovar *abberrans*.

^d, CFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes.

V.1 Données supplémentaires

V.1.1 T3SP impliquées dans l'agressivité de *Xcc* sur *A. thaliana*

Les ET3 sont importants pour le pouvoir pathogène des bactéries mais ils sont également impliqués dans la spécificité d'hôte. Nous avons donc voulu savoir quels sont les ET3 requis pour l'adaptation de *Xcc* sur *A. thaliana*. Dans ce but, la distribution des T3SP prédites des trois souches séquencées de *Xcc* (B100, 8004 et ATCC33913) chez différents pathovar de *X. campestris* (**Tableau F**) a été réalisée (da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008). Cette analyse a été entreprise afin d'identifier des T3SP spécifiques des souches de *Xcc* et qui seraient impliqués dans l'agressivité de ces dernières sur *A. thaliana*. La distribution des T3SP de *Xcc* chez les autres pathovar de *X. campestris* a été réalisée par PCR avec des couples d'amorces permettant d'amplifier un fragment de 300 pb (région 5' ou 3' des gènes) et le gène pleine taille (Guy *et al.*, soumis ; **Figure Z**). Excepté le pathovar *campestris* qui possède un effectome très hétérogène, les T3SP sont réparties de façon homogène chez les pathovar, *Xanthomonas campestris* pv. *incanae* et *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* et les souches de *X. campestris* (CFBP5824, 5825 et 5826 ; **Figure Z**) pour lesquelles aucun pathovar n'a été décrit (Fargier *et al.*, 2011). J'appellerai donc les souches de ce groupe *Xc*. Comme pour *X. axonopodis*, la composition du répertoire de T3SP des souches *incanae*, *raphani* et de *Xc* pourraient expliquer leur classification (Hajri *et al.*, 2009). Cependant, seules les T3SP du pathovar *campestris* ont été analysées dans cette étude, ce qui pourrait expliquer cette répartition homogène. Afin de compléter cette étude, le séquençage du génome de certaines souches de chaque pathovar de l'espèce *X. campestris* (mais également d'autres espèces de *Xanthomonas*) a été entrepris (ANR Xanthomix). Ce programme de séquençage a été en partie initié dans le but d'identifier de nouveaux ET3 et ceux spécifiques de chaque espèce ou pathovar du genre *Xanthomonas*. L'effectome homogène des autres pathovar de l'espèce *X. campestris* pourrait aussi être dû aux souches utilisées dans cette étude qui ne représentent pas la diversité présente au sein de chaque pathovar (**Figure Z**). Le pathovar *raphani* possède le plus petit effectome. Cette taille réduite pourrait être due au fait que les gènes des T3SP étudiés sont trop divergents pour que les amorces (synthétisées à partir du génome de *Xcc* 8004) puissent s'hybrider. De plus, seuls les T3SP prédites de *Xcc* ont été recherchés. D'autres ET3 présents mais encore non identifiés pourraient renforcer l'effectome des souches du pathovar *raphani*. Certaines T3SP (*xopAG*, *xopAN* et *xopQ*) sont présentes uniquement chez les pathovar *incanae* et *campestris* ou les pathovar *campestris* et *raphani* (*xopL*). Ces T3SP pourraient être impliquées dans la colonisation d'un hôte/tissu commun ou la mise en place de stratégies de virulence identiques. Parmi les T3SP étudiées, seuls les ET3 *xopAH*, *avrBs1* et

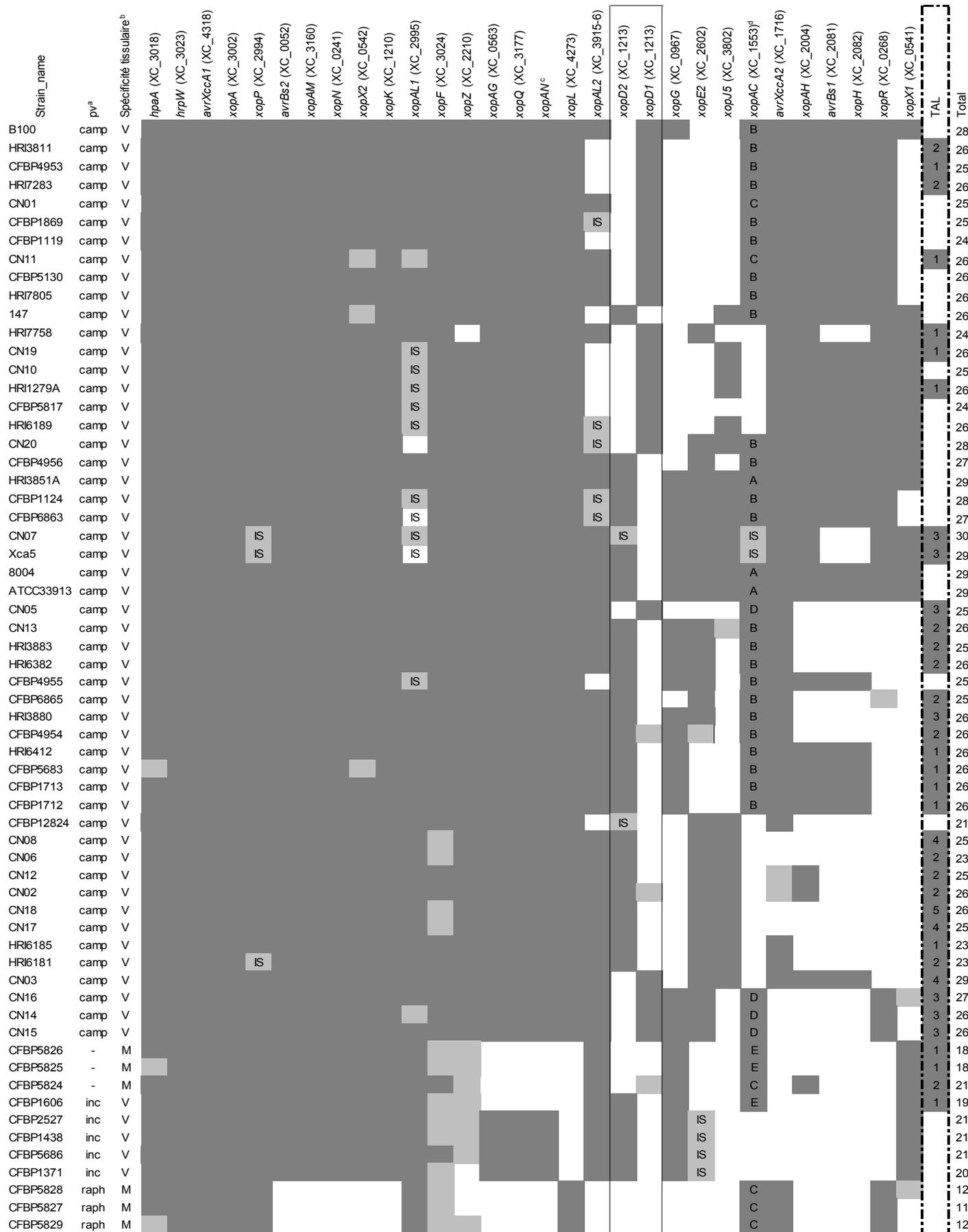


Figure Z : Distribution des gènes codant des T3SP parmi des souches de *Xanthomonas campestris*. La présence ou l'absence de gènes homologues au T3SP correspondant a été déterminée par PCR sur la région 5' ou 3' et sur le gène entier. Les cases grises foncées indiquent que le gène a été détecté avec les deux combinaisons d'amorces à la taille attendue tandis que les cases grises claires indiquent que le gène avec la taille attendue n'a été détecté qu'avec une seule des deux combinaisons d'amorces. Les cases blanches indiquent que le gène n'a pas été détecté. Dans ce dernier cas le gène est peut être trop divergent pour être détecté avec les amorces utilisées. Le cadre avec les traits continus montre la présence/absence mutuellement exclusive de *xopD1* et *xopD2*. Les lettres A, B, C, D et E représentent les différents haplotypes de la protéine XopAC. Le cadre avec les traits discontinus montre la présence de TAL (Transcription Activator Like) au sein des souches étudiées, notamment chez les souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et de *Xanthomonas campestris* pv. *incanae* encore inconnue à ce jour. La colonne de droite représente la taille minimale de l'effectome de chaque souche. IS : Insertion Sequence
^a, pv : pathovar ; cam : *X. campestris* pv. *campestris* ; arm : *X. campestris* pv. *armoraciae* ; inc : *X. campestris* pv. *incanae* ; rap : *X. campestris* pv. *raphani*.
^b, tissu colonisé préférentiellement par les différentes souches. V : pathogène vasculaire ; M : pathogène colonisant le mésophile.
^c, *xopAN* est un nouvel effecteur identifié chez les souches de *X. campestris* pv. *campestris* et de *X. campestris* pv. *incanae*.
^d, nd : non déterminé.

xopH sont spécifiques du pathovar *campestris* et représentent donc de bons candidats pour expliquer la nervation noire des Brassicacées causée par *Xcc* (**Figure Z**). Toutefois, la mutagenèse de ces ET3 montre qu'ils ne sont pas impliqués significativement dans une modification de l'agressivité de *Xcc* 8004 sur les écotypes Kas et Col-0 d'*A. thaliana* dans les conditions utilisées (Guy *et al.*, soumis).

V.1.2 *xopAC* code un facteur d'avirulence chez *X. campestris*

Comme décrit par Guy *et al.* (soumis), le gène *xopAC* code le facteur d'avirulence majeur reconnu par l'écotype Col-0 d'*A. thaliana* et est représenté par 4 haplotypes (A, B, C et D ; **Figure AAA et Z**). Durant notre analyse, nous avons pu observer que cet ET3 est présent chez tous les pathovar de *X. campestris* étudiés (**Figure Z**). Le gène *xopAC* des autres pathovar a donc été séquencé afin de savoir si d'autres haplotypes étaient présents et fonctionnels (reconnaissance du gène chez l'écotype Col-0) au sein des *X. campestris*. Excepté le pathovar *raphani* qui possède un haplotype (C) déjà décrit au sein du pathovar *campestris* (et donc fonctionnel), les souches de *Xc* et *incanae* codent un nouvel haplotype [E ; **Figure AAA et Z** (Guy *et al.*, soumis)]. Bien que l'haplotype E soit le plus divergent, très peu de polymorphismes sont observés au sein de la séquence protéique de XopAC. De façon intéressante, comme cela a été démontré pour les autres haplotypes, le domaine LRR et le motif consensus du domaine Fic de l'haplotype E ne présentent pas de polymorphismes. Ces résultats suggèrent que la protéine XopAC est très conservée au sein de l'espèce *X. campestris* et qu'il existe une pression de sélection pour les domaines LRR et Fic (**Figure AAA**). Les analyses fonctionnelles montrent que la souche 8004 Δ *xopAC* complétée en trans avec le gène *xopAC* de la souche CFBP1606 est avirulente sur l'écotype Col-0, indiquant que l'haplotype E est fonctionnel (**Figure AAB**). De plus, comme pour les autres allèles, l'haplotype E n'induit pas de changement d'agressivité de la souche 8004 sur l'écotype Kas dans les conditions utilisées (**Figure AAC**).

V.1.3 Les TAL *hax2*, 3 et 4 sont requis pour l'agressivité de la souche *Xca5* de *Xcc* sur l'écotype Kas d'*A. thaliana*

La souche *Xca5* possède trois ET3 de type TAL appelés Hax2, 3 et 4 (homolog of *avrBs3* in *Xanthomonas*) qui sont requis pour le pouvoir pathogène de cette souche lorsqu'elle est infiltrée dans les espaces intercellulaires de feuilles de radis (*Raphanus sativus* ; Kay *et al.*, 2005). La souche *Xca5*, autrefois classée dans le pathovar *armoraciae*, a été reclassée dans le pathovar *campestris* (Vicente *et al.*, 2001). En accord, les études phylogénétiques (L. Noël, communication personnelle) ainsi que les symptômes de la nervation noire causée par *Xca5* sur *A. thaliana* (données non montrées) confirment que

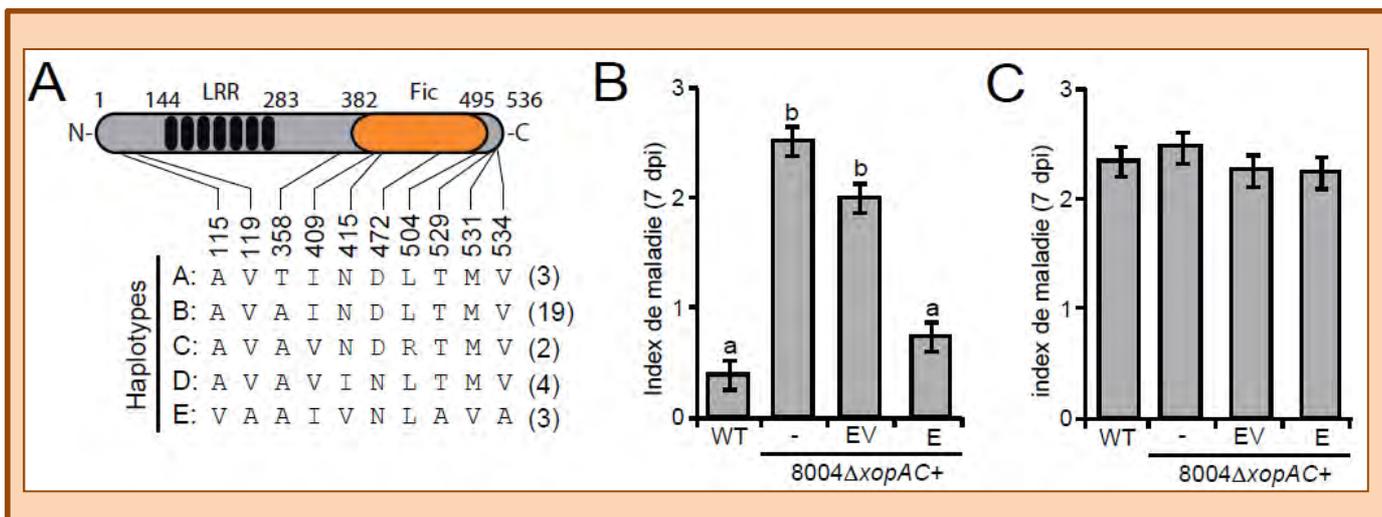


Figure AA : Diversité et fonctionnalité de l'haplotype E de XopAC. (A) Représentation schématique de la protéine XopAC. N (N-terminal) et C (C-terminal) désignent les limites de la protéine. LRR : Leucine Rich Repeats ; Fic : Filamentation induced by cAMP. Seuls les polymorphismes présents au sein de la protéine et au moins partagés par deux souches sont représentés ainsi que leur position au sein de la protéine. 5 haplotypes (A-E) peuvent être distingués chez les *X. campestris* et leur occurrence est représentée entre parenthèse. La fonctionnalité de l'haplotype E a été testée par inoculation par piercing sur les écotypes Col-0 (B) et Kas (C). Chaque souche a été inoculée sur 4 feuilles par plante sur un total de 4 plantes (soit 16 feuilles inoculées par souche). Seuls les symptômes de la maladie notés 7 jours après l'inoculation (dpi) sont représentés. 0, pas de symptôme ; 1, légère chlorose autour du site d'inoculation ; 2, chlorose étendue en forme de « V » ; 3, nécrose de la feuille ; 4, la nécrose atteint toute la feuille entraînant le détachement de la feuille. Les expériences ont été reproduites au moins 3 fois. La souche 8004ΔxopAC a été complétementée avec le vecteur vide (pCZ917 ; EV) ou l'haplotype E de xopAC (E). Les tests statistiques ont été réalisés avec un test Tukey HSD ($P < 0.01$). Les lettres a et b représentent différents groupes statistiques.

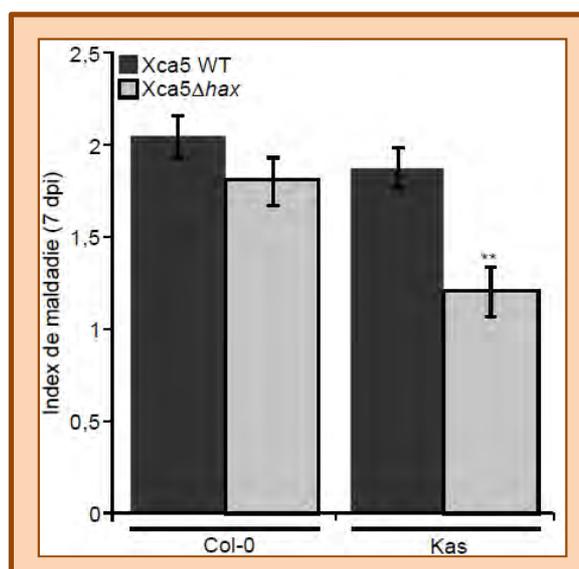


Figure AB : Agressivité du mutant hax (homolog of avrBs3 in Xanthomonas) de Xca5 sur les écotypes Col-0 et Kas d'Arabidopsis thaliana. Chaque souche a été inoculée sur 4 feuilles par plante sur un total de 4 plantes (soit 16 feuilles inoculées par souche). Seuls les symptômes de la maladie notés 7 jours après l'inoculation (dpi) sont représentés. 0, pas de symptôme ; 1, légère chlorose autour du site d'inoculation ; 2, chlorose étendue en forme de « V » ; 3, nécrose de la feuille ; 4, la nécrose atteint toute la feuille entraînant le détachement de la feuille. Les expériences ont été reproduites au moins 3 fois. Les tests statistiques ont été réalisés avec un test Tukey HSD (** : $P < 0.01$).

Déterminants nécessaires au pouvoir pathogène de *Xcc* sur *A. thaliana*

cette bactérie appartient bien au pathovar *campestris* (Vicente *et al.*, 2001). Le génome de cette souche a été récemment séquencé par notre équipe (article présenté ci-dessous). L'annotation des ET3 du génome de Xca5 montre qu'elle possède un effectome très divergent des autres souches de *Xc* et qu'il serait plutôt similaire à celui des *Xcc*. Ce résultat ajoute donc un argument de plus dans la classification de cette souche au sein du pathovar *campestris*. Ces résultats permettent de conclure à l'existence d'ET3 de type TAL chez les souches de *Xcc* ce qui était encore insoupçonné à ce jour en raison de l'absence de ces ET3 dans les génomes des 3 souches séquencées (da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008).

Durant notre étude, la recherche des ET3 de type TAL a donc été entreprise chez toutes les souches de *Xc* à notre disposition. Des amorces ont été créées afin de s'hybrider sur la région très conservée en 5' des TALs des *Xanthomonas*. Cette étude montre qu'en plus de Xca5 et du pathovar *raphani* (Kay *et al.*, 2005), les TALs sont également présents chez le pathovar *campestris* et chez les souches de *Xc* (**Figure Z**). Les TALs sont présents chez 63% des souches de *Xcc* étudiées. Un ET3 de type TAL est également présent chez une souche (CFBP1606) du pathovar *incanae* (**Figure Z**). De plus, elle est la seule souche du pathovar *incanae* à posséder les gènes *xopAC*, *xopAL2*, *xopD2*, *xopX1* et *xopG*. La souche CFBP1606 est une souche qui est génétiquement distincte des autres souches *incanae* et elle est pathogène sur *Cheiranthus cheiri* alors que les autres souches sont pathogènes sur *Matthiola incana* (Fargier *et al.*, 2011). L'analyse d'autres souches du pathovar *incanae* serait nécessaire afin de conclure à l'existence d'ET3 de type TAL chez ce pathovar. Etant donné l'importance des TALs pour le pouvoir pathogène de Xca5 sur le radis, l'impact de ces ET3 a été testé (inoculation par piercing) dans l'agressivité de la souche Xca5 sur *A. thaliana*. Comme le montre la **Figure AB**, le mutant Xca5 Δ *hax* (Δ *hax2*, 3 et 4) est moins agressif que la souche WT sur l'écotype Kas. Par contre, les TALs ne sont pas requis pour l'agressivité de la souche Xca5 sur l'écotype Col-0 (**Figure AB**). Ces données suggèrent que les TALs Hax2, 3 et 4 sont requis pour le pouvoir pathogène de Xca5 et pourraient moduler le transcriptome de l'écotype Kas d'*A. thaliana*.

L'étude des ET3 TALs chez les différents pathovar de *X. campestris* fait l'objet d'un article qui est en cours de rédaction dont je suis co-auteur mais qui ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

Titre : Identification of a large TAL effector repertoire in *Xanthomonas campestris* pathovars and their plant targets

Déterminants nécessaires au pouvoir pathogène de *Xcc* sur *A. thaliana*

Auteurs : Nicolas Denancé, Boris Szurek, Lisa Fontaine-Bodin, Ahmed Hajri, Erin Doyle, Endrick Guy, Thomas Dugé de Bernonville, Tristan Boureau, Stéphane Poussier, Adam Bogdanove and Laurent D. Noël

V.1.4 Séquence génomique de la souche Xca5 de *Xcc*

La race 1 est la plus représentée parmi les 9 races qui composent ce pathovar. Aussi nous avons entrepris le séquençage du génome de la souche Xca5, le premier d'une souche de race 1 de *Xcc*. Le génome de Xca5 fait 5 024 921 bp avec un pourcentage en GC de 65%. 4 592 séquences codantes, 51 gènes de ARNt et 2 gènes de ARNr ont pu être identifiés. Ce génome représente le premier génome de *Xcc* à présenter des TALs et un plasmide. Le génome de Xca5 représente une excellente ressource pour des études analyses comparatives ainsi que les études de diversité naturelle au sein des *Xcc*.

Cet article est présenté ci-dessous. Il est publié en co-auteur avec S. Bolot (IE, LIPM) dans la revue *Genome Announcements*. L'assemblage du génome et l'annotation fonctionnelle des séquences codantes ont été réalisés par S Bolot et S. Carrere (IR, LIPM). J'ai réalisé l'annotation fonctionnelle des ET3 de la souche Xca5 basée sur l'annotation des ET3 prédits des génomes séquencés des souches 8004, B100 et ATCC33913 ainsi que la validation de ces derniers par PCR.

J'ai aussi participé à l'annotation d'une soixantaine de gènes de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* durant une collaboration (French Network of *Xanthomonas*) regroupant plusieurs laboratoires français travaillant sur les bactéries du genre *Xanthomonas*. L'annotation de ce génome fera l'objet d'une publication sur laquelle je serais également auteur. Cependant, cet article ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain Xca5

Stéphanie Bolot,^{a,b} Endrick Guy,^{a,b} Sébastien Carrere,^{a,b} Valérie Barbe,^c Matthieu Arlat,^{a,b,d} Laurent D. Noël^{a,b}

National Institute for Agricultural Research (INRA), Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR 441, Castanet-Tolosan, France^a; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), LIPM, UMR 2594, Castanet-Tolosan, France^b; Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), IG, Genoscope, Évry, France^c; Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France^d

S.B. and E.G. contributed equally to this article.

An annotated high-quality draft genome sequence for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 strain Xca5 (originally described as *X. campestris* pv. *armoraciae*), the causal agent of black rot on *Brassicaceae* plants, has been determined. This genome sequence is a valuable resource for comparative genomics within the *campestris* pathovar.

Received 26 November 2012 Accepted 5 December 2012 Published 7 February 2013

Citation Bolot S, Guy E, Carrere S, Barbe V, Arlat M, Noël LD. 2013. Genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain Xca5. *Genome Announc.* 1(1):e00032-12. doi:10.1128/genomeA.00032-12.

Copyright © 2013 Bolot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Laurent D. Noël, laurent.noel@toulouse.inra.fr.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* is the causal agent of black rot on a wide range of *Brassicaceae* plants, including vegetable crops, such as cabbages, ornamental crucifers, and weeds, as well as the model plant *Arabidopsis thaliana*. The bacteria are seed transmitted and enter the plant vascular system by the hydathodes, causing V-shaped lesions, vein blackening, and leaf tissue necrosis. *X. campestris* pv. *campestris* strains have been sorted into 9 physiological races based on their interactions with diverse *Brassicaceae* plants. *X. campestris* pv. *campestris* genome sequences for races 3 and 9 are available (1, 2). Yet, no strains from *X. campestris* pv. *campestris* race 1 have had their genome sequences determined, despite belonging to probably the most represented *X. campestris* pv. *campestris* race worldwide (3).

Xca5 is an American race 1 *X. campestris* pv. *campestris* strain originally classified as pathovar *armoraciae* by M. Daniels (Sainsbury Laboratory, Norwich, United Kingdom). Yet, pathogenicity tests (3), as well as multilocus sequence analyses (data not shown), clearly identified this strain as a bona fide *X. campestris* pv. *campestris* strain. Xca5 genome shotgun sequencing was performed on a GAIIx Illumina platform. A total of 28,569,308 76-bp paired-end reads corresponding to 4,342,534,816 bp and 868-fold coverage were obtained. Genome assembly was performed using a combination of Short Oligonucleotide Analysis Package (SOAP) *de novo* (4) and Velvet (5) assemblers and yielded 130 contigs that were >500 bp and had an N_{50} of 121,265 bp. The average contig size was 38,385 bp, and the largest was 447,475 bp long, for a total genome size of 4,990,056 bp. One hundred twenty of those contigs were further organized into 4 pseudomolecules. The largest one corresponds to the chromosome (4,905,337 bp; 65.2% G+C content) based on *X. campestris* pv. *campestris* 8004 chromosomal organization. The remaining pseudomolecules match known *Xanthomonas* plasmid sequences. Due to the highly repetitive nature of the structures of known transcriptional activator-like (TAL) protein-encoding loci *hax2* (plasmid borne), *hax3*, and *hax4*, their sequences (accession no. AY993937, AY993938, and

AY993939, respectively) could not be assembled automatically (6) and were manually added to the final submission. In total, the genome is composed of 17 pseudomolecules/contigs totaling 5,001,025 bp. Annotation transfer was performed using the Rapid Annotation Transfer Tool (RATT) (7) with *X. campestris* pv. *campestris* B100, 8004, and ATCC 33913 as references. *De novo* annotation was performed on remaining areas using Framed (8) and was inspected manually. We identified 4,592 coding sequences (CDSs), 51 tRNA genes, and 2 rRNA genes.

Phylogenetic analyses based on the core genome sequence shared with the 3 available *X. campestris* pv. *campestris* reference genome sequences and the genome sequence of *X. campestris* pv. *raphani* strain 756C were performed using Unus (9). These analyses showed that, indeed, Xca5 is most closely related to *X. campestris* pv. *campestris* strains 8004 and ATCC 33913. Using OrthoMCL (percent match cutoff, 80; blast parameter, F = false) (10), Xca5 was found to share 3,711 CDSs with the 3 *X. campestris* pv. *campestris* reference strains. Despite the availability of the 3 *X. campestris* pv. *campestris* reference genome sequences, this genome sequence represents the first *X. campestris* pv. *campestris* strain with TAL protein genes and plasmids, suggesting that much more genomic diversity might be expected at the intraspecific level than is anticipated from the available *X. campestris* pv. *campestris* genome sequences (1, 2, 11).

Nucleotide sequence accession numbers. The Whole Genome Shotgun project has been deposited at EMBL under the accession no. CAOR01000001 to CAOR01000130.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Laboratoire d'Excellence (LABEX) TULIP (ANR-10-LABX-41), Genoscope grant, AP10/11-N° 28_Rott, a Ph.D. grant from the French Ministry of National Education and Research and French Guiana to E.G., and an Agence Nationale de la Recherche–Jeunes Chercheurs grant (Xopaque ANR-10-JCJC-1703-01) to L.D.N.

REFERENCES

1. da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459–463.
2. Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang L, Jiang BL, Zeng S, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian Y, Yao Z, Fu G, Chen B, Fang R, Qiang B, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15:757–767.
3. Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathogens. *Phytopathology* 91:492–499.
4. Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J. 2010. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res.* 20:265–272.
5. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829.
6. Kay S, Boch J, Bonas U. 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:838–848.
7. Otto TD, Dillon GP, Degraeve WS, Berriman M. 2011. RATT: rapid annotation transfer tool. *Nucleic Acids Res.* 39:e57.
8. Schiex T, Gouzy J, Moisan A, de Oliveira Y. 2003. FrameD: a flexible program for quality check and gene prediction in prokaryotic genomes and noisy matured eukaryotic sequences. *Nucleic Acids Res.* 31:3738–3741.
9. Rodriguez-R LM, Grajales A, Arrieta-Ortiz ML, Salazar C, Restrepo S, Bernal A. 2012. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiol.* 12:43.
10. Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13:2178–2189.
11. Vorholter FJ, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Ruckert C, Schmid J, Sidhu VK, Sieber V, Tauch A, Watt SA, Weisshaar B, Becker A, Niehaus K, Puhler A. 2008. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J. Biotechnol.* 134:33–45.

V.2 Discussion

V.2.1 La diversité du répertoire de T3SP plutôt que le nombre d'ET3 contribuerait au pouvoir pathogène

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que l'agressivité d'une collection de 45 souches de *Xcc* est très hétérogène et contrastée sur deux écotypes d'*A. thaliana* testés (Col-0 et Kas ; Guy *et al.*, soumis). La distribution de 29 T3SP (prédites) basée sur les génomes de trois souches séquencées de *Xcc* a été entreprise afin d'expliquer cette différence d'agressivité sur les deux écotypes (da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008). En plus des T3SP, la recherche de TALs a également été entreprise chez les souches de *Xcc*.

L'effectome varie entre 11 pour la souche CFBP5827 et 30 T3SP pour la souche CN07 (**Figure Z**). Ce nombre est probablement sous estimé en raison des difficultés d'identification des T3SP chez le genre *Xanthomonas* (Gurlebeck *et al.*, 2006). Aucune corrélation n'a été observée entre la taille de l'effectome et l'agressivité des souches (Guy *et al.*, soumis). Par exemple, la souche CN03 est beaucoup moins agressive que la CN05 qui possède 4 ET3 de moins (Guy *et al.*, soumis). Ces résultats sont en accord avec ceux réalisés sur *X. axonopodis* pv. *manihotis* qui montrent que la taille de l'effectome de ces souches n'a pas d'effet significatif sur leur agressivité. Plutôt que la taille de l'effectome, ce serait la composition de ce dernier qui serait important pour l'agressivité des bactéries sur leurs plantes hôtes. Les activités enzymatiques présentes au sein de chaque répertoire de part leur capacité à induire ou supprimer les défenses végétales pourraient être déterminantes. Le polymorphisme présent chez chaque ET3 est un facteur qui pourrait aussi jouer un rôle dans l'agressivité de *Xcc* sur ses plantes hôtes. Bien que la plupart des souches de *Xcc* ait des TALs, le nombre de TALs et la diversité présente au niveau des résidus RVD fait que ces protéines vont induire différents gènes qui vont contribuer de façons diverses et variées à l'agressivité des souches. Un autre exemple est illustré par l'ET3 *xopD*. Toutes les souches de *Xcc* (excepté les souches CFBP12824 et CN07) possèdent un ET3 de type *xopD* (*xopD1* ou *xopD2* ; **Figure Z**). Toutefois, ces deux allèles ne sont pas équivalents fonctionnellement, seul *xopD1* est capable d'inhiber le facteur de transcription ATMYB30 et de supprimer les défenses induites par ce dernier (Canonne *et al.*, 2011). De plus, comme cela est le cas pour l'ET3 HopM1 de *P. syringae* certains ET3 conservés chez *Xcc* pourraient avoir des polymorphismes les rendant fonctionnellement divergents au sein du pathovar (Baltrus *et al.*, 2011). De nombreuses études se sont concentrées sur la présence/absence des ET3 afin d'expliquer l'adaptation des bactéries à

leurs plantes hôtes. Le type et le polymorphisme des ET3 présents au sein de chaque effectome pourraient être également importants dans l'adaptation des bactéries à leurs plantes hôtes. Afin de vérifier cette hypothèse, les génomes des souches de *Xcc* disponibles dans cette étude ont été séquencés (ou sont en cours de séquençage). Ces séquences permettront de faire l'étude de GWA en utilisant les marqueurs de type SNP et Indels présents dans les génomes.

V.2.2 L'étude d'espèces ou souches modèles est elle toujours pertinente ?

Dans le but d'identifier des déterminants génétiques spécifiques d'une souche ou présents au niveau de l'espèce, une étude de GWA a été entreprise en utilisant les T3SP variables. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier 8 ET3 (*xopAC*, *avrBs1*, *xopH*, *xopAH*, *xopJ5*, *xopP*, *xopE2* et *xopF*; Guy *et al.*, soumis). Bien qu'étant déjà connu comme étant un gène d'avirulence chez *Xcc* 8004, l'analyse de GWA a identifié *xopAC* comme étant le gène majeur d'avirulence reconnu par l'écotype Col-0 au sein de la population de *Xcc*. *xopAC* est spécifique des souches de *X. campestris*. Cependant, c'est un ET3 variable au sein de l'espèce *X. campestris*, s'il en avait été autrement l'étude de GWA aurait permis d'identifier une cible idéale pour développer des stratégies de résistance contre cette espèce.

L'étude de GWA a aussi mis en avant une fonction de virulence pour l'ET3 *xopAC* sur l'écotype kas (Guy *et al.*, soumis). La mutagenèse des ET3 prédits de la souche 8004 dont les 8 ET3 identifiés dans l'étude de GWA (excepté les ET3 *xopA*, *xopAG*, *xopAL2*, *hpaA* et *avrBs2*) n'a pas permis l'identification de gènes d'ET3 requis pour l'agressivité sur Kas dans les conditions testées. Ce résultat est probablement dû à la forte redondance présente au sein des ET3. De façon similaire, la mutagenèse de cet ET3 n'a pas d'effet sur l'agressivité de la souche HRI3811 sur Kas. Néanmoins, la mutagenèse de l'ET3 *xopAC* diminue de façon significative la virulence de la souche CN01 sur Kas. Bien que l'effet de virulence de *xopAC* ait été identifié à l'échelle du pathovar, la contribution de ce gène à l'agressivité sur Kas dépend de la souche et donc du contexte génomique.

En plus de l'effecteur *xopAC*, les études de mutagenèse des ET3 de la souche 8004 ont permis d'identifier un second ET3 (*xopAM*) conférant l'avirulence sur l'écotype Col-0 (Guy *et al.*, soumis). Cet ET3 n'a pas été pris en compte dans l'analyse de GWA car il est conservé. De plus, il aurait été difficilement identifiable par GWA car le gène est très conservé au sein des *Xcc* (données non publiées). Le gène *xopAM* contribue à la virulence de *Xcc* 8004 sur le radis chinois (Jiang *et al.*, 2009). Dans cette étude, seule une fonction

Déterminants nécessaires au pouvoir pathogène de *Xcc* sur *A. thaliana*

d'avirulence pour *xopAM* a pu être observée. L'ET3 *xopAM* pourrait donc être une cible intéressante pour mettre en place des stratégies de résistance à *Xcc*.

Ces résultats montrent que l'utilisation de souches de référence telle que *Xcc* 8004 ou plante modèle telle que Col-0 peuvent fortement biaiser les conclusions sur la contribution des facteurs de virulence au sein d'une population. De même, l'utilisation d'approches multidisciplinaires est nécessaire afin d'identifier et étudier les déterminants génétiques contribuant au pouvoir pathogène des agents infectieux.

VI. Bases moléculaires de la reconnaissance de *xopAC* chez *A. thaliana*

Afin de pénétrer à l'intérieur des feuilles, les pathogènes utilisent différentes portes d'entrée naturelles qui traduisent la spécificité tissulaire de ces derniers. Les pathogènes qui colonisent le mésophile entrent dans la feuille par les stomates et les blessures afin de se multiplier dans les espaces intercellulaires des feuilles. A la différence des pathogènes qui colonisent le mésophile, les pathogènes vasculaires entrent dans les feuilles *via* les hydathodes (pores aqueux à la marge des feuilles) et aussi par des blessures. Suite à leur entrée dans la feuille, les pathogènes vasculaires colonisent le xylème et se multiplient à l'intérieur de ce dernier afin de causer une infection systémique. Cette spécificité tissulaire suggère des mécanismes d'adaptation différents et de façon réciproque chez les plantes, elle suppose la mise en place de réactions de défense potentiellement propres à chaque tissu. Contrairement à l'immunité contre les pathogènes du mésophile qui est très bien documentée, l'immunité permettant de faire face aux pathogènes vasculaires est très peu étudiée et donc mal décrite.

Meyer *et al* (2005) ont montré que l'écotype Col-0 d'*A. thaliana* reconnaît la bactérie *Xcc* uniquement lorsque les bactéries sont inoculées directement dans la nervure centrale des feuilles. Ces résultats suggèrent que la plante a une spécificité tissulaire pour la reconnaissance de *Xcc*. Plus tard, Xu *et al* (2008) ont montré que cette reconnaissance était due à la présence de l'ET3 XopAC (**Figure Y**). Cet ET3 induit une ETI appelée V-ETI car elle n'a lieu que lorsque les bactéries sont inoculées dans le système vasculaire de l'écotype Col-0. Dans ce travail, nous avons décidé d'utiliser XopAC comme un outil afin d'étudier l'immunité vasculaire chez *A. thaliana*. Les principaux résultats montrent que la résistance contre *Xcc* 8004 chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana* requiert la présence de deux RLCK : RIPK et PBL2.

Les travaux réalisés sur l'analyse fonctionnelle de l'ET3 XopAC font l'objet d'un article soumis dans la revue *Molecular Plant* (Guy *et al.*, en préparation).

***xopAC*-triggered immunity against *Xanthomonas* depends on the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinases PBL2 and RIPK**

Running title: *xopAC*-triggered immunity in Arabidopsis

Endrick Guy^{a,b}, Martine Lautier^{a,b,c}, Matthieu Chabannes^{a,b,1}, Brice Roux^{a,b}, Matthieu Arlat^{a,b,c}, Laurent D. Noël^{a,b,2}

Author affiliations:

^a INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 441, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

^b CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR 2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

^c Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France.

¹ Present address of MC: CIRAD. UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France.

² To whom correspondence should be addressed: Laurent D. Noël, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F-31326 Castanet-Tolosan, France. Email: laurent.noel@toulouse.inra.fr; Phone: 00 33 5 6128 5047; Fax: 00 33 5 6128 5061.

Abstract (194 words)

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) colonizes the vascular system of Brassicaceae and ultimately causes black rot. In susceptible Arabidopsis plants, XopAC type III effector inhibits by uridylylation positive regulators of the PAMP-triggered immunity such as the receptor-like cytoplasmic kinases BIK1 and PBL1. In the resistant ecotype Col-0, *xopAC* is a major avirulence gene of *Xcc*. In this study, we show that both RLCK interaction domain and uridylyl transferase domain of XopAC are required for avirulence. Furthermore, *xopAC* can also confer avirulence to both the vascular pathogen *Ralstonia solanacearum* and the mesophyll colonizing pathogen *Pseudomonas syringae* indicating that *xopAC*-specified effector-triggered immunity (ETI) is not specific of the vascular system. XopAC expression causes necrosis on pepper and *Nicotiana benthamiana* nonhost plants and growth arrest at late stage of seedling development in transgenic Arabidopsis. *In planta*, XopAC-YFP fusions are localized to the plasma membrane suggesting that XopAC might interact to membrane-localized proteins. Eight RCLK of the subfamily VII predicted to localize to the plasma membrane and interacting with XopAC in yeast two-hybrid assays have been isolated. Within this subfamily, *PBL2* and *RIPK RLCK* genes but not *BIK1* are important for *xopAC*-triggered immunity and Arabidopsis resistance against *Xcc*.

Keywords: *avrAC*, fic domain, *Xanthomonas*, avirulence, RIPK, PBL2, PBS1, RPM1, RIN4, RLK, receptor-like kinase, RLCK, PBL

Short summary

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) is the causal agent of black rot on Brassicaceae (e.g. cabbage and Arabidopsis). In this study, two plant genes of the receptor-like kinase family required for resistance against *Xcc* were identified in the model plant Arabidopsis.

Introduction

Plant innate immunity is a multilayer system which limits pathogen entry and multiplication in leaf tissues. Those defence mechanisms are initially triggered by generic elicitors called PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns, Jones and Dangl, 2006). PAMPs are highly conserved, present in multiple organisms and are usually important for microbial fitness or viability (Zipfel and Felix, 2005). For example, in bacteria, lipopolysaccharides, peptidoglycan, flagellin, AX21 secreted protein or the elongation factor-Tu (EF-Tu) rapidly elicit various defences such as plant cell wall reinforcement, ion fluxes, MAP kinase signalling cascades, transcriptional reprogramming or production of reactive oxygen species (ROS) and anti-bacterial compounds. These responses are globally referred to as PAMP-triggered immunity (PTI). The presence of those PAMPs is perceived at the plasma membrane by pattern recognition receptors (PRR, Ronald and Beutler, 2010). The best-studied PRR are the receptor-like kinases (RLK) FLS2 (Flagellin-sensitive) and EFR (EF-Tu receptor) of *A. thaliana* which are required for flagellin/AX21 and EF-Tu perception, respectively (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006; Danna et al., 2011). Upon perception of flagellin and EF-Tu, both FLS2 and EFR dissociate from BIK1 (*Botrytis*-induced kinase) and associate with the co-receptor BAK1 (BRI1-associated kinase) to initiate a highly complex phosphorylation cascade leading to PTI establishment (Chinchilla et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Pathogens have evolved a number of strategies to evade PTI such as the production of non-recognizable PAMPs (Sun et al., 2006), the scavenging of active PAMPs (de Jonge et al., 2010) or the interference with PTI perception/signalling cascade. Inhibition of PTI can be achieved by bacterial toxins (Melotto et al., 2006) or type III effector (T3E) proteins. In Gram-negative bacteria, T3E proteins are secreted and translocated directly into the host cell by the type III secretion (T3S) system (Galan and Wolf-Watz, 2006). Phytopathogenic bacteria of the genus *Ralstonia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* express Hrp (Hypersensitive response and pathogenicity) T3S systems which are essential virulence determinants and secrete ca. 20-70 effectors inside the plant cell (Poueymiro and Genin, 2009; White et al., 2009; Lindeberg et al., 2012). To date, most T3E have been shown to target PTI components resulting in effector-triggered susceptibility (ETS, Jones and Dangl, 2006). For instance, the *Pseudomonas syringae* cysteine protease AvrPphB, cleaves the RLCK (Receptor-like cytoplasmic kinases) PBS1 and several PBL (PBS1-like such as BIK1) proteins and inhibits FLS2-dependent PTI (Shao et al., 2003; Lu et al., 2010; Zhang et al.,

2010). RLCK are kinases of the RLK subfamily VII lacking extracellular and transmembrane domains compared to RLK. RLCK are often located at the plasma membrane due to palmitoylation/myristoylation or association with membrane proteins (Shiu and Bleecker, 2001; Burr et al., 2011). Two other *P. syringae* effectors AvrB and AvrRpm1 enhance phosphorylation of RIN4 (RPM1-interacting), a negative regulator of PTI (Mackey et al., 2002; Kim et al., 2005; Chung et al., 2011). RIN4 promotes stomatal opening *via* its interaction with two plasma membrane H⁺-ATPases (Liu et al., 2009). Targeting RIN4 allows *P. syringae* to enhance plant stomatal opening, facilitating its entry inside the leaf.

Though important for ETS, T3E can also betray pathogens since their specific recognition by plant resistance (R) proteins causes effector-triggered immunity (ETI, Jones and Dangl, 2006). ETI generally results in a hypersensitive response (HR) which is a rapid and localized cell death at the infection site which limits pathogen growth and spread. R proteins essentially encode nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) proteins which usually recognize T3E indirectly by the modifications T3E induce on host proteins. For instance, the RPS5 R protein perceives the cleavage of PBS1 by AvrPphB (Shao et al., 2003). Similarly, the RPM1 monitors the AvrB/AvrRpm1-dependent phosphorylation of RIN4 (Mackey et al., 2002; Chung et al., 2011). Conserved signalling modules downstream of R proteins usually require signalling hubs such as EDS1 (Enhanced disease susceptibility) and PAD4 (Phytoalexin-deficient) or NDR1 (Non-race-specific disease resistance, Aarts et al., 1998). While most of those results have been obtained on the mesophyll-colonizing *P. syringae*, relatively little is known about the mechanisms of plant immunity mounted against vascular pathogens.

The Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is a vascular pathogen and the causal agent of black rot disease in Brassicaceae (Vicente and Holub, 2013). *Xcc* can infect economically important crops like cabbage, mustard, radish, turnip, as well as the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Xcc* colonizes and multiplies inside the xylem vessels after its entry *via* the hydathodes or wounds. *Xcc* T3S system and the ca. 20-30 T3E called *Xanthomonas* outer proteins (Xop) are essential for bacterial pathogenicity (Arlat et al., 1991; Vicente and Holub, 2013). XopAC (also called AvrAC) is a *Xanthomonas campestris*-specific type III effector. *xopAC* confers avirulence to *Xcc* only when bacteria are inoculated in the vascular system of the Columbia-0 (Col-0) ecotype of *A. thaliana* by piercing the main leaf vein, but not by mesophyll infiltration (Meyer et al., 2005; Xu et al., 2008). *xopAC* encodes a protein with a N-terminal LRR domain and a C-terminal fic (Filamentation-induced by

cAMP, consensus HPFxxG/ANGR) domain (Xu et al., 2008). While XopAC N terminus is sufficient to interact with the plant RLCK RIPK (*RPM1*-induced protein kinase) and BIK1, XopAC fic domain uridylylates (transfer of uridine 5'-monophosphate; UMP) and inhibits those kinases (Feng et al., 2012). BIK1 and RIPK are positive and negative regulators of PTI, respectively (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010; Liu et al., 2011). Importantly, *xopAC* deletion mutants in *Xcc* 8004 show reduced growth when infiltrated in leaves of cabbages and Arabidopsis ecotype Col-0 (Feng et al., 2012). Because this fitness gain is BIK1-dependent in Arabidopsis, BIK1 inhibition dependent on *xopAC* seems to prevail on RIPK inhibition *in planta* (Feng et al., 2012). In addition, RIPK is a positive regulator of the AvrB/RPM1-dependent ETI in Arabidopsis and mediates AvrB-induced RIN4 phosphorylation (Liu et al., 2011). XopAC-mediated inhibition of RIPK by uridylylation limits RIN4 phosphorylation monitored by RPM1 (Liu et al., 2011) and could explain the observed suppression of the AvrB/RPM1-dependent ETI in Arabidopsis (Feng et al., 2012). To date, it remains unclear whether XopAC interacts with few or many members of the RLCK family. The plant genes required for resistance against *Xcc* and *xopAC*-mediated ETI are also so far unknown.

In this study, we show that *xopAC* can confer avirulence to vascular and non-vascular bacterial pathogens. XopAC can cause seedling growth arrest in Arabidopsis and necrosis in nonhost plants. Several RLCK interacting with XopAC were identified by yeast two-hybrid. At least two of these RLCK are required to mount full resistance to *Xcc* and are distinct from the virulence-promoting RLCK inhibited by *xopAC* during a compatible interaction.

Results

The LRR and fic domains of XopAC are required for *Xcc* avirulence on Arabidopsis ecotype Col-0

xopAC was previously reported to be essential for *Xcc* 8004 avirulence on Col-0. In order to determine which domains might be critical for XopAC avirulence function on Arabidopsis ecotype Col-0, chromosomal deletions of the sequences coding for the LRR or fic domains were engineered in *Xcc* strain 8004 and compared to the wild-type and *xopAC* deletion strains. In parallel, the H469A mutation abolishing XopAC uridylylation activity was also introduced in *xopAC*. Importantly, those mutations do not modify XopAC N terminus so that their secretion-translocation by the T3S system should not be affected. The wild-type strain and *xopAC* mutant derivatives were inoculated by piercing in the central vein of Col-0

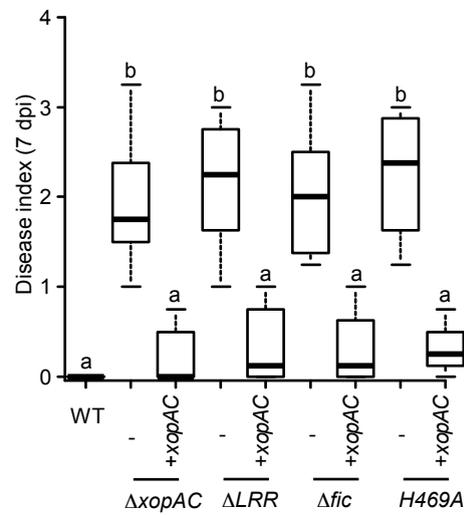
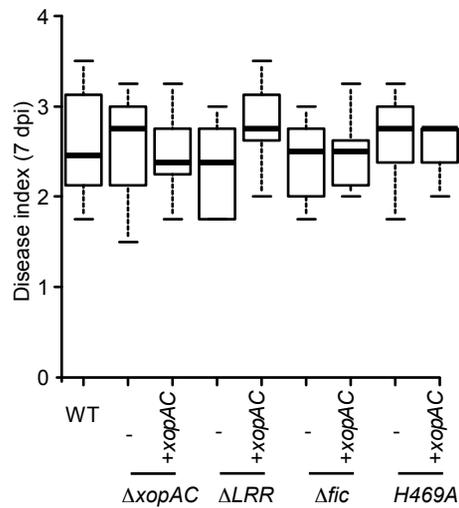


Figure 1. The LRR and the fic domains of XopAC are required for XopAC-triggered immunity in Arabidopsis ecotype Col-0. A boxplot representation of pathogenicity of wild-type *Xcc* strain 8004 and *xopAC* mutants ($\Delta xopAC$, ΔLRR , Δfic , *xopAC-H469A*) complemented or not with pCZ917-*xopAC_A* (+*xopAC*) is shown: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. Bacteria were inoculated by piercing in the leaf central vein and infection symptoms were scored 7 days post inoculation. Disease index indicates: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. N=3. Each time at least 4 plants were inoculated on at least 3 leaves. Statistical groups were determined using a Tukey HSD test ($P < 0,001$) and indicated by a letter.

(resistant to *Xcc* 8004) and Kas (susceptible to *Xcc* 8004) leaves. Seven days post inoculation, 8004 Δ *xopAC*, 8004*xopAC* Δ LRR, 8004*xopAC*-H469A and 8004*xopAC* Δ fic were able to cause disease on Col-0 in contrast to the wild-type strain (Figure 1). These mutations were complemented by *xopAC*. On Kas, all strains were fully virulent (Supplementary Figure S1). In order to test the expression level and the stability of these *xopAC* mutant alleles, chromosomal versions of the *hrpG** (E44K, Wengelnik et al., 1999) gain of function mutation were introduced in each strain. HrpG regulates positively a large regulon which includes the T3S system and most of its substrates in *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*, Noël et al., 2001). The HrpG* mutation allows the constitutive expression in rich medium of the T3S system and its substrates such as XopAC in *Xcc* (LDN, unpublished results). Western blot analysis using anti-XopAC anti-serum demonstrated that these XopAC mutant proteins accumulated to wild-type levels in total cell extracts of 8004::*hrpG** (8004*, Supplementary Figure S2A). These results indicate that the LRR domain, the fic domain and uridylylation activity of XopAC are required for XopAC avirulence function on Col-0.

XopAC induces seedling growth inhibition in Arabidopsis host plants

To further study the avirulence function of *xopAC*, Col-0 transgenic plants expressing the *xopAC* gene were constructed. We were unable to recover transgenic lines expressing HA-tagged XopAC from a constitutive 35S promoter suggesting that its expression might be lethal at early developmental stages. Wild-type *xopAC* was thus put under the control of an estradiol-inducible promoter in the pER8 vector (Zuo et al., 2000) and introduced into Col-0 using *Agrobacterium*-mediated transformation. Only five out of twelve hygromycin-resistant lines grew normally on MS/10 medium and soil. Four out of five showed a reduced growth in presence of β -estradiol only. Three of the latter transgenics contained single insertions and homozygous T2 lines were selected for lines #8 and #9. Seeds were sown on MS/10 medium supplemented or not with 5 μ M β -estradiol (Figure 2A). In the absence of β -estradiol, both transgenic lines grew similarly to the wild-type Col-0 or pER8-GFP controls. Fourteen days post germination on 5 μ M β -estradiol, lines #8 and #9 showed a reduced growth of their roots and shoots, no emergence of true leaves as well as a strong cotyledon chlorosis/necrosis. Under those conditions, line #9 displayed the most pronounced growth defect when compared to line #8. Yet, four days post germination, pER8-*xopAC* transgenics were fully healthy and indistinguishable from wild-type controls (Figure 2B). Strength of the phenotype was correlated with a higher expression of XopAC in line #9 than in line #8 (Figure 2C). This



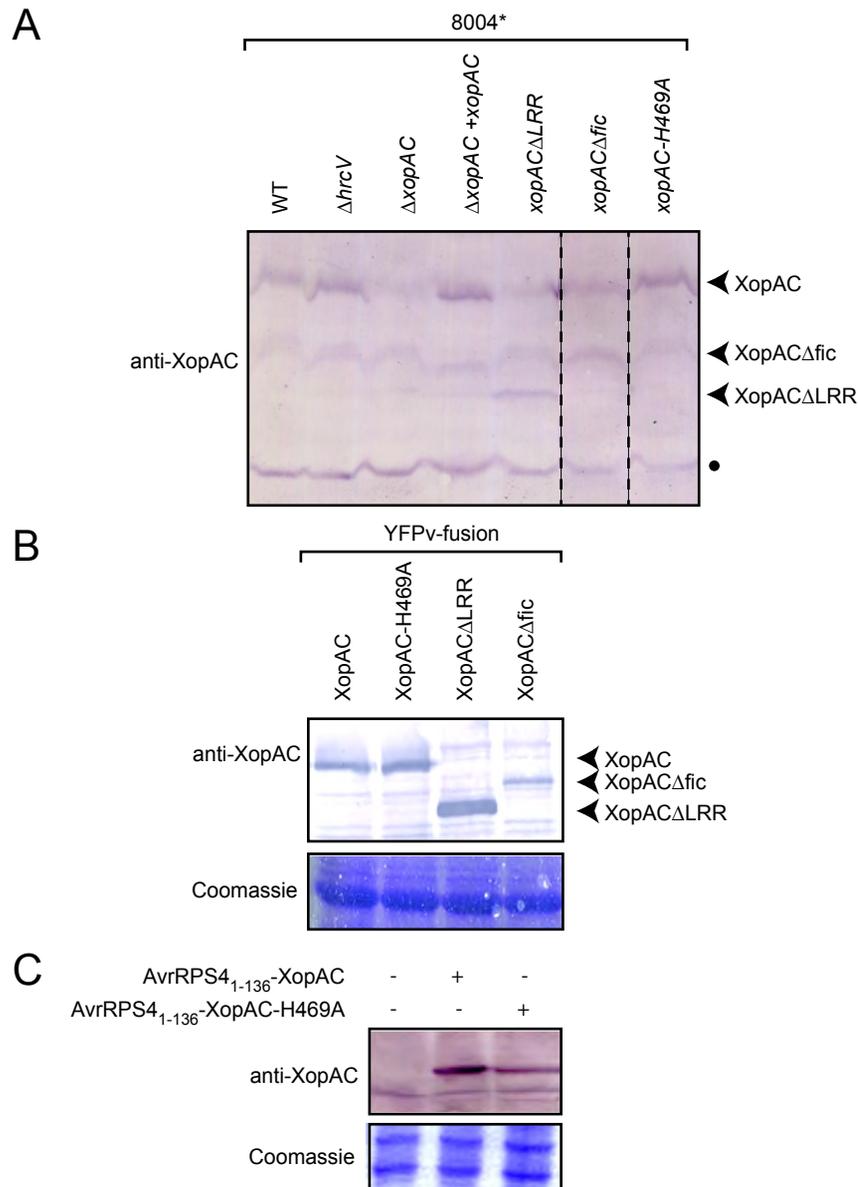
Supplementary Figure S1. The LRR and the fic domains of XopAC are not required for pathogenicity on Arabidopsis ecotype Kas. A boxplot representation of pathogenicity of wild-type *Xcc* strain 8004, *xopAC* mutants ($\Delta xopAC$, ΔLRR , Δfic , *xopAC-H469A*) and their complemented derivatives with pCZ917-*xopAC_A* (+*xopAC*) is shown: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. Bacteria were inoculated by piercing in the central vein and infection symptoms scored 7 days post inoculation. Disease index indicates: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. N=3. Each time at least 4 plants were inoculated on at least 3 leaves. No significant differences to the wild type could be observed (Tukey HSD test; $P < 0,01$).

phenotype was all the more pronounced as β -estradiol concentration increased (Figure 2D). Above 0,05 μ M β -estradiol, no true leaves were formed and primary root growth was strongly compromised. As an indirect estimate of root meristematic activity, we observed the number of cortex cells in the proximal meristem of the primary root one week after germination. In presence of 5 μ M β -estradiol, proximal meristem size was strongly reduced in lines expressing XopAC but not GFP suggesting defects in meristem activity or maintenance (Figure 2E). In conclusion, seedling growth arrest caused by inducible expression of *xopAC* is a rather slow process which affects plant physiology and growth.

XopAC induces necrosis in leaves of pepper and *Nicotiana benthamiana* plants

In order to test whether XopAC might have similar toxic effects in other plants, XopAC and its mutant variants were delivered by *Xcc* or *Agrobacterium*-mediated transformation in nonhost Pepper and *N. benthamiana* plants, respectively. High bacterial titers ($4 \cdot 10^8$ cfu/ml) of *Xcc* strains 8004 and 8004 Δ *xopAC* were force-infiltrated in the mesophyll of Early Cal Wonder (ECW) pepper leaves. Four days post inoculation, a weak necrosis was visible in the area infiltrated with wild-type *Xcc* but not visible with the *xopAC* nor the *hrcV* deletion mutants. The *hrcV* mutant is unable to secrete and translocate any T3E. In order to enhance the expression of the T3S system and its T3Es (including *xopAC*), *hrpG** derivatives of those strains were used. Strain 8004* caused a strong necrosis 4 days post inoculation which was absent with strain 8004* Δ *hrcV* and strongly reduced with strain 8004* Δ *xopAC* confirming the observations made with strains carrying a wild-type *hrpG* (Figure 3A). Strains 8004**xopAC* Δ *LRR*, 8004**xopAC* Δ *fic* and 8004**xopAC*-H469A also did not induce this tissue necrosis (Figure 3B, Supplementary Figure S3A and B). All these mutant phenotypes could be complemented with a genomic copy of the *xopAC* locus.

In parallel, Yellow Fluorescent Protein venus (YFPv) fused to XopAC variants were expressed in *N. benthamiana* leaf tissues by *Agrobacterium*-mediated transformation. Seven days post inoculation, necrotic lesions appeared on the leaf upper epidermis in areas expressing wild-type YFPv-XopAC while YFPv-XopAC-H469A, YFPv-XopAC Δ *LRR* and YFPv-XopAC Δ *fic* did not (Figure 3C, Supplementary Figure S3C). Western blot analysis of total protein extracts of the infiltrated areas with anti-XopAC antiserum showed that all YFPv fusion proteins accumulated to comparable levels (Supplementary Figure S2B). Altogether, these results indicate that the LRR domain, the *fic* domain and uridylylation activity of



Supplementary Figure S2: Accumulation and stability of XopAC variants expressed in *Xcc* 8004*, *Pst* DC3000 and *N. benthamiana*. Total protein extracts were separated by SDS-PAGE and analysed by western blot using the anti-XopAC antibody. (A) Derivatives of *Xcc* strain 8004* (*hrpG**) expressing *xopAC* variants grown in Moka medium. Black dot indicates an unspecific band used to compare loading between lanes. (B) YFPv-XopAC fusions expressed in *N. benthamiana* leaves using *Agrobacterium*-mediated transformation. Arrows indicate the position of full-length XopAC and its Δ LRR and Δ fic variants. (C) *Pst* DC3000 expressing XopAC fusions to AvrRps4 N terminus. Coomassie stained portions of the gel are shown to compare sample loading between lanes.

XopAC are required for induction of necrotic lesions on nonhost pepper and *N. benthamiana* leaves.

XopAC confers fic-dependent avirulence to the vascular pathogen *Ralstonia solanacearum* in Arabidopsis

In order to determine whether *xopAC* can confer avirulence to other vascular pathogens, XopAC and its mutant derivatives were expressed in *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) GMI1000, the causal agent of bacterial wilt in a wide range of plants. *xopAC* was expressed under the control of the promoter of the GALA7 effector (Remigi et al., 2011). *Xcc* and *Rs* T3S systems are closely related so that proteins from one genus can be secreted by the T3S system of the other genus (Rossier et al., 1999; Meyer et al., 2006). *Rs* strains expressing wild-type or mutated *xopAC* gene were inoculated on wounded Col-0 roots. Wilting symptoms were then monitored (Figure 4A and B). While the WT strain wilted all plants at 11 dpi, the *hrcV* mutant and the strain expressing wild-type *xopAC* did not cause any visible wilting symptoms (Figure 4A). This *xopAC*-mediated avirulence was dependent on the H469 residue since the *Rs* strain expressing *xopAC*-H469A was fully virulent (Figure 4A). Finally, this *xopAC*-mediated avirulence of *Rs* was correlated with a significant decrease in bacterial growth (20-fold) but not as strong as the decrease observed with the *hrcV* mutant (Figure 4B). In conclusion, *xopAC*-mediated vascular ETI is fully efficient against another vascular bacterial pathogen than *Xcc* and recruits the same functional domains as for *Xcc* 8004 avirulence on Col-0.

XopAC also confers avirulence to the mesophyll pathogen *P. syringae* on Arabidopsis

To learn whether *xopAC*-triggered immunity can also be observed in the mesophyllic tissues, *xopAC* was introduced in the mesophyll-colonizing pathogen *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strain DC3000. The pEDV6 vector was used to express a fusion of the N-terminus of the *Pst* effector AvrRPS4 with XopAC to ensure its efficient delivery by *Pst* T3S system (Sohn et al., 2007). Three days-post infiltration of Col-0 plants, *Pst* expressing the *xopAC* fusion caused reduced chlorotic symptoms compared to WT only when low inocula were employed (5.10^5 cfu/ml; Figure 4C). Furthermore, this phenotype was dependent on H469 similarly to *Xcc* 8004 avirulence on Col-0. Importantly, this reduced chlorosis was correlated with a reduced growth of *Pst* strain expressing WT *xopAC* compared to a wild-type *Pst* strain or a *Pst* expressing *xopAC*-H469A (Figure 4D). XopAC and XopAC-H469A fusion proteins

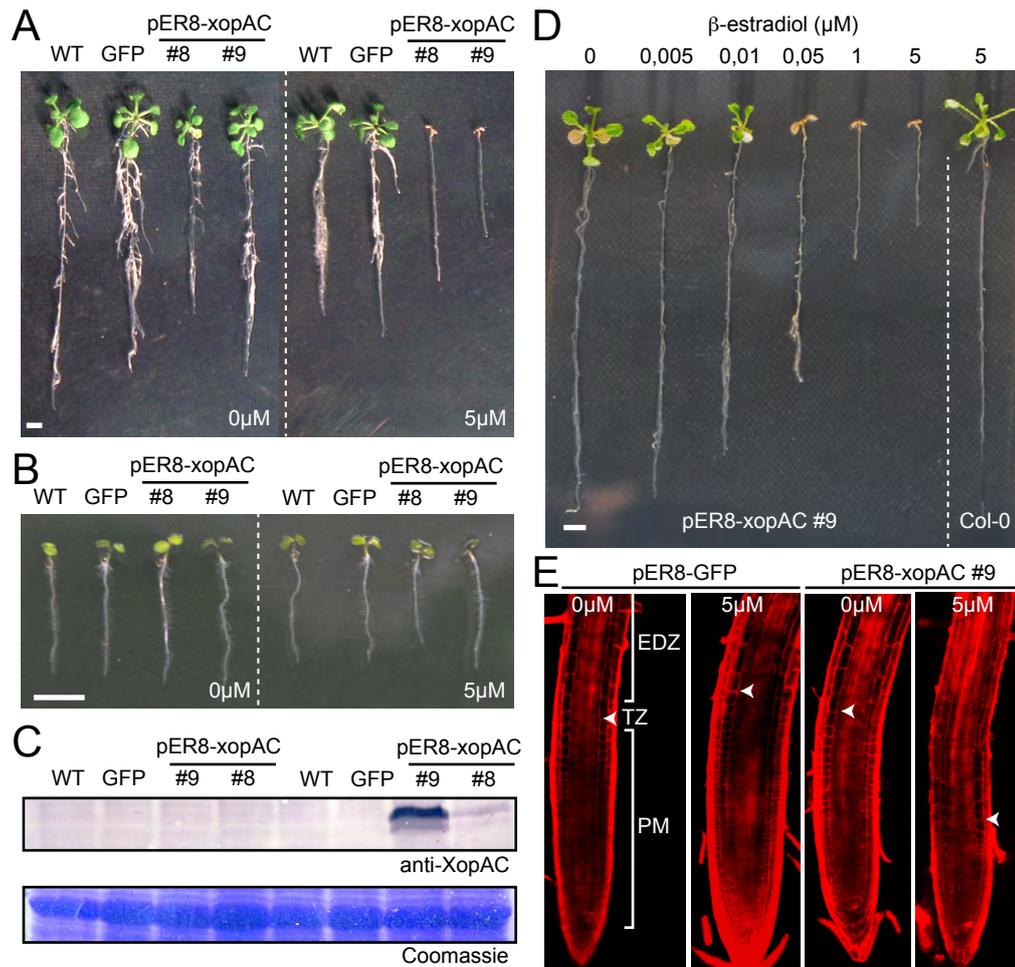


Figure 2. XopAC induces seedling growth arrest in Arabidopsis ecotype Col-0. Arabidopsis Col-0 transgenic plants expressing *GFP* (pER8-GFP) or *xopAC* (pER8-xopAC; lines #8 and #9) under the control of a β -estradiol-inducible promoter were studied for β -estradiol-dependent growth defects (A, B, D, E) and XopAC accumulation (C). (A, B) Seeds were directly germinated on vertical MS/10 agar plates supplemented with 0 or 5 μ M β -estradiol and imaged 4 (B) and 14 days (A) post germination. Scale: 5 mm. (C) Seven-days-old seedlings germinated on vertical MS/10 agar plates were transferred to plates containing 0 or 5 μ M β -estradiol and incubated for 48 hrs. Total protein extracts from those seedlings were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot using the anti-XopAC antibody. Coomassie staining of a duplicate SDS-PAGE is presented as loading control. (D) Col-0 and pER8::xopAC line #9 were directly germinated on vertical MS/10 agar plates supplemented with 0 to 5 μ M β -estradiol and imaged 14 days post germination. Scale: 5 mm. (E) One-week-old seedlings germinated on MS/10 supplemented or not with 5 μ M β -estradiol were stained with propidium iodide and observed by confocal laser scanning microscopy to visualize the number of cortex cells in the proximal meristem (PM). The transition zone (TZ) is indicated by an arrowhead. EDZ: elongation-differentiation zone.

accumulated to comparable levels in total bacterial extracts (Supplementary Figure S2C). These results demonstrate that *xopAC* can function as a bona fide avirulence protein in the mesophyll against a mesophyll-colonizing pathogen and that *xopAC*-induced ETI can be effective both in vascular and mesophyllic tissues. These results contrast with previous studies performed with *Xcc* (Xu et al., 2008): *xopAC*-mediated avirulence in the mesophyll could not be observed in *Xcc* when high bacterial titers (10^8 cfu/ml) were used for infiltration of Col-0. Thus, WT strain 8004 and its $\Delta xopAC$ mutant were infiltrated in Col-0 and Kas plants at 10^8 and 10^5 cfu/ml. No differences of symptoms between the two strains could be observed (Figure 4E, Supplementary Figure S4A). Furthermore, growth of both strains was similar in both ecotypes (Figure 4F, Supplementary Figure S4B). Thus, *xopAC* is unable to confer avirulence to *Xcc* in the mesophyll whatever the bacterial inoculum used, in contrast to our previous observations with *Pst*. Yet, *Xcc* multiplication in the mesophyll was important (over 1000 fold in 3 days) indicating that *Xcc* is well adapted to colonize this tissue.

XopAC localization to the plant plasma membrane is LRR-dependent

XopAC subcellular localization was determined by *Agrobacterium*-mediated expression of YFPv fusions to XopAC variants (XopAC-H469A, XopAC Δ LRR and XopAC Δ fic) in *N. benthamiana* leaf epidermis cells. Accumulation and stability of the different YFPv-XopAC proteins was verified by Western blot analysis (Supplementary Figure S2B). Interestingly, YFPv fusions to XopAC, XopAC-H469A and XopAC Δ fic localized to the plasma membrane while XopAC Δ LRR was observed in nuclei, cytosol and cytoplasmic strands (Figure 5). XopAC plasma membrane localization was confirmed by co-localization with the RLCK(At4g23740)-CFP fusion known to be addressed to the plasma membrane (Figure 5A, Liu et al., 2011). Since no membrane-targeting signal nor transmembrane domain could be predicted in XopAC, its subcellular localization might be the result of a LRR-mediated interaction to a membrane-associated protein.

XopAC interacts with a subfamily of the Arabidopsis receptor-like cytosolic kinases in yeast two-hybrid

In order to try and identify XopAC interactors, a LexA-based yeast two-hybrid screen (Gyuris et al., 1993) was performed against a normalized Col-0 cDNA library (*Arabidopsis thaliana* universal, 5.6 million clones, Dualsystems Biotech). Because the H348A mutation (equivalent

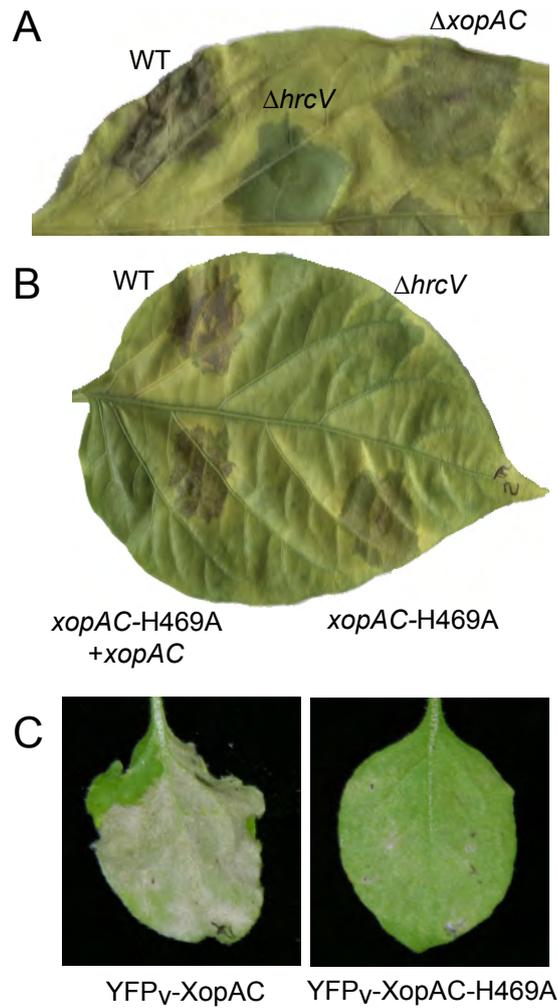
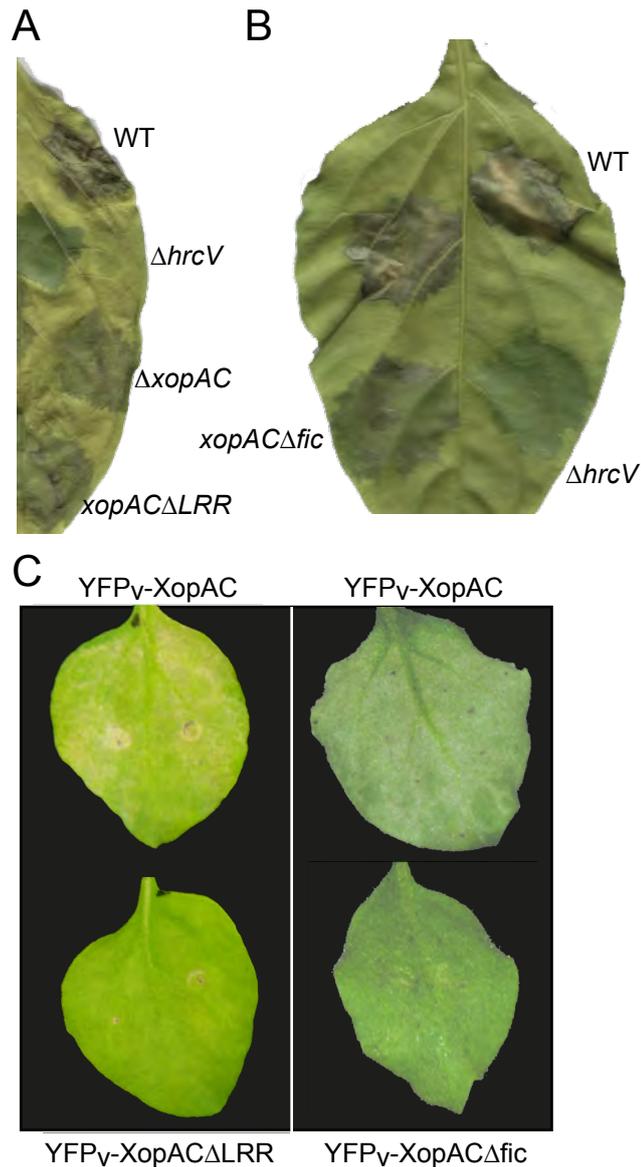


Figure 3: XopAC induces necrosis in pepper and *N. benthamiana* leaves. (A, B) *Xcc* 8004* strain-derivatives expressing wild-type (WT) or mutated *xopAC* were inoculated at $4 \cdot 10^8$ cfu/ml in ECW pepper leaves and photographed 4 days post-inoculation. The $\Delta hrcV$ and $\Delta xopAC$ deletion mutants, the *xopAC-H469A* mutant and its complemented derivative with pCZ917-*xopAC*_A (+*xopAC*) were tested. (C) YFP_v-XopAC and its mutant variant YFP_v-XopAC-H469A were expressed in leaves of *N. benthamiana* using *Agrobacterium*-mediated transient transformation. Pictures of the upper leaf surface were taken 7 days post infiltration.

of the H469A in XopAC) in the fic domain of VopS T3E from *Vibrio parahaemolyticus* was shown to stabilize the interaction with its substrate in pull-down assays (Yarbrough et al., 2009), full length XopAC-H469A was used as bait. From 2 million primary transformants, 68 bait-dependent interactors were isolated and corresponded to 50 putative interactors of XopAC (PIX) genes in the Arabidopsis genome. Remarkably, eight PIX genes (PIX 1, 7, 8, 13, 14, 15, 16 and 17) represented by eleven independent cDNA fragments (Table 1) belonged to the receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) subfamily VII of the receptor-like kinases (RLK, Shiu and Bleecker, 2001). To date, kinase activity was reported for two of these PIX-RLCK proteins (PIX8 and 15, Hirayama and Oka, 1992; Liu et al., 2011). RIPK/ACIK1A/PIX8 is the only interactor with a reported biological function in plant innate immunity and a known interactor/substrate of XopAC (Liu et al., 2011; Feng et al., 2012). More than 600 RLK have been identified in the Col-0 genome (Shiu and Bleecker, 2001). Though RLK functions are mostly unknown, RLK are proposed to be involved in nearly every aspect of plant life including growth, development or immunity (Afzal et al., 2008). Based on protein similarities, we have further subdivided RLCK subfamily VII into subfamilies VIIa and VIIb. Interestingly, all PIX-RLCK proteins belonged to the subfamily VIIa (Figure 6A) in which the two known substrates of XopAC BIK1 (Botrytis-induced kinase, Veronese et al., 2006) and RIPK can be found (Feng et al., 2012) as well as other players of plant innate immunity such as ACIK1B (Avr9/Cf-9 induced Kinase, Rowland et al., 2005) or PBL1 (PBS1-like, Zhang et al., 2010). Overlap between the different partial cDNA fragments identified in this yeast two-hybrid screen delimits a highly conserved minimal interaction domain of 45-46 residues (Supplementary Figure S5). This region encompasses the kinase catalytic domain (domain VI) of the RLCK and is situated directly upstream of the uridylylation site of RIPK and BIK1 (Feng et al., 2012).

Interaction of full-length PIX8-RIPK with XopAC variants was tested in the yeast two-hybrid system. While PIX8/XopAC-H469A interaction could be observed, no interaction with wild-type XopAC, XopAC Δ LRR or XopAC Δ fic could be detected though proteins accumulated to similar levels by western blot analysis (Figure 6B, Supplementary Figure S6). The central kinase domain of RIPK (residues 87-367) interacted specifically with XopAC_H469A but not with wild-type XopAC (Supplementary Figure S6A). Two other full-length RLCK PIX1 and PIX7 were tested for their interaction with XopAC. PIX1 interacted with wild-type XopAC but not with XopAC-H469A while PIX7 interacted with both XopAC variants (Figure 6B).



Supplementary Figure S3: Induction of necrosis by XopAC in pepper and *N. benthamiana* leaves depends on XopAC LRR and fic domains. (A, B) *Xcc* 8004* strain-derivatives expressing wild-type (WT) or mutated *xopAC* were inoculated at 4.10^8 cfu/ml in ECW pepper leaves and photographed 4 days post-inoculation. The $\Delta hrcV$, $\Delta xopAC$, $xopAC\Delta fic$ and $xopAC\Delta LRR$ mutants were tested. (C) YFP_v-XopAC and its mutant variants YFP_v-XopAC Δ LRR and YFP_v-XopAC Δ fic were expressed in leaves of *N. benthamiana* using *Agrobacterium*-mediated transient transformation. Pictures of the upper leaf surface were taken 7 days post infiltration.

These results suggest that, besides RIPK and BIK1, XopAC might have the potential to interact with other members of the RLCK VIIa subfamily.

PBL2 and RIPK are needed for *xopAC*-triggered immunity in Col-0

To determine whether these RLCK might be important to mount resistance against *Xcc* strains expressing *xopAC*, several RLCK mutants (*ripk*, *pbs1*, *pbl1*, *pbl2*, *bik1/pbl1* and *cst*) were inoculated with *Xcc* strain 8004 by piercing. *CAST AWAY (CST)* gene encodes an *RLCK* of the subfamily VIIa which is important for organ abscission (Burr et al., 2011). *cst* mutant was included as control. Eight days-post inoculation, the *ripk* and *pbl2* mutants developed significant disease symptoms (Figure 7A and B). Yet, the *ripk* mutant was less susceptible than the ecotype Kas or the *pbl2* mutant. The *ripk* mutant could be complemented by overexpression of RIPK-HA indicating that *RIPK* is genetically important for *xopAC*-triggered immunity. Interestingly, *RIPK* positively regulates the *RPM1*- and *RIN4*-dependent *avrB*-triggered immunity (Liu et al., 2011). Because XopAC and AvrB are both members of the fido family (*fic*, *doc* and AvrB, Kinch et al., 2009) and might share other signalling components, the *rpm1* and the *rps2/rin4* mutants were inoculated with strain 8004 by piercing (Figure 7A). The *rps2/rin4* mutant was used because a *rin4* mutant is not viable (Mackey et al., 2002). These two mutants were as resistant as the wild-type Col-0 plants. In agreement with these observations, *in planta* growth of strain 8004 was significantly higher in the *pbl2* mutant (Figure 7C). Bacterial populations in the *ripk*, *pbs1* and *pbl1* mutants and the wild-type plants were comparable. These Arabidopsis mutants showed wild-type susceptibility to the 8004 Δ *xopAC* mutant strain (Supplementary Figure S7). 8004 Δ *xopAC* growth was not affected in the different Arabidopsis mutants tested (Supplementary Figure S7). These results suggest that *PBL2*, and *RIPK* to a lesser extent, positively regulate *xopAC*-triggered immunity.

Discussion

XopAC can trigger ETI against both vascular and mesophyll-colonizing bacterial pathogens

Previous studies have shown that *xopAC* could restrict *Xcc* growth in the vasculature of Col-0 but not in Sf-2 ecotypes of Arabidopsis (Meyer et al., 2005; Xu et al., 2008). In this study, we provide evidence that *xopAC* is able to confer avirulence to other phytopathogenic bacteria. In

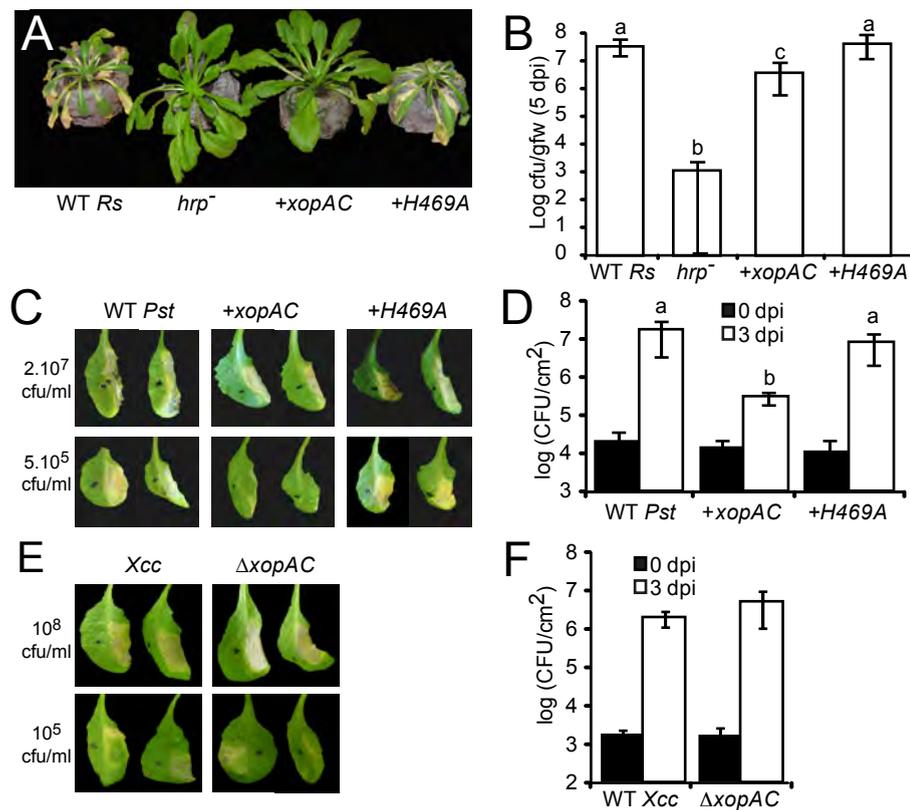
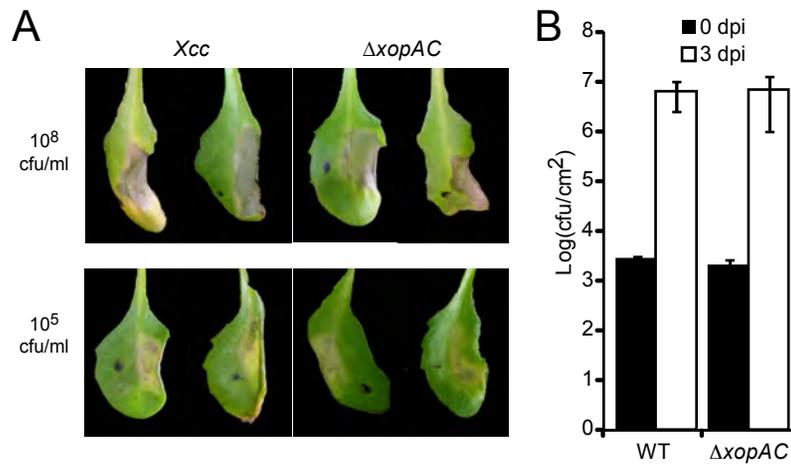


Figure 4. *xopAC* can confer avirulence to *Pst* DC3000 and *Rs* GM11000 on Arabidopsis ecotype Col-0. (A, B) Wild-type and *hrcV* (*hrp*⁻) mutant of *Rs* GM11000 or strain derivatives carrying *xopAC* (+*xopAC*) or *xopAC-H469A* (+*H469A*) were inoculated by root dipping of four-weeks-old plants (Col-0; susceptible to GM11000). (A) Pictures were taken at 11 days post inoculation. (B) Bacterial populations in the aerial parts of the plants were determined at 5 dpi and expressed as log of colony-forming units per gram of fresh weight (cfu/gfw). For each strain, three samples of three plants each were analysed. Two independent experiments were performed. Statistical groups were determined using a Wilcoxon test ($P < 0,003$) and indicated by different letters. (C, D) Leaves of four-weeks-old Col-0 plants were infiltrated with wild-type *Pst* DC3000 or derivatives carrying pEDV6-*xopAC* (+*xopAC*) or pEDV6-*xopAC-H469A* (+*H469A*). (C) Bacterial suspensions of *Pst* at 2.10^7 cfu/ml or 5.10^5 cfu/ml were used and pictures were taken 3 days post inoculation. (D) Bacterial suspensions at 5.10^5 cfu/ml were infiltrated in leaves. *In planta* bacterial populations in the inoculated areas were determined 0 and 3 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on two independent experiments with three samples of two leaf discs from different plants for each strain. Statistical groups were determined using a Wilcoxon test ($P < 0,012$) and indicated by different letters. (E, F) Four-weeks-old Col-0 plants were inoculated by hand infiltration with wild-type *Xcc* strain 8004 and 8004 Δ *xopAC*. (E) Bacterial suspensions of *Xcc* at 10^8 cfu/ml or 10^5 cfu/ml were used and pictures were taken 4 days post inoculation. (F) *Xcc* strains were infiltrated at a bacterial density of 10^5 cfu/ml. *In planta* bacterial populations in the inoculated areas were determined 0 and 3 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on three independent experiments with three samples of two leaf discs from different plants for each strain. No statistically significant groups could be identified using a Wilcoxon test ($P < 0,05$).

particular, the vascular pathogen *Rs* expressing XopAC did not cause any wilting symptoms on Col-0 plants similar to a T3S mutant. Bacterial populations in plant shoots were also significantly reduced. This indicates that the immune responses triggered by XopAC can be efficient against other vascular pathogens and that the genetic dissection of this particular ETI could help to identify novel targets to manage/control other vascular pathogens such as *Rs*. XopAC also conferred avirulence to *Pst* DC3000 in Col-0 ecotype but not Kas when infiltrated at low bacterial densities. This result indicates that *xopAC* has the potential to be recognized in the mesophyll and to trigger a potent ETI in this tissue. This is further supported by the *xopAC*-dependent necrotic responses observed in both pepper and *N. benthamiana* leaves. Yet, such ETI could not be observed when *Xcc* was infiltrated even at low bacterial densities in leaf mesophyll (Figure 4E and F, Meyer et al., 2005; Xu et al., 2008). The number of inoculated bacteria (few hundreds by piercing versus millions by infiltration) cannot explain this *Pst/Xcc* paradox. Among the different possibilities, higher expression levels of plasmid-born *xopAC* in *Pst* could be an explanation for a stronger ETI with *Pst* than *Xcc*. Alternatively, *Xcc* might express a T3E absent from *Pst* which could be able to suppress *xopAC* ETI in the mesophyll. Further investigations will be needed to fully explain these observations. In conclusion, *xopAC* cannot be considered as a vasculature-specific avirulence determinant which suggests that its pathogenicity and/or avirulence targets can be found both in mesophyll and vascular tissues.

Host and nonhost plant responses to XopAC: avirulence or pathogenicity functions?

Physiological responses triggered by *xopAC* seemed rather slow for an avirulence protein: Onset of a necrosis on *N. benthamiana* was only observed at 7 dpi and 3 dpi on pepper plants. Similarly, transgenic expression of *xopAC* in Col-0 impacted visibly on Arabidopsis development only 7-10 days-post-germination and lead ultimately to a complete arrest of seedling growth. This suggests that the activity or maintenance of shoot and root meristems is strongly impaired by *xopAC* expression. When *xopAC* expression was induced by infiltration of 5 μ M β -estradiol on adult plants, we failed to see macroscopic phenotypes. The kinetic of these responses contrasts with inducible *avrRpm1* and *avrB* expression in the resistant and susceptible ecotypes, respectively: Induction of *AvrRpm1* expression in adult leaves caused HR as early as 5-7 hours after β -estradiol treatment (Tornerio et al., 2002). Similarly, DEX-inducible expression of *avrB* caused strong chlorosis in less than 2 days after infiltration of DEX in adult leaves (Eitas et al., 2008). Thus *xopAC* does not seem to induce a rapid nor a



Supplementary Figure S4. Symptoms development and *in planta* growth of *Xcc* strain 8004 infiltrated into leaves of Arabidopsis ecotype Kas are not affected by XopAC. (A) Wild-type *Xcc* strain 8004 and 8004 $\Delta xopAC$ were force-infiltrated at bacterial densities of 10^5 and 10^8 cfu/ml in four-weeks-old Arabidopsis plants ecotype Kas. Pictures were taken at 5 days post inoculation. (B) *Xcc* strains were infiltrated into leaves of Arabidopsis ecotype Kas at a bacterial density of 10^5 cfu/ml. *In planta* bacterial populations in the inoculated areas were determined 0 and 3 days post inoculation (dpi) and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on three independent experiments with three samples of two leaves disc from different plants for each strain. No statistically significant groups could be identified using a Wilcoxon test ($P < 0,05$).

strong HR-like response *in planta* which suggests that *xopAC*-triggered immunity might not rely on rapid cell death and that it might differ mechanistically from other ETIs. Interestingly, resistance against bacterial pathogens can be achieved without cell death (Al-Daoude et al., 2005) and *xopAC*-triggered ETI might be too weak to induce HR as exemplified by *TAOI*-dependent recognition of *avrB* (Eitas et al., 2008). Importantly, XopAC fic domain and its conserved H469 residue which are important for UMP transferase activity *in vitro* (Feng et al., 2012) are also essential for *xopAC* avirulence function and necrosis induction in nonhost plants. Thus, XopAC uridylylation activity cannot be uncoupled from XopAC biological functions and *xopAC*-triggered immunity likely results from host target uridylylation. It remains unclear whether those *xopAC*-dependent phenotypes observed on host and nonhost plants reflect avirulence or pathogenicity functions of *xopAC*. The biological relevance of the seedling growth arrest phenotype should be legitimately questioned. For instance, *Xcc* is not known to target meristematic tissues during natural infections. Yet, this phenotype could serve as a read-out for *in planta* activity of XopAC and help for the identification of its avirulence or pathogenicity targets as exemplified by *avrB* and *avrRpm1* suppressor screens which identified multiple genes/alleles important for the ETI triggered by these two T3E (Tornerio et al., 2002; Eitas et al., 2008).

Plasma membrane-localized XopAC interacts with members of the RLCK subfamily VIIa

In our search for XopAC targets, we identified eight Arabidopsis RLCK proteins as the major class of XopAC-H469A interactors by yeast two-hybrid. The H469A mutation was used since the orthologous mutation in VopS was shown to stabilize the interaction with Rho-GTPases (Yarbrough et al., 2009). Yet, validation of the interactions with full length RLCK cDNAs showed that the interaction could be reconstituted with wild-type or mutant XopAC or both depending on the RLCK studied. The biological relevance of some of these interactions was recently demonstrated by the identification of *xopAC*-dependent uridylylation of three RLCK (BIK1, PBL1 and RIPK) resulting in the inhibition of their kinase activity (Feng et al., 2012). Several of those RLCK like BIK1 and to a lesser extent PBL1 and PBL2 are positive regulators of PTI downstream of EFR, FLS and CERK1 while RIPK is a negative regulator of PTI (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2011). Several RLCK like RIPK or CST localize to the plasma membrane and many possess predicted myristoylation or palmitoylation sequences in their N-terminus (Zhang et al., 2010; Burr et al., 2011; Liu et al., 2011). Interestingly, XopAC

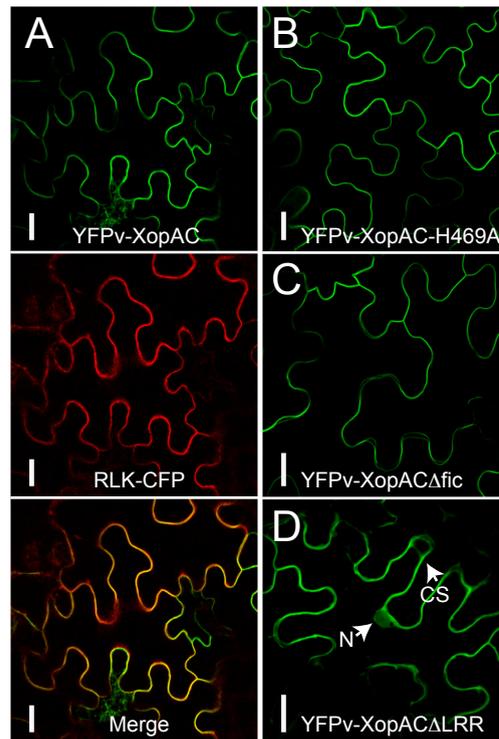


Figure 5. The LRR domain is required to target XopAC to the plasma membrane of *Nicotiana benthamiana* epidermal cells. YFPv-XopAC (A) and mutant variants (B, YFPv-XopAC-H469A; C, YFPv-XopAC Δ fic and D, YFPv-XopAC Δ LRR) were expressed using *Agrobacterium*-mediated transient transformation and imaged in epidermal cells by confocal laser microscopy 48 hours after inoculation. (A) The plasma membrane localized RLK-CFP fusion (At4g23740, Liu *et al.* 2011) was co-transformed with YFPv-XopAC and used as control. The merged picture is shown. Scale bars = 25 μ m. White arrowheads indicate nuclei (N) and cytoplasmic strands (CS).

also localizes to the plasma membrane in *N. benthamiana* leaves though lacking membrane-anchoring motifs. This association to the plasma membrane is dependent on XopAC highly conserved LRR domain which is needed to interact to BIK1 and RIPK (Feng et al., 2012). Thus, it is tempting to propose that XopAC subcellular localization is achieved by interaction of its N-term-LRR domains to membrane-associated RLCKs. In our yeast-two hybrid screen, only cDNAs of the RLCK subfamily VIIa were identified. Its substrates BIK1, PBL1 and RIPK also belong to that group. These results suggest that XopAC might associate preferentially to this RLCK subfamily VIIa though the ST or TT uridylylated residues are highly conserved throughout subfamily VII. *In planta* interaction studies as well as uridylylation tests will be needed to address this question. In the PTI context, BIK1 probably remains the most relevant XopAC target. Because RLCK are highly conserved kinases, interaction to RLCKs does not have to be highly specific of few biologically important RLCK: a global inhibition of all RLCK subfamily VIIa members including BIK1, PBL1 or RIPK would be sufficient to achieve PTI suppression. Such inhibition of the RLCK subfamily VIIa by XopAC is very reminiscent of the proteolytic cleavage of many RLCK of subfamilies VIIa and VIIb by AvrPphB (Zhang et al., 2010). This observation further defines the RLCK family as a prime pathogenicity target for bacterial pathogens to suppress PAMP-triggered immunity or other RLCK-dependent physiological responses.

***xopAC*-dependent ETI in *Arabidopsis* depends on RIPK and PBL2**

While *xopAC*-mediated suppression of PTI is rather well understood, the mechanisms required for *xopAC*-triggered immunity against *Xcc* are lacking. In this study, we identified the RIPK and PBL2 RLCKs as critical components of this ETI. ETI suppression in the *pbl2* mutant is unexpected since this kinase was so far only known as a positive regulator weakly needed to respond to flg22 and efl18 but not chitin (Zhang et al., 2010). Yet, *pbl2* susceptibility to *Xcc* strain 8004 was important both in terms of disease symptoms and bacterial growth. Importantly, *pbs1*, *pbl1*, *bik1/pbl1* or *cst* mutants were fully resistant suggesting that *PBL2* is specifically recruited to mount this ETI. The *ripk* mutant showed an intermediate susceptibility to *Xcc* strain 8004 for disease symptoms, but sustained wild-type bacterial growth. RIPK is needed for the *RPM1*-specified ETI, interacts with AvrB and RIN4 and can phosphorylate both AvrB and RIN4 (Liu et al., 2011). Phosphorylation of RIN4 then activates RPM1 and the subsequent ETI response. In a compatible interaction between *Xcc* and its host, XopAC can uridylylate RIPK and consequently suppress the *RPM1*-specified

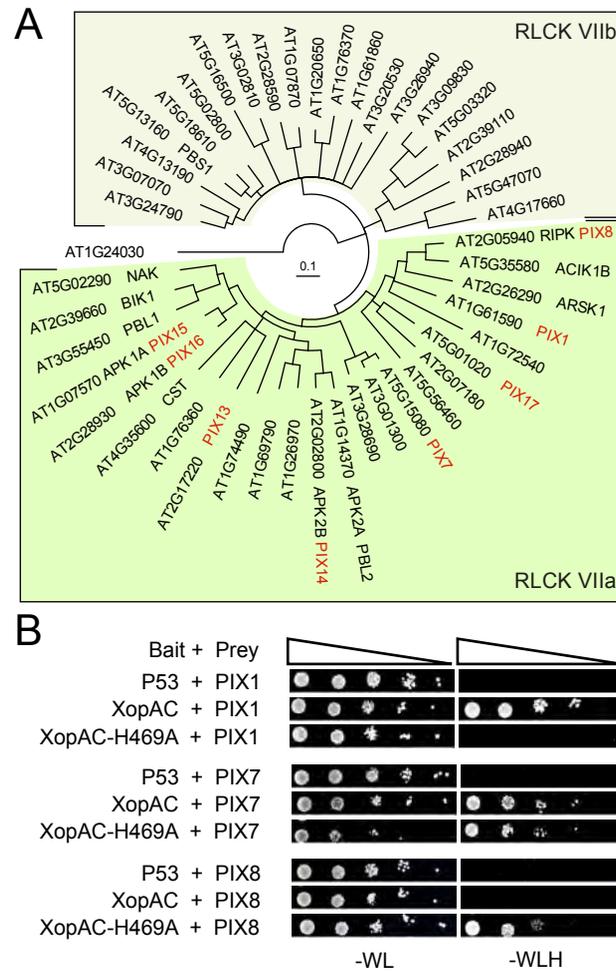


Figure 6. XopAC interacts with several members of the RLCK VIIa subfamily. (A) Neighbour-joining consensus tree of the 45 full-length Arabidopsis RCLK proteins aligned using Geneious alignment with default settings. AT1G24030 protein kinase was used to root the tree. Shaded areas define the two subfamilies VIIa and VIIb of RLK. PIX-RLCK proteins identified in the yeast two-hybrid screen with XopAC-H469A are indicated in red. Published protein names are indicated when available. (B) Yeast two-hybrid interaction test between XopAC or its mutant allele H469A as baits and full-length PIX1, PIX7 or PIX8-RIPK as preys. P53 was used as specificity control for the preys. Ten-fold serial dilutions of yeast transformants were spotted from left to the right on minimal medium (-WL) and medium without histidine (-WLH) which is used to visualize prey/bait interaction. Pictures were taken 4 days after spotting.

ETI (Feng et al., 2012). The partial susceptibility of the *ripk* mutant could be explained in several ways: Functional redundancy of *RIPK* with one of *RIPK* close homologues (such as ACIK1B/PBL13) is an obvious option. Also, *RIPK* acts as a negative regulator of PTI so that its inhibition might mask ETI breakdown. Whether *PBL2*- and *RIPK*-dependent ETI act independently or additively is not known. Interestingly, the *RIPK*-dependent ETI against *Xcc* did not genetically require *RIN4* nor *RPM1*. On the one hand, *RIPK* could signal through *RIN4/RPM1*-independent signalling cascades remaining to be identified. On the other hand, genetic redundancy in the *RIN4* and *RIN4*-like proteins might blur our analyses (Afzal et al., 2011). Further experimental evidence will be needed to establish the recruitment of the *RIN4/RPM1* signalling module in *xopAC*-triggered immunity. To conclude, our results are very reminiscent of *PBS1* being a decoy guarded by *RPS5* to detect AvrPphB-dependent degradation of other RLCKs important for PTI (van der Hoorn and Kamoun, 2008; Zhang et al., 2010). During the *xopAC*-mediated ETI against *Xcc* in Arabidopsis, *PBL2* and/or *RIPK* could well be decoys detecting uridylylation and inhibition of RLCKs important for plant innate immunity such as *BIK1*.

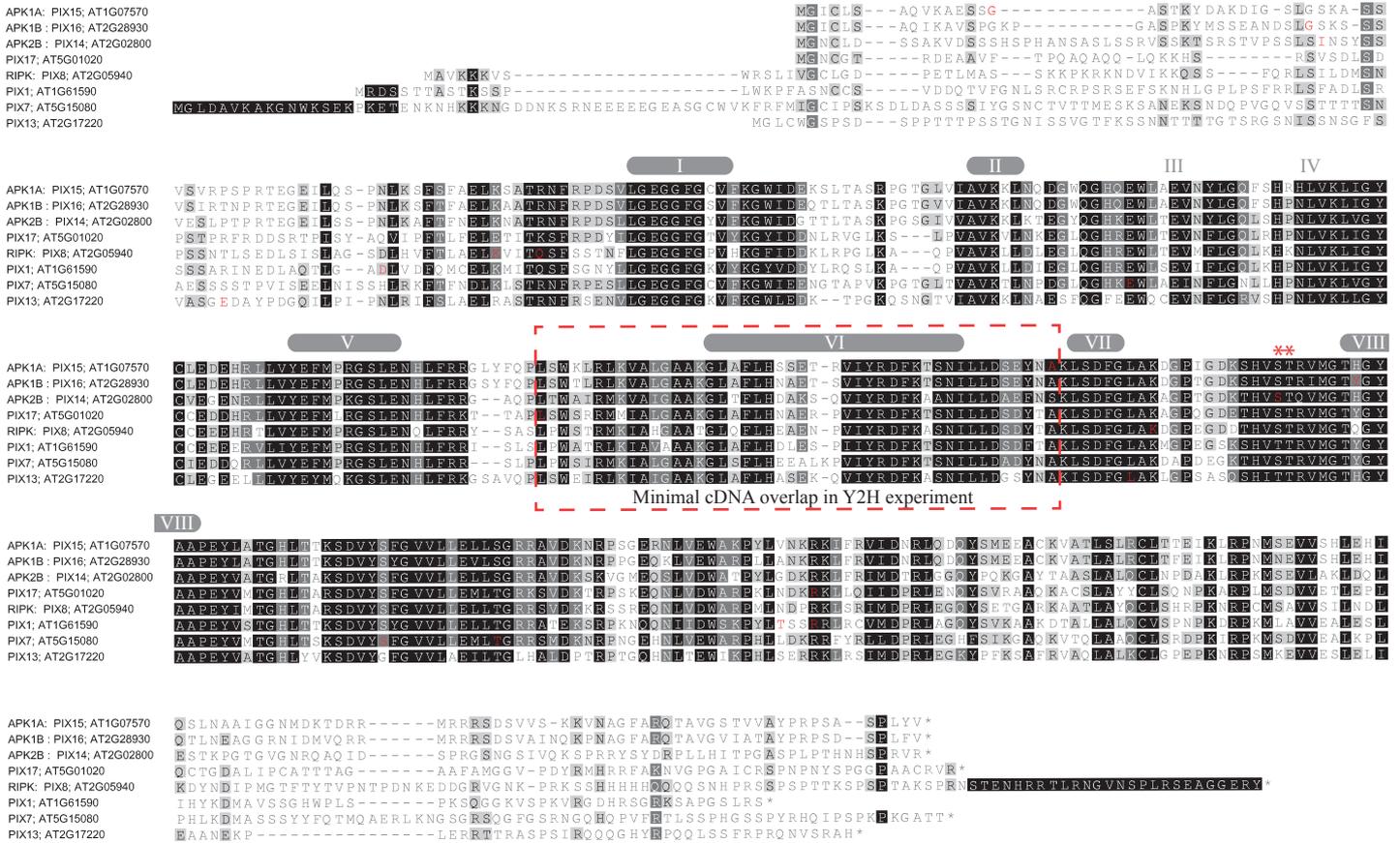
Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S1. *Xcc*, *A. tumefaciens*, *Rs* and *Pst* strains were grown at 28°C in MOKA (Blanvillain et al., 2007), in yeast extract-Beef (YEB), complete medium BG (Boucher et al., 1985) and King's B (KB, King et al., 1954) media, respectively. *Escherichia coli* cells were grown on Luria-Bertani medium at 37°C. For solid media, agar was added at a final concentration of 1.5% (w/v). Antibiotics were used at the following concentrations: for all bacteria, 50 µg/ml kanamycin 50 µg/ml rifampicin, 50 µg/ml ampicillin; for *Xcc*, 5 µg/ml tetracycline; for *A. tumefaciens*, 15 µg/ml gentamycin, 100 µg/ml spectinomycin and 5 µg/ml tetracycline; for *Pst*, 50 µg/ml gentamycin; for *Rs*, 40 µg/ml spectinomycin, 5 µg/ml gentamycin; for *E. coli*, 40 µg/ml spectinomycin and 10 µg/ml tetracycline.

Plant material and growth conditions

Wild-type Col-0 and Kas ecotypes were used as well as mutants in the Col-0 genetic background: *ripk* (GT22343 backcrossed into Col-0) and *ripk* 35S-*RIPK*-HA (line 16-5, Liu et



Supplementary Figure S5. Protein alignment of the eight full-length PIX proteins belonging to the RLCK family identified by yeast two-hybrid as putative interactors of XopAC-H469A. Alignment was performed using Geneious alignment default parameters. Black, grey and light grey highlighting of amino acids indicates, 100%, 80-100% and 60-80% of similarity, respectively. The two red asterisks indicate the Serine-Threonine residues of RIPK/PIX8 uridylylated by XopAC (Feng et al., 2012). Amino acids corresponding to the borders of the cDNA clones identified by yeast two-hybrid are highlighted in red. A red frame represents the minimal overlap between these 11 different cDNA identified in yeast two-hybrid screen. The 8 conserved kinase domains are indicated with roman numerals.

al., 2011), *rps2-101C* (Yu et al., 1993), *rps2-101C/rin4* (Mackey et al., 2003), *rpm1-3* (Grant et al., 1995), *pbs1-1* (Warren et al., 1999), *pbl1* (SAIL_1236_D07), *pbl2* (SALK_149140, Zhang et al., 2010) and *cst-1* (Burr et al., 2011). Arabidopsis plants were grown on Jiffy pots in a growth chamber at 22°C, with a 9-h light period and a light intensity of 192 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sterile Arabidopsis seedlings were also grown vertically on solid MS/10 (Murashige and Skoog) containing 0,5% sucrose. After 2 days at 4°C, plates were transferred in a growth chamber at 20°C with 16-h light period. Pepper Early Cal Wonder (ECW) and *N. benthamiana* plants were grown in temperate greenhouses.

Pathogenicity tests

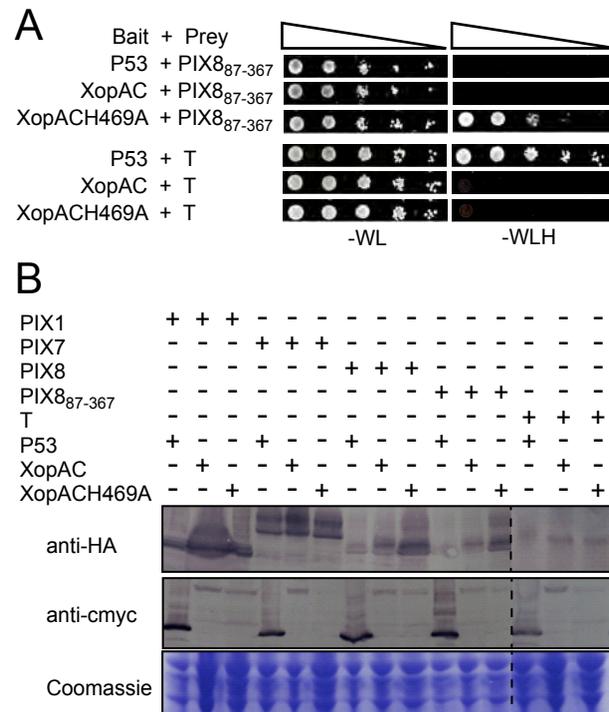
Xcc pathogenicity was assayed on the *A. thaliana* accessions Columbia (Col-0) and Kashmir (Kas) by piercing inoculation of bacterial suspension at 10^8 cfu/ml as described (Meyer et al., 2005). Each strain was tested on 4 plants with 4 leaves per plant. *Xcc* pathogenicity was also assayed on *A. thaliana* by infiltration of bacterial suspensions at 10^5 and 10^8 cfu/ml as described (Meyer et al., 2005).

Xcc pathogenicity was assayed on 5-weeks-old pepper ECW plants by infiltration with a bacterial suspension at $4\cdot 10^8$ cfu/ml. After inoculation, plants were transferred in a growth chamber at 21°C, with a 16-h light period and 70% hygrometry.

Pst pathogenicity was assayed on the *A. thaliana* Col-0, by infiltration of bacterial suspensions at $2\cdot 10^7$ cfu/ml. Each strain was tested on 6 plants with 4 leaves per plant. After inoculation, plants were kept at nearly 100% relative humidity.

Rs pathogenicity was assayed on the *A. thaliana* Col-0 by root inoculations essentially as described (Deslandes et al., 1998): Approximately 2 cm was cut from the bottom of the Jiffy pot and the exposed roots of the plants were immersed for 15 min in a bacterial suspension containing 10^7 bacteria/ml. The plants were then transferred to a growth chamber at 27°C (16 h light): 26°C (8 h dark) until symptom appearance. Disease development was scored daily, using a macroscopic scale describing the observed wilting: 1 for 25% of the leaves wilted; 2 for 50%; 3 for 75% and 4 for complete wilting. The plants were grown at 25°C.

At least three independent repetitions were performed for all pathogenicity tests. Statistical analysis was performed using a fixed effect model and a Tukey HSD test with correction for multiple testing. All analyses were performed using R software version 2.14.1 (www.r-project.org).



Supplementary Figure S6. XopAC-H469A interacts with the PIX8 kinase domain in a yeast two-hybrid assay. (A) Yeast two-hybrid interaction test between XopAC or its mutant allele H469A as baits and PIX8₈₇₋₃₆₇ and T antigen as preys. The T antigen is a known interactor of P53 and was used as specificity control for the baits. Ten-fold serial dilutions of yeast transformants were spotted from left to the right on minimal medium (-WL) and medium without histidine (-WLH) which is used to visualize prey/bait interaction. Pictures were taken 4 days after spotting. (B) Accumulation of bait and prey proteins described in panel A and Figure 6B was verified by western blot analysis of total yeast protein extracts using the anti-HA and anti-cmyc antibodies. Equal protein loading was tested by coomassie staining of the SDS-PAGE.

Determination of *in planta* bacterial populations.

For *Xcc* and *Pst*, plant leaves were infiltrated with a bacterial suspension of 10^5 cfu/ml and 5×10^5 cfu/ml, respectively. Two leaf discs from distinct infiltrated leaves of different inoculated plant were sampled using a cork borer (Area = 0.33 cm^2) at 0, 3 or 4 days after inoculation and were homogenized in 200 μl sterile water. Serial dilutions of the homogenates were performed and 5 μl drops were spotted in triplicates for each dilution on plates supplemented with appropriate antibiotics. The plates were incubated at 28°C for 48 h and colonies were counted in spots containing 1 to 30 colonies (Xu et al., 2008).

For *R. solanacearum*, the *in planta* bacterial populations were determined as described (Deslandes et al., 1998) with the following modifications: plants were root-inoculated with a bacterial suspension containing 10^7 cfu/ml. The aerial parts of three whole inoculated plants were weighed, surface sterilized three times in 250 ml of 70% ethanol, rinsed two times in sterile water and ground in sterile water. Bacterial densities in leaves were determined by plating serial dilutions on complete medium BG.

At least three independent experiments were performed.

Construction of *xopAC* and *RLCK ENTRY* clones

All oligonucleotides described in this study are described in Supplementary Table S2. *XopAC* open reading frame (with stop codon) was amplified from genomic DNA of wild-type *Xcc* 8004 with Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland) using MC12/13 primers. *xopAC* Δ LRR and *xopAC* Δ fic amplicons were produced by fusion-PCR between the amplicons MC4/12+MC5/13 and MC8/12+MC9/13, respectively. *attB1* and *attB2* sites were added with a third PCR using MC18/MC19 oligonucleotides. Wild-type and *xopAC* deletion mutants amplicons were recombined by BP into pDONR207 (Invitrogen) giving pENTRY-*xopAC*, pENTRY-*xopAC* Δ LRR, pENTRY-*xopAC* Δ fic. pENTRY-*xopAC*-H469A was produced by site-directed mutagenesis of pENTRY-*xopAC* with primers LN433/434 using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). *PIX1*, *PIX7* and *PIX8* (full length and amino acids 87-367) ORFs (with stop) were amplified from cDNA of Col-0 seedlings grown *in vitro* using primers EG45/46, EG58/59, EG62/63 and EG167/168, respectively and recombined by LR into pDNOR207 giving pENTRY-*PIX1*, pENTRY-*PIX7*, pENTRY-*PIX8* and pENTRY-*PIX8*₈₇₋₃₆₇.

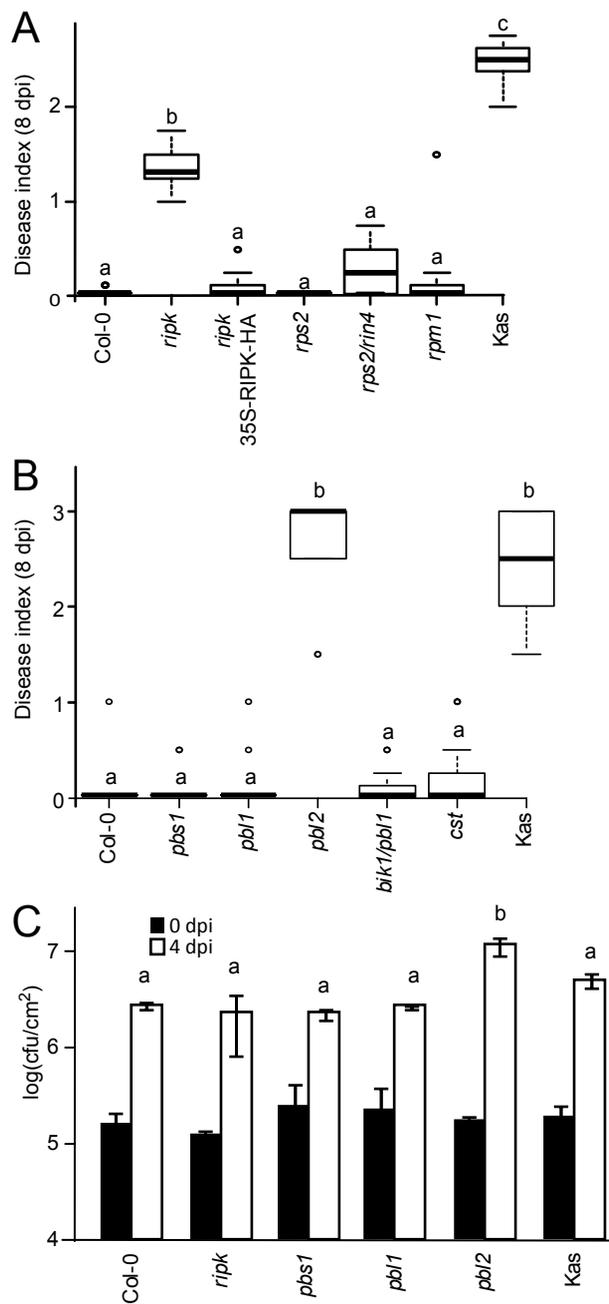


Figure 7. The RLCK RIPK-PIX8 and PBL2 are required for *xopAC*-mediated avirulence of *Xcc* strain 8004. (A, B) Boxplot representation of pathogenicity of strain 8004 on Col-0 mutants and transgenics inoculated by piercing in the central vein of the leaves is shown: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. Kas was used as a susceptible control. Mutants in genes coding for the RIPK-RIN4/RPM1 complex (A) and various RLCK (B) were tested. Disease indexes were scored 8 days post inoculation: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. N=3. Each time at least 4 plants were inoculated on at least 3 leaves. Statistical groups were determined using a Tukey HSD test ($P < 0,001$) and indicated by different letters. (C) *Xcc* strain 8004 was inoculated by piercing in leaves of Col-0 mutants and transgenics at a bacterial density of 10^5 cfu/ml. *In planta* bacterial populations in the inoculated areas were determined 0 and 4 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm^2). Standard deviations were calculated on two independent experiments with three samples of two leaf disc from different plants for each strain. Statistical groups identified using a Wilcoxon test ($P < 0,05$) are indicated by different letters.

Construction of *xopAC* and *hrpG mutant derivatives in *Xcc* 8004**

Deletion mutants or gene replacements in *Xcc* 8004 were obtained using the SacB system with p Δ 13 suicide vector (L. Noël, unpublished), a pK18 derivative (Schafer et al., 1994) designed for *Bsa*I-based Goldengate cloning (Engler et al., 2008). Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *Xcc* by triparental mating as described (Figurski and Helinski, 1979; Ditta et al., 1980). Deletion events were verified by PCR (details available upon request). Standard methods were used unless stated differently.

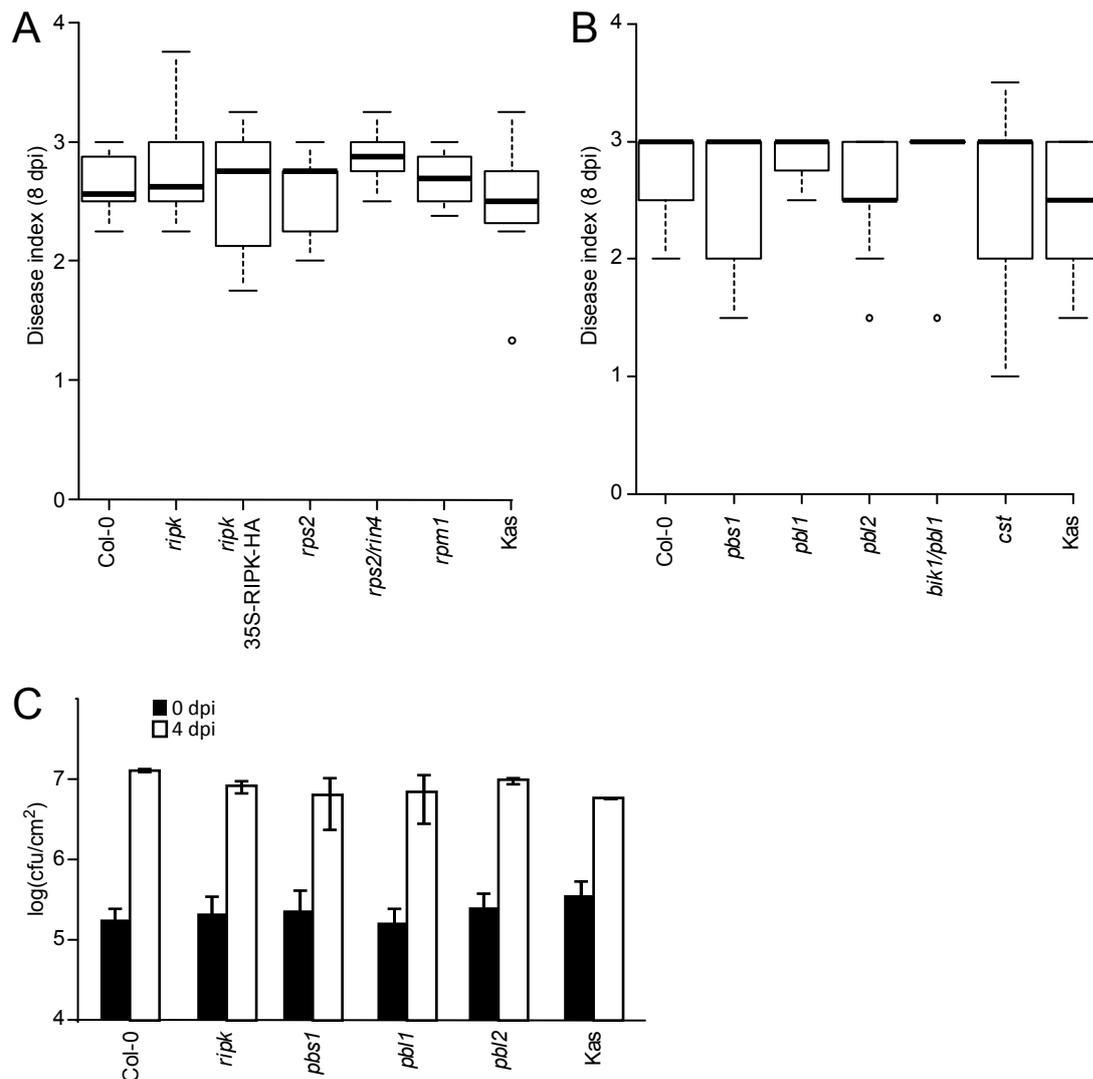
In order to introduce the HrpG E44K mutation in *Xcc* 8004 genome, XC_3077 gene fragment was amplified with LN251/252 from 8004 genomic DNA and cloned into p Δ 13 giving p Δ 13-*hrpG*. Site-directed mutagenesis was performed using LN202/203 giving p Δ 13-*hrpG** and introduced in wild-type strain 8004 and 8004 Δ *hrcV* (L. Noël, unpublished).

To engineer *xopAC* Δ LRR genomic deletion, site-directed mutagenesis of one internal *Bsa*I restriction site in pENTRY-*xopAC* Δ LRR was performed using EG3/4. The EG5/6 amplicon was cloned by Goldengate into p Δ 13 giving p Δ 13-*xopAC* Δ LRR. For *xopAC* Δ fic deletion, site-directed mutagenesis of one internal *Bsa*I restriction site in pENTRY-*xopAC* was performed using EG3/4. The EG7/MC8 and EG8/MC9 amplicons were assembled by Goldengate into p Δ 13 giving p Δ 13-*xopAC* Δ fic. For H469 mutagenesis, amplicons LN436/9 and LN442/443 were cloned in p Δ 13 and subjected to site-directed mutagenesis with LN433/434, giving p Δ 13-*xopAC*-H469A.

XopAC expression vectors for *Pst* and *Rs*

For expression and efficient typeIII-dependent translocation XopAC in *Pst*, *xopAC* and *xopAC*-H469A ENTRY clones were recombined by LR into pEDV6 (Sohn et al., 2007) giving pEDV6-*xopAC* and pEDV6-*xopAC*-H469A, respectively. Plasmids were introduced in *Pst* by triparental mating. For expression in *Rs*, ENTRY clones of wild-type and mutant *xopAC* were recombined by LR into pNP269 (N. Peeters, unpublished) destination vector. Plasmids were introduced in *Rs* by natural transformation as described (Cunnac et al., 2004).

Transient expression of YFPv-XopAC fusions in *N. benthamiana*



Supplementary Figure S7. Pathogenicity and *in planta* growth of strain 8004 Δ *xopAC* on Col-0 mutants and transgenics inoculated by piercing in the central vein of the leaves. A boxplot representation of disease index scores is shown: middle bar = median; box limit = upper and lower quartile; extremes = Min and Max values. Kas was used as a susceptible control. Mutants in genes coding for the RIPK/RIN4/RPM1 complex (A) and other RLCK (B) were tested. Disease indexes were scored 8 days post inoculation: 0-1 no symptoms; 1-2 weak chlorosis, 2-3 strong chlorosis; 3-4 necrosis. N=3. Each time at least 4 plants were inoculated on at least 3 leaves. Statistical groups were determined using a Tukey HSD test ($P < 0,001$) and indicated by a letter. (C) *Xcc* strain 8004 Δ *xopAC* was inoculated by piercing in Col-0 mutants and transgenics at a bacterial density of 10^5 cfu/ml. *In planta* bacterial populations in the inoculated areas were determined 0 and 4 days post inoculation and expressed as log of colony-forming units per square cm (cfu/cm²). Standard deviations were calculated on two independent experiments with three samples of two leaf disc from different plants for each strain. No statistically significant groups could be identified using a Wilcoxon test ($P < 0,05$).

N-terminal fusions of YFPv to wild-type and mutant XopAC were generated by LR recombination of the corresponding ENTRY vectors in pBin19-35S-YFPv-GW (S. Rivas, unpublished) giving pBin19-YFPv-xopAC, pBin19-YFPv-xopAC Δ LRR, pBin19-YFPv-xopAC Δ fic and pBin19-YFPv-xopAC-H469A. Plasmids were transformed in chimio-competent C58C1 *Agrobacterium* cells. *Agrobacterium*-mediated transient expression in *N. benthamiana* leaves was performed as described (Rivas et al., 2004). After inoculation, plants were transferred in a growth chamber at 21°C, with a 16-h light period and 70% hygrometry.

Fluorescence microscopy

YFPv fluorescence in *N. benthamiana* leaves was analysed with a confocal laser scanning microscope (TCS SP2-SE, Leica) using a x40 water immersion objective lens (numerical aperture 1.20; PL APO). Fluorescence of YFPv and CFP was excited with the 514 nm and 458 nm rays of the argon laser and detected between 520 and 575 nm and 465 and 520 nm, respectively. Images were acquired in the sequential mode (20 Z plains per stack of images; 0.5 mm per Z plain) using Leica LCS software (version 2.61).

The root proximal meristem was observed as described (Cazalé et al., 2009).

Expression of XopAC in stable transgenic Arabidopsis

pENTRY-xopAC was recombined by LR into a gateway-compatible derivative of pER8 (Zuo et al., 2000) giving pER8-xopAC and pJ2B-3HA-GW (N. Medina-Escobar and J.E. Parker, unpublished) giving pJ2B-3HA-xopAC. pER8-xopAC and pJ2B-3HA-xopAC were introduced by electroporation into *Agrobacterium* strains GV3101 pMP90 and pMP90RK, respectively. Arabidopsis plants of the Col-0 ecotype were transformed by flower dipping (Clough and Bent, 1998). Sterilized transgenic T1 seeds were selected on solid MS/10 (1/10 Murashige and Skoog) medium supplemented with 35 µg/ml hygromycin. T2 seeds from resistant T1 were analysed on MS/10 supplemented with 0 to 5µM β -estradiol.

Identification of XopAC interactors by yeast two-hybrid

A LexA-based yeast two-hybrid screen using the full-length XopAC-H469A (Amplicon LN608-609 cloned *PstI/XmaI* in the bait vector pLexA-DIR) was carried out by Dualsystems Biotech AG, Zurich, Switzerland. The bait construct was transformed into the strain NMY32

Supplemental Table S1: Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Features | Reference or source |
|---|---|------------------------------|
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | | |
| 8004 | Wild-type strain, Rif ^r | (Daniels et al., 1984) |
| 8004Δ <i>xopAC</i> | 8004 derivative, carries a <i>xopAC</i> deletion, Rif ^r | M. Chabannes, unpublished |
| 8004 <i>xopAC</i> Δ <i>LRR</i> | 8004 derivative, carries a deletion of XopAC LRR domain, Rif ^r | This study |
| 8004 <i>xopAC</i> Δ <i>Fic</i> | 8004 derivative, carries a deletion of XopAC Fic domain, Rif ^r | This study |
| 8004 <i>xopAC</i> -H469A | 8004 derivative, carries the XopAC H469A mutation, Rif ^r | This study |
| 8004* | 8004 derivative, carries a <i>hrpG</i> * mutation; constitutive expression of <i>hrpG</i> regulon, Rif ^r | This study |
| 8004* <i>hrcV</i> | 8004* derivative, carries a <i>hrcV</i> deletion, Rif ^r | This study |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | | |
| GMI1000 | Wild-type strain | (Boucher et al., 1987) |
| GMI1694 | GMI1000 <i>hrcV</i> ::Ω, Spc ^r | (Cunnac et al., 2004) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | | |
| DC3000 | Wild-type strain, Rif ^r | (Cuppels, 1986) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | | |
| C58C1 | Wild-type strain, Rif ^r | - |
| GV3101 pMP90 | Wild-type, Rif ^r , Gent ^r | - |
| GV3101 pMP90RK | Wild-type, Rif ^r , Gent ^r , Kan ^r | - |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| TG1 | <i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_k⁻ m_k⁻) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i> | Stratagene |
| DH5α | <i>F' recA lacZ DM15</i> | Bethesda Research Laboratory |
| BL21 (DE3) pLysS | <i>F- ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS, Cm^r</i> | Invitrogen |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | |
| AH109 | <i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> | Clontech |
| NMY32 | <i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 (lexAop)₈-ADE2 LYS2:::(lexAop)₄-HIS3 URA3:::(lexAop)₈-lacZ GAL4)</i> | Dual Systems Biotech |
| Plasmids | | |
| pRK2073 | Helper plasmid, Spc ^r , Strep ^r | (Leong et al., 1982) |
| pCZ917 | pFAJ1700 derivative with the pTaq Promoter and T7 Terminator, <i>lacI</i> , Tet ^r , | (Boulanger et al., 2010) |
| pCZ917- <i>xopAC</i> _A | pCZ917 with the <i>xopAC</i> ₈₀₀₄ promoter and gene, Tet ^r | M. Chabannes, unpublished |
| pΔ13 | Goldengate cloning-compatible derivative of suicide plasmid pK18mobsacB, Kan ^r , Suc ^s | L. Noël, unpublished |
| pΔ13- <i>xopAC</i> Δ <i>LRR</i> | pK18mobsacB derivative, for the deletion of <i>xopAC</i> ₈₀₀₄ LRR, Kan ^r , Suc ^s | This study |

using standard procedures (Gietz and Woods, 2001). Correct expression of the bait was verified by western blotting of cell extracts using a mouse monoclonal antibody directed against the LexA domain (Dualsystems Biotech, Switzerland). The absence of self-activation was verified by co-transformation of the bait together with a control prey and selection on minimal medium lacking the amino acids tryptophan, leucine and histidine (selective medium). For the yeast two-hybrid screen, the bait was co-transformed together with a Normalized Arabidopsis universal cDNA library (Col-0; Dualsystems P02403) into NMY32. 2.10^6 transformants were screened yielding 85 transformants that grew on selective medium. Positive transformants were tested for β -galactosidase activity using a P_{XG} β -galactosidase assay (Dualsystems Biotech). 68 of the 85 initial positives showed β -galactosidase activity and were considered to be true positives. Library plasmids were isolated from positive clones. The identity of positive interactors was determined by sequencing and comparison to the Arabidopsis databases.

Pairwise interactions between XopAC and derivatives vs. PIX-RLCK were tested in the GAL4 yeast two-hybrid system (Clontech). To this end, pENTRY clones of wild-type XopAC and H469A mutant derivative were recombined by LR in pGBKT7-GW (Clontech, Gateway-compatible derivative, L. Deslandes) to generate pGBKT7-xopAC and pGBKT7-xopAC-H469A. pENTRY-PIX1, pENTRY-PIX7, pENTRY-PIX8 and pENTRY-PIX₈₇₋₃₆₇ were recombined by LR into a Gateway-compatible pGADT7 (Clontech, L. Deslandes). *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109 were co-transformed with bait and prey vectors as described (Clontech). Auto-activation of the His auxotrophy reporter was tested on SD-WLH (Supplementary Figure S5B). Interactions were tested on at least 3 different clones.

XopAC antibody preparation

pENTRY-xopAC was recombined by LR in pDEST17 giving pDEST17-xopAC and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. A culture in exponential phase was treated with 2mM IPTG for 2 hrs and cells were harvested by centrifugation. Inclusion bodies of His₆-tagged XopAC were solubilized in urea-containing buffer, loaded on TALON resin as recommended (Clontech) and eluted with 200mM imidazole. One mg of His-XopAC was used for the immunisation of two rabbits (GenCust, Dudelange, Luxemburg). Anti-serum was purified on nitrocellulose-immobilized His-XopAC and used at 1/1000 (Plant extracts) or 1/5000 (other extracts) dilution for XopAC detection by western blotting on plant and

| | | |
|-------------------------------|--|---------------------------|
| pΔ13-xopACΔfic | pK18mobsacB derivative, for the deletion of <i>xopAC</i> ₈₀₀₄ fic, Kan ^r , Suc ^s | This study |
| pΔ13-xopAC-H469A | pΔ13 derivative, for XopAC ₈₀₀₄ H469A substitution, Kan ^r , Suc ^s | This study |
| pΔ13-hrpG* | pK18mobsacB derivative, for HrpG ₈₀₀₄ E44K substitution, Kan ^r , Suc ^s | This study |
| pDONR207 | Gateway Donor vector for entry clone construction by BP recombination, Gent ^r , Cm ^r | Invitrogen |
| pENTRY-xopAC | pDONR207 derivative, XopAC ₈₀₀₄ ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-xopACΔLRR | pDONR207 derivative, XopACΔLRR ₈₀₀₄ ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-xopACΔfic | pDONR207 derivative, XopACΔfic ₈₀₀₄ ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-xopAC-H469A | pDONR207 derivative, XopAC-H469A ₈₀₀₄ ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-PIX1 | pDONR207 derivative, PIX1 ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-PIX7 | pDONR207 derivative, PIX7 ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-PIX8 | pDONR207 derivative, PIX8 ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pENTRY-PIX8 ₈₇₋₃₆₇ | pDONR207 derivative, PIX8 ₈₇₋₃₆₇ ORF cloned by BP reaction, Gent ^r | This study |
| pDEST17 | His-GW, Amp ^r , Cm ^r | Invitrogen |
| pDEST17-xopAC | IPTG-inducible expression of His6-XopAC, Amp ^r | This study |
| pGADT7-GW | Gateway-compatible prey vector Gal4-AD-HA-GW, Amp ^r , Cm ^r , Leu ⁺ | L. Deslandes, unpublished |
| pGADT7-PIX1 | Prey vector Gal4-AD-HA-PIX1, Amp ^r , Leu ⁺ | This study |
| pGADT7-PIX7 | Prey vector Gal4-AD-HA-PIX7, Amp ^r , Leu ⁺ | This study |
| pGADT7-PIX8 | Prey vector Gal4-AD-HA-PIX8, Amp ^r , Leu ⁺ | This study |
| pGADT7-PIX8 ₈₇₋₃₆₇ | Prey vector Gal4-AD-HA-PIX8 ₈₇₋₃₆₇ , Amp ^r , Leu ⁺ | This study |
| pGBKT7-GW | Gateway-compatible bait vector, Gal4-BD-myc-GW, Kan ^r , Cm ^r , Trp ⁺ | L. Deslandes, unpublished |
| pGBKT7-xopAC | Gateway-compatible bait vector, Gal4-BD-myc-XopAC, Kan ^r , Trp ⁺ | This study |
| pGBKT7-xopAC-H469A | Gateway-compatible bait vector, Gal4-BD-myc-XopAC-H469A, Kan ^r , Trp ⁺ | This study |
| pEDV6 | pAvrRPS4::AvrRPS4 ₁₋₁₃₆ -GW-HA, Gen ^r , Cm ^r | (Fabro et al., 2011) |
| pEDV6-xopAC | pEDV6 derivative, pAvrRPS4::AvrRPS4 ₁₋₁₃₆ -XopAC ₈₀₀₄ -HA fusion, Gen ^r | This study |
| pEDV6-xopAC-H469A | pEDV6 derivative, pAvrRPS4::AvrRPS4 ₁₋₁₃₆ -XopAC ₈₀₀₄ -H469A-HA fusion, Gen ^r | This study |
| pNP269 | pRC derivative (Monteiro et al., 2012), pGALA7-GW-HA, Amp ^r , Kan ^r , Gen ^r , Cm ^r | N. Peeters, unpublished |
| pNP269-xopAC | pNP269 derivative, pGALA7-XopAC-HA, Amp ^r , Kan ^r , Gen ^r | This study |
| pNP269-xopAC-H469A | pNP269 derivative, pGALA7-XopAC-H469A-HA, Amp ^r , Kan ^r , Gen ^r | This study |
| pBin19-35S-YFPv-GW | p35S::YFPv-GW, Tet ^r , Kan ^r , Cm ^r | S. Rivas, unpublished |
| pBin19-YFPv-xopAC | p35S::YFPv-xopAC, Tet ^r , Kan ^r | This study |
| pBin19-YFPv-xopACΔLRR | p35S::YFPv-xopACΔLRR, Tet ^r , Kan ^r | This study |
| pBin19-YFPv-xopACΔfic | p35S::YFPv-xopACΔfic, Tet ^r , Kan ^r | This study |

bacterial protein samples. A specific signal at the expected size could be detected in 8004* strain grown in MOKA but not 8004* $\Delta xopAC$ (Supplementary Figure S2A).

Preparation of protein extracts, SDS-PAGE and immunoblotting

Yeast protein extracts were prepared under denaturing conditions as described (Caspari et al., 2000) with the following modifications: after washing in buffer A, cells were frozen twice in liquid nitrogen. After the last centrifugation step, cells are washed with 100% ethanol, centrifuged at 11000 g and resuspended in 1X Laemmli buffer (0,5 M Tris pH 6,8, SDS 10%, glycerol 20% and 0,2 M DTT). Total soluble protein extracts were prepared from entire seedlings (*Arabidopsis*) or leaf tissues (*N. benthamiana*) as described (Witte et al., 2004). Bacterial protein extracts were prepared by resuspending directly bacterial pellets into 1X Laemmli buffer. Samples were separated by SDS-PAGE (8 or 10% polyacrylamide) and transferred to nitrocellulose. The following antibodies were used: rat anti-HA (1867423; Roche), rabbit anti-GFP (B. Lefebvre, unpublished), mouse anti-c-Myc (Santa Cruz). Secondary antibodies were purchased from Sigma (AP conjugates) and detected as described (Witte et al., 2004).

Funding

This work was supported by a PhD grant from the French Ministry of National Education and Research and French Guyana to EG, the LABEX TULIP (ANR-10-LABX-41), an INRA-SPE post-doctoral fellowship to MC and a Jeunes Chercheurs grant from the Agence Nationale de la Recherche (Xopaque ANR-10-JCJC-1703-01) to LDN.

Acknowledgments

We wish to thank colleagues from the LIPM/FR40: Catherine Zanchetta for technical assistance, Céline Remblière for plant transformation, Susana Rivas, Laurent Deslandes, Benoît Lefebvre and Nemo Peeters for providing unpublished vectors or anti-sera, Aurélie Le Ru from the FR3450 microscopy platform and Anne-Claire Cazalé for advices on *Ralstonia* inoculation procedures. We are grateful to Gitta Coaker, Mathilde Fagard, Roger Innes, Sara

| | | |
|-------------------------|---|--|
| pBin19-YFPv-xopAC-H469A | p35S::YFPv-xopAC-H469A, Tet ^r , Kan ^r | This study |
| pER8-GW | Gateway derivative of pER8, binary vector for β -estradiol-inducible expression of transgene, Hygr ^r , Cm ^r | (Zuo et al., 2000) |
| pER8-xopAC | Binary vector for β -estradiol-inducible expression of <i>xopAC</i> ₈₀₀₄ , Hygr ^r | This study |
| pJ2B-3HA-GW | pPAM-PAT derivative, 35S::3HA-GW, Basta ^r , Amp ^r , Cm ^r | N. Medina-Escobar and J.E. Parker, unpublished |
| pJ2B-3HA-XopAC | 35S::3HA-XopAC, Basta ^r , Amp ^r | This study |

References

- 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.
- Boulanger, A., et al. (2010). Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 192:1487-1497.
- 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.
- Cuppels, D.A. (1986). Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol* 51:323-327.
- Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyc, M.K., Byrde, R.J., and Fielding, A.H. (1984). Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *Embo J* 3:3323-3328.
- Fabro, G., et al. (2011). Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. *PLoS Pathog* 7:e1002348.
- Leong, S.A., Ditta, G.S., and Helinski, D.R. (1982). Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* 257:8724-8730.
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I., and Valls, M. (2012). A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:557-568.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 24:265-273.

Liljdren, David Mackey, Brian Staskawicz, Jian-Min Zhou and Cyril Zipfel for contributing several *Arabidopsis* mutants and transgenic lines used in this manuscript.

References

- Aarts N, Metz M, Holub E, Staskawicz BJ, Daniels MJ, Parker JE** (1998) Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10306-10311
- Afzal AJ, da Cunha L, Mackey D** (2011) Separable fragments and membrane tethering of *Arabidopsis* RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *The Plant cell* **23**: 3798-3811
- Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA** (2008) Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **21**: 507-517
- Al-Daoude A, de Torres Zabala M, Ko JH, Grant M** (2005) RIN13 is a positive regulator of the plant disease resistance protein RPM1. *The Plant cell* **17**: 1016-1028
- Arlat M, Gough CL, Barber CE, Boucher C, Daniels MJ** (1991) *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **4**: 593-601
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denance N, Vasse J, Lauber E, Arlat M** (2007) Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PloS one* **2**: e224
- Boucher CA, Barberis P, Trigalet AP, Demery DA** (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2449-2457
- Burr CA, Leslie ME, Orłowski SK, Chen I, Wright CE, Daniels MJ, Liljegren SJ** (2011) CAST AWAY, a membrane-associated receptor-like kinase, inhibits organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **156**: 1837-1850
- Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G, Lindsay HD, Hofmann K, Papadimitriou K, Sunnerhagen P, Carr AM** (2000) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 1254-1262
- Cazalé AC, Clement M, Chiarenza S, Roncato MA, Pochon N, Creff A, Marin E, Leonhardt N, Noël LD** (2009) Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **60**: 2653-2664
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500
- Chung EH, da Cunha L, Wu AJ, Gao Z, Cherkis K, Afzal AJ, Mackey D, Dangl JL** (2011) Specific threonine phosphorylation of a host target by two unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants. *Cell host & microbe* **9**: 125-136
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, 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. *Molecular microbiology* **53**: 115-128
- Danna CH, Millet YA, Koller T, Han SW, Bent AF, Ronald PC, Ausubel FM** (2011) The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 9286-9291

Supplemental Table S2: Oligonucleotides used in this study.

| Name | Sequence (5'-3') ^a |
|-------|--|
| LN202 | CTTTTCAGACGAACTCAAATTGCTGCGCTGCCTG |
| LN203 | CAGGCAGCGCAGCAATTTGAGTTCGTCTGAAAAG |
| LN251 | TTTGGTCTCAAGGTGATCATGCCGGGCTCTCTGAAGG |
| LN252 | TTTGGTCTCACTTGCAGCTCAGCAAGCTGCGGTGCGATTG |
| LN433 | AGCGCTTGGTCAGTCTGGCTCCTTTTCGATGACGCAAATG |
| LN434 | CATTTGCGTCATCGAAAGGAGCCAGACTGACCAAGCGCT |
| LN436 | TTTGGTCTCAAGGTCAAGGTTGTCTACCAAGCTTCAG |
| LN439 | TTTGGTCTCATTTTCGGGCGGAGGGTACCGACTC |
| LN442 | TTTGGTCTCACTTGCAGCCGAATCGGCGACGCGAAAGGTG |
| LN443 | TTTGGTCTCAGAAACCCTGAAAGACGAAATGGCGAAG |
| LN608 | A <u>ACTGCAGATGGATA</u> AAAAATCTTAATTTGTG |
| LN609 | A <u>ACCCGGGCTACTGGTGAACCTGGTTCATAAC</u> |
| MC4 | AGCTTGGTAGGACAAAGCTTGTCCCGCATCTAAGCA |
| MC5 | GATGCGGGACAAGCTTTGTCTACCAAGCTTCAGCGCT |
| MC8 | TTCACCAACGGGCGGCCGATCAAGTGTGATCGGTGC |
| MC9 | ATCACACTTGATCGGCCGCCGTTGGTGAAGCAAGC |
| MC12 | <u>AAAAAGCAGGCTCGATGGATA</u> AAAAATCTTAATTT |
| MC13 | <u>AGAAAGCTGGGTAGCATTGAGGCGTGTAGGT</u> |
| MC18 | <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> |
| MC19 | <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> |
| EG3 | CGACGTTTCGATCCAGAAACCAGACAGAGGTTG |
| EG4 | CAACCTCTGTCTGGTTTCTGGATCGAACGTCG |
| EG5 | TTTGGTCTCAAGGTGGATAAAAAATCTTAATTTGTGGG |
| EG6 | TTTGGTCTCACTTGGGGCGGAGGGTACCGACTCCG |
| EG7 | TTTGGTCTCAAGGTATTGGCCAATGCAGCAGCCTGACTACG |
| EG8 | TTTGGTCTCACTTGCCTGAATCACCACCAGGCCGCCG |
| EG45 | <u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGAGACTCTTCAACA</u> ACTGC |
| EG46 | <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACGATCTTAACGAACCCGGAGC</u> |
| EG58 | <u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGTTTGGATGCTGTTAAAGC</u> |
| EG59 | <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATGTAGTTGCTCCTTTAGGC</u> |
| EG62 | <u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGTGAAGAAGAAAGTTTCATGG</u> |
| EG63 | <u>GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGTACCGTCCCCACCTGCC</u> |
| EG167 | <u>GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> TTTTTCATCGACCAATTTTCTA |
| EG168 | <u>GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAAGATCATTGAGTATAGAGAC</u> |

^a underlined sequences indicate restriction or *att* sites used for cloning purposes.

- de Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP** (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953-955
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y** (1998) Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* **11**: 659-667
- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR** (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**: 7347-7351
- Eitas TK, Nimchuk ZL, Dangl JL** (2008) Arabidopsis TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6475-6480
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S** (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one* **3**: e3647
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou JM** (2012) A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**: 114-118
- Figurski DH, Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**: 1648-1652
- Galan JE, Wolf-Watz H** (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573
- Gietz RD, Woods RA** (2001) Genetic transformation of yeast. *BioTechniques* **30**: 816-820, 822-816, 828 passim
- Gomez-Gomez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell* **5**: 1003-1011
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL** (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**: 843-846
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R** (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803
- Hirayama T, Oka A** (1992) Novel protein kinase of Arabidopsis thaliana (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant molecular biology* **20**: 653-662
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DeRoy S, Dangl JL, Mackey D** (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit *RIN4*-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**: 749-759
- Kinch LN, Yarbrough ML, Orth K, Grishin NV** (2009) Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB. *PloS one* **4**: e5818
- King EO, Ward MK, Raney DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **44**: 301-307
- Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A** (2012) *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in microbiology* **20**: 199-208
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G** (2009) RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol* **7**: e1000139
- Liu J, Elmore JM, Lin ZJ, Coaker G** (2011) A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell host & microbe* **9**: 137-146
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 496-501
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL** (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379-389

- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for *RPM1*-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**: 743-754
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980
- Meyer D, Cunnac S, Gueneron M, Declercq C, Van Gijsegem F, Lauber E, Boucher C, Arlat M** (2006) PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *Journal of bacteriology* **188**: 4903-4917
- Meyer D, Lauber E, Roby D, Arlat M, Kroj T** (2005) Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular plant pathology* **6**: 327-333
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, 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
- Poueymiro M, Genin S** (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current opinion in microbiology* **12**: 44-52
- Remigi P, Anisimova M, Guidot A, Genin S, Peeters N** (2011) Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *The New phytologist* **192**: 976-987
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones JD** (2004) CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO journal* **23**: 2156-2165
- Ronald PC, Beutler B** (2010) Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* **330**: 1061-1064
- Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U** (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9368-9373
- Rowland O, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieul F, Tracy FE, Durrant WE, Fritz-Laylin L, Nekrasov V, Sjolander K, Yoshioka H, Jones JD** (2005) Functional analysis of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full *Cf-9*-dependent disease resistance in tomato. *The Plant cell* **17**: 295-310
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73
- Shao F, Golstein C, Ade J, Stoutemyer M, Dixon JE, Innes RW** (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**: 1230-1233
- Shiu SH, Bleecker AB** (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10763-10768
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JD** (2007) The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **19**: 4077-4090
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF** (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant cell* **18**: 764-779
- Tornero P, Chao RA, Luthin WN, Goff SA, Dangl JL** (2002) Large-scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The Plant cell* **14**: 435-450
- van der Hoorn RA, Kamoun S** (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* **20**: 2009-2017
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, Abuqamar S, Chen X, Salmeron J, Dietrich RA, Hirt H, Mengiste T** (2006) The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in Arabidopsis resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant cell* **18**: 257-273

- Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular plant pathology* **14**: 2-18
- Warren RF, Merritt PM, Holub E, Innes RW** (1999) Identification of three putative signal transduction genes involved in *R* gene-specified diseases resistance in arabidopsis. *Genetics* **152**: 1-12
- Wengelnik K, Rossier O, Bonas U** (1999) Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *Journal of bacteriology* **181**: 6828-6831
- White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R** (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular plant pathology* **10**: 749-766
- Witte CP, Noël LD, Gielbert J, Parker JE, Romeis T** (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology* **55**: 135-147
- Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, He YQ, Lu GT, Tang DJ, Vasse J, Arlat M, Tang JL** (2008) AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *Journal of bacteriology* **190**: 343-355
- Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K** (2009) AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* **323**: 269-272
- Yu G, Katagiri F, Ausubel FM** (1993) *Arabidopsis* mutations at the *RPS2* locus result in loss of resistance to *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *MPMI* **6**: 434-443
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, Mengiste T, Zhang Y, Zhou JM** (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell host & microbe* **7**: 290-301
- Zipfel C, Felix G** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Current opinion in plant biology* **8**: 353-360
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760
- Zuo J, Niu QW, Chua NH** (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **24**: 265-273

Tables

Table 1: List and properties of RLCK proteins identified by yeast two-hybrid as putative interactors of XopAC-H469A.

| PIX | Names | Gene | Nber of cDNA | Protein domain |
|------|-------|-----------|--------------|---------------------|
| PIX1 | PBL15 | AT1G61590 | 2 | 83-329 and 83-326 |
| PIX7 | - | AT5G15080 | 2 | 192-347 and 192-337 |

| | | | | |
|-------|-------------------|-----------|---|-------------------|
| PIX8 | RIPK/ACIK1A/PBL14 | AT2G05940 | 2 | 85-240 and 81-240 |
| PIX13 | - | AT2G17220 | 1 | 58-241 |
| PIX14 | APK2B/PBL3 | AT2G02800 | 1 | 44-250 |
| PIX15 | APK1A/PBL9 | AT1G07570 | 1 | 15-217 |
| PIX16 | APK1B/PBL10 | AT2G28930 | 1 | 30-245 |
| PIX17 | PBL8 | AT5G01020 | 1 | 169-299 |

Supplementary data

Supplementary Figure S1. The LRR and the fic domains of XopAC are not required for pathogenicity on Arabidopsis ecotype Kas.

Supplementary Figure S2: Accumulation and stability of XopAC variants expressed in *Xcc* 8004*, *Pst* DC3000 and *N. benthamiana*.

Supplementary Figure S3: Induction of necrosis by XopAC in pepper and *N. benthamiana* leaves depends on XopAC LRR and fic domains.

Supplementary Figure S4. Symptoms development and *in planta* growth of *Xcc* strain 8004 infiltrated into leaves of Arabidopsis ecotype Kas are not affected by XopAC.

Supplementary Figure S5. Protein alignment of the eight full-length PIX proteins belonging to the RLCK family identified by yeast two-hybrid as putative interactors of XopAC-H469A.

Supplementary Figure S6. XopAC-H469A interacts with the PIX8 kinase domain in a yeast two-hybrid assay.

Supplementary Figure S7. Pathogenicity and *in planta* growth of strain 8004 Δ xopAC on Col-0 mutants and transgenics inoculated by piercing in the central vein of the leaves.

Supplementary Table S1: Strains and plasmids used in this study.

Supplementary Table S2: Oligonucleotides used in this study.

Tableau G : Validation des mutants *sxc*.

| Lignée ^a | Séquence ^b | Expression ^c | Western Blot ^d |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| 9.8 | + | +++ | +++ |
| <i>sxc 1</i> | En cours | +++ | +++ |
| <i>sxc 2</i> | + | +++ | +++ |
| <i>sxc 3</i> | + | nd | +++ |
| <i>sxc 4</i> | En cours | +/- | + |
| <i>sxc 5</i> | En cours | +++ | +++ |
| <i>sxc 6</i> | En cours | +++ | +++ |
| <i>sxc 7</i> | + | + | +++ |
| <i>sxc 8</i> | En cours | + | - |
| <i>sxc 9</i> | + | +/- | - |
| <i>sxc 10</i> | En cours | +/- | - |
| <i>sxc 11</i> | + | +/- | - |
| <i>sxc 12</i> | En cours | - | - |
| <i>sxc 13</i> | En cours | nd | - |

^a, 9.8 : Plantes transgéniques de l'écotype Col-0 exprimant le gène *xopAC* sous le contrôle d'un promoteur inducible au β -œstradiol. *sxc* : suppressor of *xopAC* phenotype.

^b, vérification de la séquence du gène *xopAC*. + : absence de mutations dans le gène *xopAC*.

^c, vérification de l'expression du gène *xopAC* en présence de 5 μ M de β -œstradiol. +++ : très forte expression du gène *xopAC*; ++ : forte expression du gène *xopAC*; + : faible expression du gène *xopAC*; +/- : très faible expression du gène *xopAC*; - : pas d'expression du gène *xopAC*.

^d, vérification de la production de la protéine XopAC en présence de 5 μ M de β -œstradiol. +++ : très forte production de la protéine XopAC; ++ : forte production de la protéine XopAC; + : faible production de la protéine XopAC; +/- : très faible production de la protéine XopAC; - : pas de production de la protéine XopAC

VI.1 Données supplémentaires

VI.1.1 Recherche des cibles végétales de XopAC par voie génétique

L'expression du gène *xopAC* chez l'écotype Col-0 induit un arrêt de croissance des plantules (Seedling Growth Inhibition ; SGI) lorsqu'elles sont mises à germer sur un milieu MS contenant 5 μ M de β -œstradiol (Guy *et al.*, en préparation). Une expérience de mutagenèse aléatoire à l'EMS a donc été réalisée afin de rechercher des mutations capables de supprimer la SGI induite par l'expression de *xopAC* chez l'écotype Col-0. L'objectif de cette mutagenèse est d'identifier des cibles directes ou indirectes de l'ET3 XopAC. Dans ce but, 12 000 graines provenant de deux lignées T3 sœurs 9.8 et 9.6 ont été traitées avec une concentration d'EMS à 116 mM durant 4h (L. Noël). Trois mille plantules issues du traitement EMS ont été repiquées. Sur les 3000 plantes M1, seules les graines de 1200 plantes ont pu être récoltées (613 de la lignée 9.8 et 587 de la lignée 9.6). Les graines des autres plantes n'ont pas pu être récoltées à cause de la stérilité de ces plantes probablement due à la présence de l'ET3 *xopAC*. Les graines M2 ont été criblées sur un milieu MS contenant 5 μ M de β -œstradiol, ce qui a permis d'identifier 17 familles, capables de croître dans ces conditions (6 pour la lignée 9.8 et 11 pour la lignée 9.6).

Afin de s'assurer que les plantes mutantes obtenues n'étaient pas issues de mutations rendant le gène *xopAC* non fonctionnel chez ces plantes, l'analyse de ce gène a été entreprise chez les plantes mutantes. Seuls les résultats préliminaires pour 13 plantes ont pu être analysés et sont présentés. Ces plantes ont été renommées *sxc* (Suppressor of XopAC). Les autres plantes n'ont pas été analysées en raison d'une quantité de graine trop limitée ou de problème de germination durant l'analyse. Les résultats préliminaires montrent que les lignées *sxc* 8 à 13 présentent soit un défaut dans l'expression du gène *xopAC* et/ou dans la production de la protéine et n'ont pas été étudiées davantage (**Tableau G**).

La capacité des plantes *sxc* 1 à 7 de croître normalement en présence de β -œstradiol ne découle pas d'un défaut d'expression de *xopAC* ou de la production de la protéine. Ces plantes ont été croisées avec les lignées parentales 9.8 et 9.6. Ces croisements ont été réalisés afin d'effectuer des tests de dominance/récessivité. De plus, les lignées *sxc* 1 à 7 ont été croisées entre-elles afin de réaliser des tests d'allélisme. Tous ces croisements sont actuellement en cours d'analyse par B. Roux (LIPM) qui prend la suite de ma thèse sur l'analyse fonctionnelle de l'ET3 XopAC. Les croisements avec les lignées parentales sont également utilisés dans des stratégies de séquençage afin d'identifier la ou les mutation(s) responsable(s) de la suppression du phénotype de SGI induit par l'expression de *xopAC* chez Col-0 (B. Roux).

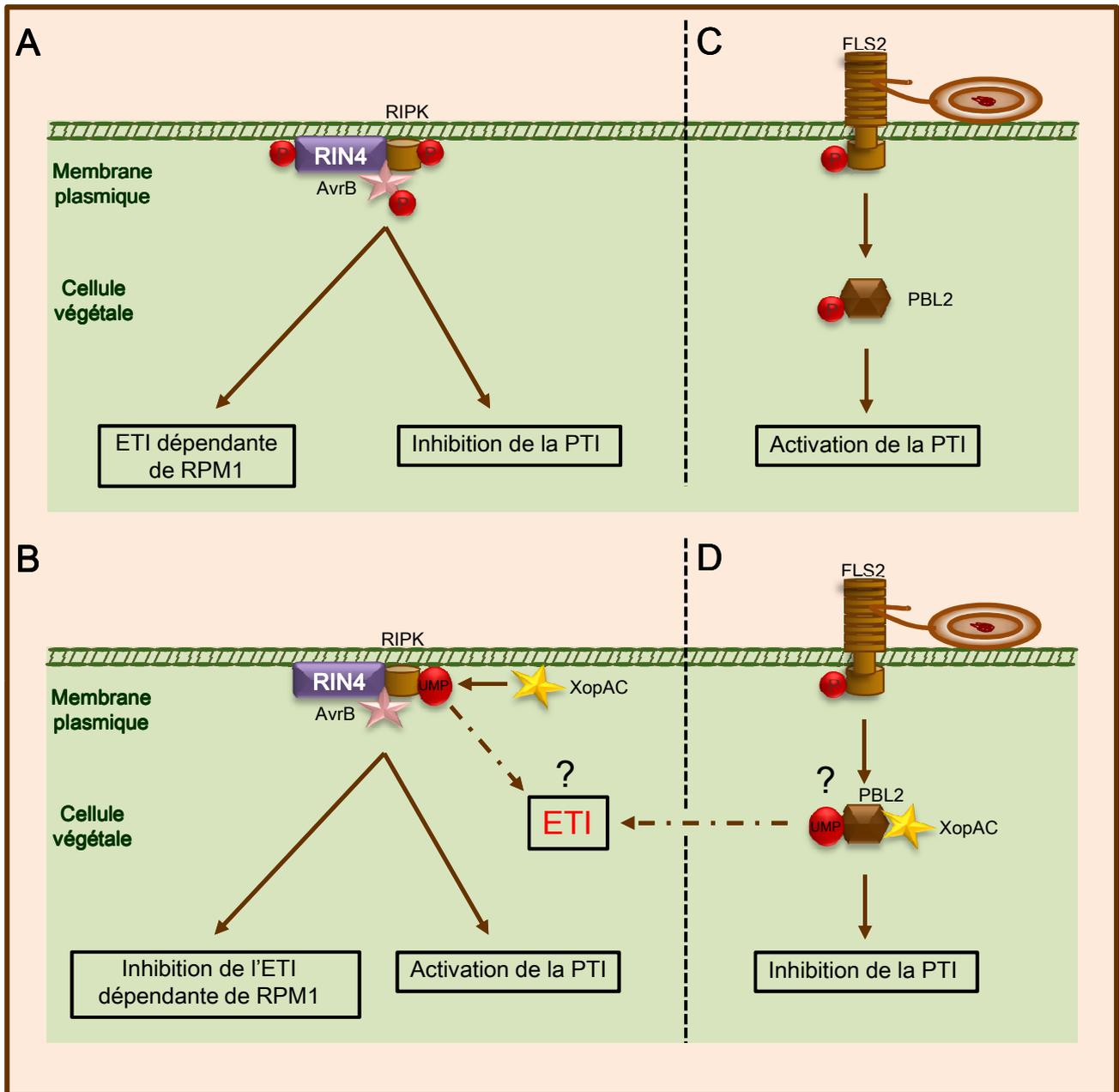


Figure AC : Modèle permettant d'expliquer la reconnaissance de l'ET3 XopAC chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*. A) et B) modèle de reconnaissance de l'ET3 AvrB de *P. syringae*. A) le Receptor-Like Cytoplasmic Kinase (RLCK) RIPK interagit avec RIN4 et AvrB. Il y a une transphosphorylation entre les trois partenaires. La phosphorylation de ces deux régulateurs négatifs de la PTI (RIN4 et RIPK) est probablement à l'origine de l'inhibition de l'immunité basale. Cependant, la phosphorylation de RIN4 par AvrB et/ou RIPK induit l'ETI dépendante de RPM1 (Liu *et al.*, 2011). B) lors de l'interaction avec *Xcc 8004*, l'uridylylation de RIPK (ajout d'un groupement AMP sur un résidu thréonine) par XopAC entraîne l'inactivation de RIPK ce qui permet de réactiver la PTI et d'inhiber l'ETI dépendante de RPM1 (Feng *et al.*, 2012). C) et D) inhibition de la PTI par XopAC. C) le RLCK PBL2 est un régulateur positif de la PTI qui est activé par phosphorylation par le PRR FLS2 (Zang *et al.*, 2010). D) lors de l'interaction avec *Xcc 8004*, la probable uridylylation de PBL2 par XopAC permettrait d'inhiber sa phosphorylation et donc d'inhiber la PTI. B) et D) la modification des deux RLCK (RIPK et PBL2) par XopAC pourrait être responsable de la reconnaissance de ce dernier chez Col-0.

VI.2 Discussion

VI.2.1 La reconnaissance de XopAC chez Col-0 requiert deux RLCK

Dans cette étude, l'ET3 XopAC a été utilisé comme un outil moléculaire pour identifier des cibles végétales requises pour la résistance à *Xcc* 8004 chez l'écotype Col-0. Nous avons pu observer que les deux domaines (LRR et Fic) et l'activité enzymatique de la protéine sont nécessaires à la reconnaissance de XopAC et donc de *Xcc* 8004 (Guy *et al.*, en préparation). Ces résultats suggèrent que l'interaction et la modification post-traductionnelle de la cible végétale de XopAC sont importantes pour la reconnaissance. Afin de confirmer cette hypothèse, un crible double hybride chez la levure a été initié pour identifier les cibles végétales de XopAC. Ce crible a permis d'identifier la protéine RIPK. Le mutant Col-0-*ripk* est partiellement affecté dans la reconnaissance de XopAC. De façon intéressante, Feng *et al* (2012) montrent que XopAC est capable d'interagir et de modifier RIPK par uridylylation (**Figure YC**). Ces résultats suggèrent que la reconnaissance de *Xcc* 8004 est due à l'uridylylation de RIPK par XopAC (**Figure AC**). Cependant, l'absence de reconnaissance de *Xcc* est seulement partielle dans le mutant *ripk*, supposant l'intervention d'autres composants dans la résistance à *Xcc* 8004. RIPK est un membre de la sous famille VII des RLCK dont BIK1 qui est aussi une cible de XopAC modifiée par uridylylation (Feng *et al.*, 2012). Une étude montre que les membres de cette famille sont redondants fonctionnellement, ce qui expliquerait la reconnaissance partielle de *Xcc* 8004 (Zhang *et al.*, 2010). L'utilisation de plusieurs mutants (*pbl1*, *pbl2*, *bik1/pbl1*, *pbs1* et *cst*) de cette famille a permis d'identifier PBL2 comme étant requis pour la résistance complète à *Xcc* 8004 (**Figure AC** ; Guy *et al.*, en préparation).

RIPK est une protéine qui est nécessaire à l'établissement de l'ETI dépendante de AvrB/AvrRpm1 via RPM1 car cette protéine contribue à la phosphorylation de RIN4 (perçue par RPM1 ; **Figure AC** ; Liu *et al.*, 2011). AvrB faisant partie de la même famille (fido) que XopAC, nous avons voulu savoir si les mécanismes permettant la reconnaissance de XopAC étaient les mêmes que ceux mis en jeu pour la reconnaissance de AvrB. Cependant, aucun des mutants *rpm1* et *rps2/rin4* (affectés dans la résistance à AvrB/AvrRpm1) ne sont compromis dans la résistance à *Xcc* 8004. L'uridylylation de RIPK par XopAC diminue de façon significative la phosphorylation de RIPK suggérant une diminution de phosphorylation de RIN4 via *RIPK* et donc une inhibition de RPM1. Dans cette hypothèse les gènes *RIN4* et *RPM1* ne seraient donc pas nécessaires à l'établissement de la résistance à XopAC. Deux hypothèses peuvent expliquer la résistance dépendante de RIPK : soit l'uridylylation de RIPK déclenche directement la résistance, soit un homologue de RIN4 contribue à la résistance mais indépendamment de RPM1. Les choses ne sont pas aussi simples car de façon

surprenante, une plante transgénique surexprimant le gène *RPM1* est sensible à *Xcc* 8004. Ce résultat suggère que *RPM1* titrerait ou induirait un encombrement stérique autour de la cible de *XopAC*, la rendant inaccessible. *RIPK* interagit avec *RIN4* et ce dernier interagit avec *RPM1*. L'abondance de la protéine *RPM1* dans la cellule permettrait de titrer toutes les protéines *RIN4* disponibles et donc *RIPK*, rendant ce dernier inaccessible à une modification par *XopAC*.

La protéine *PBL2* est une protéine homologue de *PBS1* et de *BIK1*. Les études réalisées par Zhang *et al* (2010) montrent que les protéines *PBS1* et *PBL2* similairement à *BIK1* sont capables d'interagir avec *FLS2* et sont importantes pour la régulation positive de la *PTI* (**Figure AC**). Toutefois, les mutants *pbs1* et *pbl2* sont moins affectés dans les réponses de la *PTI* qu'un mutant *bik1* suggérant que ces protéines sont moins efficaces et que *BIK1* serait le vrai régulateur positif de la *PTI* (Zhang *et al.*, 2010). La protéine *PBS1* est clivée par l'ET3 *AvrPphB* et le clivage de *PBS1* est perçu par *RPS5* qui déclenche l'ETI (Ade *et al.*, 2007). De façon intéressante, *AvrPphB* est aussi capable de cliver *PBL2* et *BIK1* (Zhang *et al.*, 2010). Afin de cliver ses cibles, *AvrPphB* reconnaît un motif « *GDK* » mais cet ET3 est également capable de cliver *PBL1* (homologue de *BIK1*) qui possède un motif « *GEK* » (Zhang *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que la présence d'un résidu acide est nécessaire pour le clivage. Une hypothèse permettant d'expliquer la reconnaissance de *AvrPphB* est que les protéines homologues de *BIK1* (*PBL2*, *PBS1*, *PBL1*...) ont évolué afin de protéger *BIK1* contre d'éventuelles attaques visant à inhiber la *PTI*. Le modèle de l'ET3 *AvrPphB* et les données accumulées sur *XopAC* suggèrent que ces ET3 pourraient avoir un mode d'action équivalent.

XopAC modifie par uridylylation *BIK1* et son homologue *RIPK*. La présence de *PBL2* et *RIPK* pourrait permettre de protéger *BIK1* en titrant *XopAC* et leur modification induirait la résistance (**Figure AC**). La reconnaissance partielle de *Xcc* 8004 chez le mutant *ripk* serait due à la présence de *PBL2* qui est modifiée par *XopAC* et induit une réponse de défense. L'identification du gène de résistance à *XopAC* et des voies de signalisation en aval de ce dernier permettront d'éclaircir la résistance à *Xcc* chez *Col-0*. Cependant, la modification de *PBL2* par *XopAC* n'a pas encore été testée et ne permet donc pas d'appuyer cette hypothèse. *XopAC* reconnaît le motif « *VSTR* » afin de modifier ses cibles sur le résidu T par uridylylation. La protéine *PBL2* possède un motif « *VSTK* » (données non montrées). De façon similaire à *AvrPphB*, la présence d'un résidu basique serait suffisante dans le motif reconnu par *XopAC* pour modifier ses cibles.

VI.2.2 Recherche des cibles génétiques de *xopAC*

Les premières plantes transgéniques d'*A. thaliana* exprimant des ET3 ont été utilisées afin de démontrer que les ET3 AvrB et AvrRpt2 peuvent agir comme des facteurs de virulence ou d'avirulence à l'intérieur des cellules végétales (Chen *et al.*, 2000; Gopalan *et al.*, 1996; McNellis *et al.*, 1998). Depuis ces deux exemples, de nombreuses études ont utilisé des plantes transgéniques exprimant des ET3. Par exemple, des plantes transgéniques exprimant l'ET3 AvrPto ont été utilisées afin de montrer que cet ET3 supprime des défenses liées à la PTI telles que l'apposition de callose. Cet ET3 lorsqu'il est exprimé à l'intérieur des cellules végétales permet aussi la multiplication d'une souche de *Pto* DC3000 non pathogène (mutant du SST3 ; Hauck *et al.*, 2003). Récemment, il a été montré *via* l'utilisation de plantes transgéniques que l'ET3 HopF2 de *Pto* DC3000 inhibe le clivage de RIN4 par AvrRpt2 et donc l'ETI associée à ce clivage (Wilton *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous avons voulu étudier plus en détail la fonction de XopAC. Dans ce but, nous avons construit des plantes transgéniques de l'écotype résistant Col-0 (M. Chabannes). De façon similaire à AvrB, des plantes transgéniques exprimant le gène *xopAC* de façon constitutive n'ont pas pu être obtenues (Gopalan *et al.*, 1996). Ceci est probablement du comme pour AvrB à la présence d'un gène *R* induisant une ETI létale pour les plantules (Gopalan *et al.*, 1996). Cependant, des plantes transgéniques exprimant le gène *xopAC* sous le contrôle d'un promoteur inductible au β -œstradiol sont viables (Col-0-pER8::*xopAC*). L'induction du gène *xopAC* entraîne une SGI visible dès 10 jours à une concentration de 5 μ M de β -œstradiol (Guy *et al.*, en préparation). De plus, cette SGI est dépendante de la concentration en β -œstradiol qui est corrélée avec l'accumulation de la protéine chez les plantes Col-0-pER8::*xopAC* (Guy *et al.*, en préparation). Contrairement aux plantes transgéniques exprimant le gène d'avirulence *avrRpt2*, le phénotype des plantes Col-0-pER8::*xopAC* est très tardif et il n'induit pas de mort cellulaire rapide (McNellis *et al.*, 1998).

Le phénotype des plantes Col-0-pER8::*xopAC* s'apparenterait plus à celui induit chez des plantes WT Col-0 et *La-er* ayant été mises à germer sur un milieu contenant 10 μ M de flg22 (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). En effet, ces plantes subissent un arrêt de croissance de la racine primaire (pas de racines latérales) et de la partie aérienne au stade cotylédon mais ces derniers restent verts. La seule différence provient du fait que les cotylédons des plantes Col-0-pER8::*xopAC* deviennent chlorotiques. L'hypothèse serait que ces plantes subissent une PTI exacerbée induisant une SGI similaire à ce qui est observé avec la croissance en présence de peptide flg22. Cette hypothèse est en contradiction avec les résultats publiés par Feng *et al* (2012). Dans leur étude, les auteurs montrent que des

Bases moléculaires de la reconnaissance de *xopAC* chez *A. thaliana*

plantes Col-0 exprimant le gène *xopAC* sous le contrôle d'un promoteur inductible au β -œstradiol suppriment la PTI dépendante de flg22 et permettent la croissance de *Xcc* 8004 non pathogène (*SST3*). La chlorose des feuilles et l'inhibition de croissance de la racine primaire pourrait être due à un gène de résistance avec un effet moins prononcé que les autres gènes de résistance connus tel que *RPM1*, *RPS2* et *RPS5*. L'expression inductible de *avrB* chez des plantes transgéniques ne possédant pas le gène de résistance *RPM1* induit une chlorose des feuilles (Eitas *et al.*, 2008). Cette chlorose dépend de la présence d'un autre gène *R* (*TAO1*) nécessaire pour la reconnaissance de AvrB. La présence des gènes *TAO1* et *RPM1* est requise pour avoir la pleine reconnaissance de AvrB (Eitas *et al.*, 2008). L'effet de XopAC sur les plantules de l'écotype Col-0 pourrait être similaire à l'effet de AvrB sur des plantes ne possédant pas le gène *RPM1*.

Dans le but d'identifier des cibles indirectes ou directes de XopAC, une mutagenèse aléatoire à l'EMS a été entreprise (en cours). L'analyse morphologique et cytologique de ces plantes sera également entreprise afin de comprendre le rôle de XopAC au cours de l'infection

Discussion générale et perspectives

VII. Discussion générale et perspectives

VII.1 L'immunité vasculaire existe-t-elle réellement ?

L'optimisation du pathosystème *Xcc-Arabidopsis* a permis de mettre en lumière un mécanisme de résistance chez les plantes suggérant l'existence d'une spécificité tissulaire pour la reconnaissance des agents pathogènes (Xu *et al.*, 2008). En effet, l'ET3 XopAC induit une ETI (V-ETI) uniquement lorsque les bactéries sont inoculées dans le système vasculaire. Dans cette étude nous avons décidé d'utiliser XopAC comme un outil moléculaire afin d'étudier l'immunité vasculaire chez *A. thaliana*. De façon intéressante, les études réalisées avec XopAC ont permis d'identifier deux gènes (*RIPK* et *PBL2*) nécessaires à la reconnaissance de *Xcc* 8004 chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*. L'identification de ces deux gènes ne permet pas de conclure quant à l'existence d'une réponse de défense qui serait spécifique du système vasculaire ou de pathogènes vasculaires. La protéine PBL2 a été identifiée dans un crible visant à trouver des RLCK homologues de PBS1 clivés par l'ET3 AvrPphB du pathogène colonisant le mésophile *P. syringae* (Zhang *et al.*, 2010). La protéine PBL2 est requise pour l'induction de la PTI en réponse aux peptides flg22 et efl18 (Zhang *et al.*, 2010). La protéine RIPK est un régulateur négatif de la PTI et le gène est requis pour l'ETI dépendante de la phosphorylation de RIN4 par l'ET3 AvrB (Liu *et al.*, 2011). Ces deux gènes sont impliqués dans la résistance à un pathogène du mésophile mais aussi dans celle de *Xcc* 8004 qui est un pathogène vasculaire. Les gènes *RIPK* et *PBL2* ne sont donc pas spécifiques d'un tissu ou d'un type de pathogène. Durant cette étude, nous avons voulu voir si l'immunité induite par XopAC était spécifique des pathogènes vasculaires. Dans ce but, le gène *xopAC* a été introduit chez la souche GMI1000 de *R. solanacearum* et *Pto* DC3000. En plus de rendre la souche GMI1000 avirulente, *xopAC* induit une réponse immunitaire contre *Pto* DC3000 car cette souche était affectée dans l'induction des symptômes et dans sa croissance. Ces résultats montrent que *xopAC* induit une réponse immunitaire dans le système vasculaire mais également dans le mésophile. De façon intéressante, on n'observe pas de réponse immunitaire lorsque *Xcc* 8004 est infiltrée dans le mésophile des feuilles de l'écotype Col-0. L'une des hypothèses serait que *Xcc* 8004 possède un ou plusieurs ET3 (absent(s) chez *Pto* DC3000) capable de supprimer l'ETI induite par *xopAC* dans le mésophile. L'existence d'une spécificité tissulaire pour la reconnaissance des bactéries chez *A. thaliana* reste donc questionnable car les résultats de cette étude ne permettent pas de tirer une telle conclusion. Ces travaux sont en accord avec les résultats sur la souche GMI1000 de *R. solanacearum* qui montrent que l'ETI induite par l'ET3 PopP2 chez l'écotype

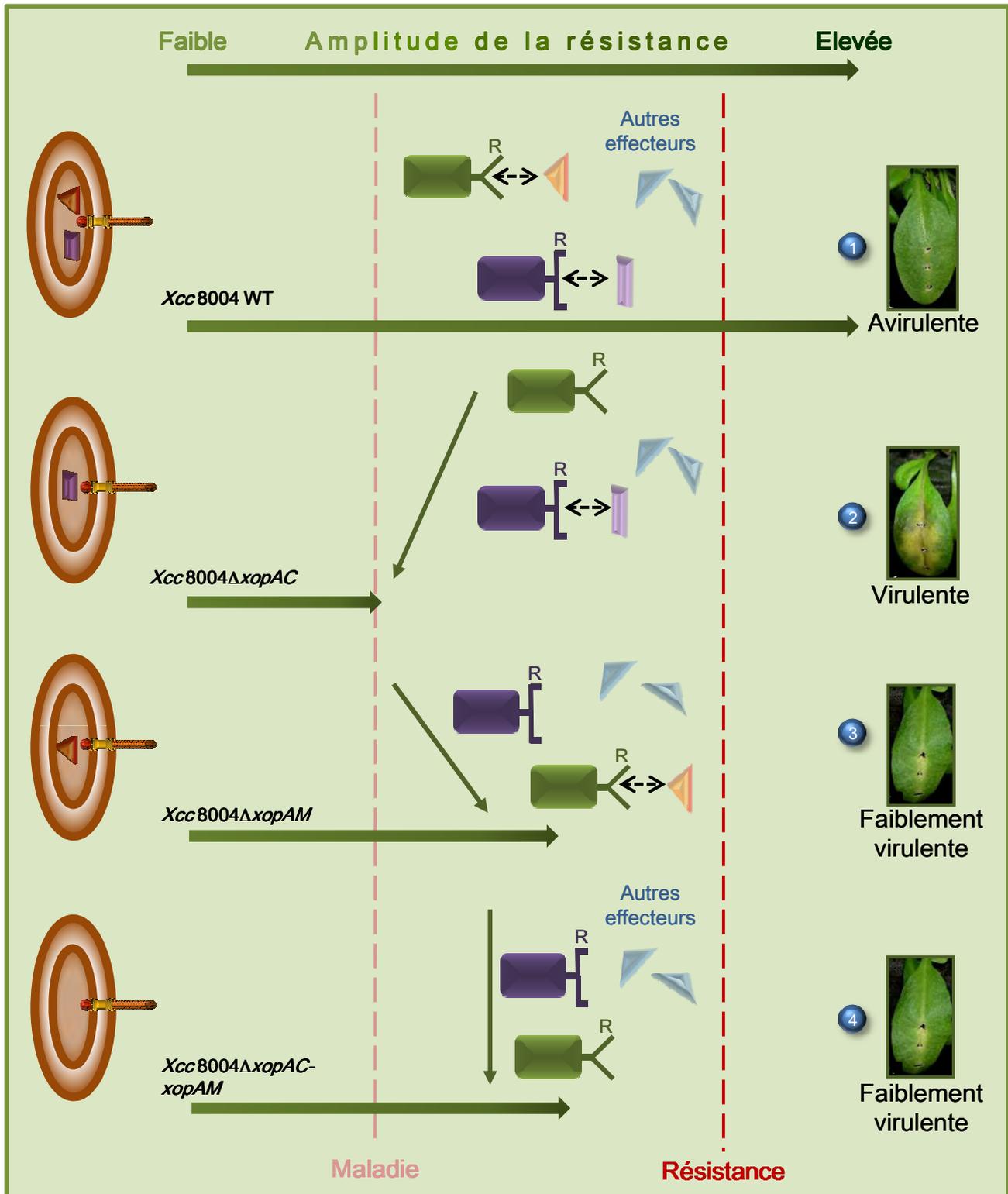


Figure AD : Modèle illustrant l'épistasie de *xopAM* sur *xopAC*. 1) La souche *Xcc 8004* est avirulente sur l'écotype Col-0 du fait de la reconnaissance directe ou indirecte de l'effecteur *xopAC* par un gène de résistance (*R* ; Xu *et al.*, 2008). Dans ce modèle, une seconde reconnaissance indirecte ou directe aurait lieu *via xopAM*. 2) La mutation du gène *xopAC* entraîne l'absence de la reconnaissance de *Xcc 8004*, suggérant que l'interaction entre *xopAC* et son gène de résistance est dominante. 3) La mutation du gène *xopAM* conduit à une reconnaissance partielle de la bactérie suggérant que *xopAM* potentialise l'activité d'avirulence de *xopAC*. 4) La mutation des gènes *xopAC* et *xopAM* entraîne une reconnaissance partielle de la bactérie similaire à celle en l'absence du gène *xopAC*. Plusieurs hypothèses sont envisageables afin d'expliquer cette épistasie. Cette reconnaissance partielle du double mutant pourrait être due au fait que la fonction d'avirulence de *xopAC* ne s'exprime qu'en présence de *xopAM* ou l'absence de *xopAC* et *xopAM* révèle la présence d'un nouveau gène d'avirulence. Elle pourrait aussi être due au fait que ces deux gènes sont importants pour le pouvoir pathogène.

Nd-1 (d'*A. thaliana*) requiert le gène *NDR1* qui est aussi important pour la résistance à des pathogènes du mésophile (Deslandes *et al.*, 2002).

Toutefois, des travaux récents montrent que la spécificité tissulaire pour la reconnaissance des pathogènes est présente chez *A. thaliana*. Une mutation du gène *wat1* chez l'écotype Col-0 confère une résistance accrue à des pathogènes vasculaire tels que *R. solanacearum* ou *Xcc* mais pas à des pathogènes du mésophile tels que *P. syringae* (Denance *et al.*, 2012). Bien que le gène soit exprimé de façon ubiquiste dans la plante, son expression semble préférentiellement associée au xylème (Ranocha *et al.*, 2010). Ce gène est lié à des modifications de la paroi cellulaire végétale. Cependant, les auteurs montrent que le rôle de WAT1 dans les modifications de la paroi secondaire ne joue pas de lien direct dans la résistance conférée par ce gène à un large spectre de pathogènes vasculaires (Denance *et al.*, 2012). Cette résistance pourrait être due à une modification de la sève du xylème notamment par une répression du métabolisme de l'indole qui priverait les pathogènes de tryptophane. Ces résultats démontrent clairement qu'une immunité vasculaire existe chez *A. thaliana*. Des études seraient nécessaires afin de savoir si l'expression des gènes *RIPK* et *PBL2* est similaire dans les deux types de tissus en présence ou en l'absence de *Xcc* afin d'expliquer la reconnaissance de *Xcc* dans le xylème.

En plus de l'effecteur *xopAC*, l'effecteur *xopAM* semble lui aussi reconnu chez l'écotype Col-0. Similairement à *xopAC*, la reconnaissance de *xopAM* présente une spécificité tissulaire. De plus, la mutation du gène *xopAM* est épistatique sur celle de *xopAC* (**Figure AD**). La résistance vasculaire est-elle dirigée plutôt contre *xopAM* que contre *xopAC* ? Les voies de reconnaissance de ces protéines sont-elles similaires ou partiellement similaires ? Quelle relation existe-t-il entre ces deux protéines ? Possèdent-elles des cibles de virulence similaires ? L'analyse fonctionnelle de *XopAM* permettra peut être de répondre à toutes ces questions. De plus, il serait intéressant de savoir si l'absence de reconnaissance de *Xcc* dans les mutants *pbl2* et *ripk* est liée à *xopAC* ou à *xopAM* ou aux deux gènes.

VII.2 Reconnaissance de *Xcc* chez *A. thaliana*

Comme expliqué ci-dessus, la reconnaissance de *Xcc* 8004 chez *A. thaliana* requiert deux RLCK : *PBL2* et *RIPK* (Guy *et al.*, en préparation). Ces deux protéines sont des protéines régulatrices des défenses PTI et ETI chez *A. thaliana* (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). *PBL2* est un régulateur positif de la PTI tandis que *RIPK* est un régulateur négatif de la PTI. La protéine *RIPK* est modifiée post-traductionnellement (uridylylation) par *XopAC* (**Figure YC**). Une autre protéine régulatrice de la PTI, *BIK1*, est aussi modifiée par *XopAC* (Feng *et al.*, 2012). Pourquoi *Xcc* cible-t-elle des protéines régulatrices des défenses alors

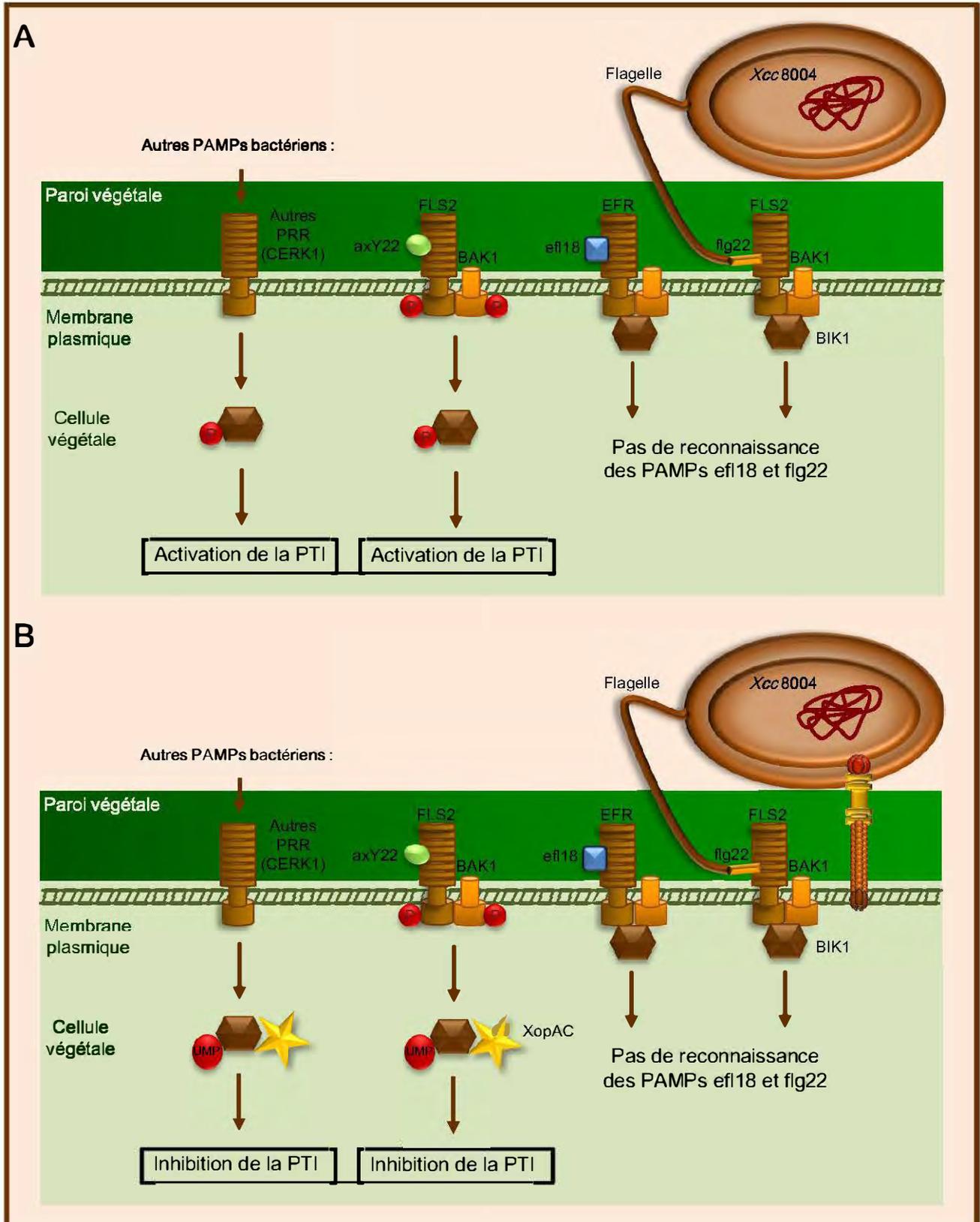


Figure AE : Inactivation de la PTI par XopAC. A) L'induction de la PTI par *Xcc 8004* repose probablement sur des PAMPs autres que efl18 et flg22 (tels que axY22) ainsi que des PRRs autres que FLS2 et EFR (comme CERK1). Cependant, cette induction nécessiterait la présence du régulateur positif de la PTI BIK1. B) La présence de ces PAMPs et PRRs pourrait expliquer la nécessité pour l'ET3 XopAC d'inhiber BIK1 afin de supprimer la PTI (Feng *et al.*, 2012). XopAC inhibe BIK1 en modifiant ce dernier par uridylylation (ajout d'un groupement AMP sur un résidu thréonine) afin de bloquer son activation par phosphorylation. PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern ; PRR : Pattern Recognition Receptor.

qu'il semblerait qu'elle ait mis au point des mécanismes pour éviter sa reconnaissance *via* les PRR de la PTI ?

Actuellement, l'inhibition de BIK1 par XopAC n'est pas très claire. La majorité des souches de *Xcc* possède une flagelline non élicitrice (Guy *et al.*, soumis ; Sun *et al.*, 2006). De plus, le peptide efl18 de *Xcc* 8004 possède deux modifications des résidus lysine (2^{ème} position) et phénylalanine (5^{ème} position) qui pourraient rendre ce peptide inactif dans l'induction des défenses *via* EFR (Kunze *et al.*, 2004). Ceci est le cas pour la bactérie *X. fastidiosa* qui possède une glutamine en 2^{ème} position (à la place de la lysine) rendant ce peptide 100 fois moins actif que le peptide efl18 (Kunze *et al.*, 2004). Actuellement, on ne connaît pas tous les PAMPs et les voies de signalisation de nombreux PRR, permettant l'activation de la PTI, restent à identifier. Il se pourrait que certaines d'entre elles passent par BIK1 et nécessiteraient donc l'inactivation de BIK1 par XopAC afin d'empêcher l'activation de la PTI (**Figure AEA**). Récemment, il a été montré que FLS2 est aussi capable de reconnaître les formes sulfonylées et non sulfonylées du peptide axY22 de la protéine Ax21 (Danna *et al.*, 2011). La reconnaissance de ce peptide induit les mêmes réponses de défense que flg22. Même si *Xcc* 8004 ne possède pas les gènes permettant la sulfonylation de axY22, cette souche est capable de produire et de sécréter axY22 et donc d'activer la PTI (Lee *et al.*, 2006). Cette activation, comme pour flg22 passe probablement par BIK1. Dans ce cas l'inactivation de BIK1 devient nécessaire (**Figure AEB**). Toutefois, le peptide axY22 est 100 fois moins actif que flg22 (Danna *et al.*, 2011). Si le peptide flg22 non reconnu de *Xcc* se fixe sur FLS2 mais n'induit pas l'activation de FLS2, il est peu probable que axY22 puisse se fixer à FLS2 et permettre la reconnaissance de *Xcc*. BIK1 est aussi capable d'interagir avec un autre PRR (CERK1 ; Zhang *et al.*, 2010). Le récepteur CERK1 permet la reconnaissance de la chitine. Bien que la chitine soit absente chez les bactéries, CERK1 contribue à la PTI contre *Pto* DC3000 suggérant que CERK1 reconnaît un PAMP encore non identifié chez *Pto* DC3000 (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009). CERK1 pourrait aussi reconnaître un PAMP chez *Xcc*. L'exemple de CERK1 montre qu'au moins un autre PRR justifie l'inactivation de BIK1 par *Xcc* (**Figure AE**). Il serait intéressant de savoir si le peptide flg22 non reconnu de *Xcc* est capable de se fixer à FLS2 sans induire l'activation de ce dernier et donc entrer en compétition avec axY22 pour la fixation à FLS2. Si FLS2 n'est pas capable de fixer le peptide flg22 de *Xcc*, le champ serait libre pour la fixation de axY22 et donc l'activation de la PTI. De plus, il serait intéressant de savoir si un extrait brut de *Xcc* est capable d'induire la phosphorylation de BIK1 et donc l'activation de la PTI ce qui suggérerait qu'un PAMP autre que efl18 et flg22 induit la PTI chez *Xcc*.

L'inhibition de BIK1 est un mystère mais celle de RIPK l'est encore plus. En effet, cette protéine est un régulateur négatif de la PTI et sa modification par uridylylation semble

être impliquée dans la reconnaissance de XopAC (**Figure AC** ; Feng *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011). XopAC est capable de supprimer l'ETI dépendante de AvrB/RPM1 *via* la modification de RIPK (**Figure AC**). De nombreux ET3 de l'espèce *P. syringae* sont capables d'interagir avec RIN4 même si ces protéines ne présentent aucune homologies entre-elles. C'est le cas pour l'ET3 HopF2 qui supprime l'ETI induite dû au clivage de RIN4 par AvrRpt2 (Deslandes and Rivas, 2012; Wilton *et al.*, 2010). Bien qu'il n'y ait pas d'homologue de AvrB chez *Xcc*, un autre ET3 pourrait induire la modification (probablement par phosphorylation) de RIN4 et donc induire l'ETI. Par exemple, chez *Xcc* l'ET3 XopAH fait partie de la même famille que AvrB (famille fido) et pourrait donc avoir un mode d'action similaire (Kinch *et al.*, 2009). Cette modification nécessiterait la présence de RIPK et donc justifierait l'inactivation de ce dernier par XopAC (**Figure AC**). Une autre hypothèse serait que dans la nature *Xcc* pourrait être en présence d'autres bactéries capable d'induire une ETI dépendante de RIN4 et RIPK. La modification de RIPK pourrait être intéressante d'un point de vue de « compétition » entre les microorganismes pour les ressources nutritives. En effet, la phosphorylation de RIN4 induit l'ouverture des stomates qui pourrait profiter à des bactéries du mésophile tel que *P. syringae* (Liu *et al.*, 2009a). L'inhibition de RIPK permettrait la fermeture des stomates (qui ne sont pas le mode d'entrée préférentiel de *Xcc*) et donc de bloquer l'entrée de microorganismes compétiteurs. Il serait intéressant de tester l'interaction entre RIN4 et les ET3 de *Xcc*. Si un ET3 de *Xcc* interagit avec RIN4, il faudra identifier la modification de RIN4 par cet ET3. De plus, la métagénomique de la phyllosphère d'*A. thaliana* permettrait de savoir quels types de microorganismes y sont présents et si ces microorganismes possèdent des ET3 capables de modifier RIN4. L'étude des voies de signalisation en aval de *PBL2* et *RIPK* permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction entre *Xcc* et l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*.

VII.3 Vers une meilleure compréhension de l'interaction Xcc-Brassicacées

Afin de mieux comprendre le comportement de *Xcc* sur ses plantes hôtes et d'identifier des traits génétiques qui contribuent à sa virulence, une étude de GWA a été mise au point en utilisant la plante modèle *A. thaliana*. Cette étude a permis de montrer que l'utilisation de plantes modèles ou de souches de référence peut fortement biaiser les conclusions sur l'implication d'un facteur de virulence dans l'adaptation d'une espèce ou d'un pathovar à ses plantes hôtes. Durant cette étude, les gènes *xopAC* et *xopAM* ont été identifiés comme étant des gènes d'avirulence sur l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*. De façon intéressante, *xopAC* est un gène de virulence sur différents cultivars de chou ainsi que sur l'écotype Kas d'*A. thaliana* et le gène *xopAM* est également un gène de virulence sur le radis chinois (Feng *et al.*, 2012;

Jiang *et al.*, 2009). De même, le gène *xopAC* ne contribue pas au pouvoir pathogène de toutes les souches de *Xcc* testées dans cette étude. Un autre aspect ressortant de ce travail est la présence de traits génétiques spécifiques de certaines souches telles que les TALs (Hax2, 3 et 4) qui contribuent à la virulence de *Xca5* sur l'écotype Kas. L'étude réalisée durant cette thèse visait à mettre au point les conditions permettant de faire du GWA chez les procaryotes. L'étape suivante a consisté à séquencer tous les génomes de toutes les souches de *Xcc* présentes dans cette étude afin de faire l'analyse en utilisant les SNPs et les Indels (L. Noël, A. Genissel, Génoscope et département SPE). En effet, dans cette étude nous avons utilisé des marqueurs AFLP qui n'ont pas pu être ancrés sur le génome et ils n'ont donc pas pu être exploités afin d'identifier les gènes proches de ces marqueurs. En plus de réaliser l'étude de GWA avec les SNPs/Indels, les souches de *Xcc* seront inoculées sur une vingtaine d'écotype d'une plante d'intérêt agronomique [chou ; (N. Denancé, A. Genissel, L. Noël et Limagrain)]. Ces études possèdent plusieurs intérêts : elles permettront non seulement d'identifier les loci associés au pouvoir pathogène sur *A. thaliana* mais également sur le chou. De plus, elles permettront de savoir si les stratégies de virulence utilisées par *Xcc* sont spécifiques d'une plante hôte ou s'il existe des mécanismes chevauchants pour la colonisation de différentes plantes hôtes.

En plus de permettre l'identification de loci associés à l'adaptation de *Xcc* sur ses différentes plantes hôtes, l'étude de GWA pourrait permettre d'identifier des loci associés à la colonisation du xylème. De façon intéressante, au sein des souches de *X. campestris* les deux spécificités tissulaires sont présentes. Les souches des pathovar *campestris* et *incanae* colonisent préférentiellement le xylème alors que les souches des pathovar *raphani* et de *Xc* colonisent le mésophile. L'utilisation de ces souches dans le GWA pourrait permettre l'identification de traits génétiques associés à la colonisation des tissus par l'espèce *X. campestris*. Dans ce but, les génomes d'autres souches des pathovar *raphani* (CFBP5828) et *incanae* (CFBP1606 et CFBP2527) et de *Xc* (CFBP5824 et CFBP5825) ont également été séquencés (**Tableau F** ; L. Noël, Génoscope et ANR Xanthomix). Toutes ces études pourraient également permettre d'identifier un gène cible pour rendre les récoltes résistantes à *Xcc* ou des marqueurs pour typer les souches de *Xcc* en champ (Limagrain).

VIII. Que reste-t-il de nos amours ? Que reste-t-il de ces beaux jours ?

Les études réalisées durant cette thèse ont permis d'acquérir des connaissances intéressantes sur la résistance à *Xcc*. A ce jour, ce travail est le premier à poser les bases

génétiques nécessaires à la reconnaissance de *Xcc* chez *A. thaliana*. De nombreux outils et résultats ont également été générés et laissent beaucoup de questions sans réponse. A mon grand regret, beaucoup de données n'ont pas encore pu être exploitées. Premièrement, la mutagenèse EMS des plantes Col-0-pER8::*xopAC*. Ces plantes possèdent un potentiel énorme dans la caractérisation des voies de signalisation permettant la reconnaissance de *xopAC* chez l'écotype Col-0. En plus de l'écotype Col-0, des plantes de l'écotype Kas ont également été générées. L'induction de *xopAC* chez l'écotype Kas présente un phénotype très contrasté en comparaison avec celui de l'écotype Col-0. Est-ce que cette différence pourrait être due à la fonction de virulence ou d'avirulence de *xopAC* chez l'une ou l'autre de ces plantes ? En plus de RIPK de nombreuses RLCK appartenant à la sous famille VII ont été identifiées dans le crible de double hybride chez la levure. Est-ce qu'il y aura des cibles communes entre les résultats du crible double hybride et la mutagenèse ? Est ce que toutes les RLCK sont de vraies cibles ou en d'autres termes est ce que XopAC est capable d'interagir et de modifier de façon aspécifique toutes ces protéines ? Il serait important de savoir si XopAC est un « sniper » qui cible des protéines bien spécifiques ou s'il cible tous les RLCK de la cellule afin de masquer sa vraie cible. Deux autres grands mystères qui n'ont pas été résolus durant cette thèse sont la découverte d'un autre gène d'avirulence (*xopAM*) et l'existence d'une immunité vasculaire. Est-ce qu'il y a un lien entre la reconnaissance de XopAC et XopAM et existe-il réellement une spécificité tissulaire pour la reconnaissance de ces deux gènes et donc de *Xcc* chez *A thaliana* ?

Parallèlement, nous avons réalisé une étude de GWA chez une bactérie pathogène afin d'identifier des loci associés au pouvoir pathogène. Cette étude a montré un grand potentiel dans l'identification de déterminants génétiques du pouvoir pathogène chez des bactéries. Les études qui seront réalisées avec les SNP/Indels et une plante d'intérêt économique (chou) seront sûrement très intéressantes et informatives. De plus, la présence de TAL a été observée chez les bactéries *Xcc*. Quelle est la diversité des RVD au sein de ces TALs ? Quelles sont les gènes ou voies de signalisation qui sont activés par ces ET3 ? Existe-t-il des cibles ou des voies de signalisation conservées entre *A. thaliana* et le chou.

C'est avec un grand intérêt que je suivrai les futures études sur l'analyse fonctionnelle des ET3 *xopAC*, *xopAM* et les TALs ainsi que les autres études réalisées dans l'équipe qui permettront de mieux comprendre les stratégies infectieuses de *Xcc*. Alors au travail l'équipe MAEL surtout **BRICE, NICOLAS, et LAURENT.**

“Parce que !,,

Références bibliographiques

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10306-10311.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B., and Martin, G.B. (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J* **22**: 60-69.
- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B. (2006a) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 601-611.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006b) Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2851-2856.
- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W. (2007) Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2531-2536.
- Afzal, A.J., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A. (2008) Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 507-517.
- Afzal, A.J., da Cunha, L., and Mackey, D. (2011) Separable fragments and membrane tethering of *Arabidopsis* RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *Plant Cell* **23**: 3798-3811.
- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. (2008) Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3295-3301.
- Albert, M., Jehle, A.K., Mueller, K., Eisele, C., Lipschis, M., and Felix, G. (2010) *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors for bacterial elongation factor Tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. *J Biol Chem* **285**: 19035-19042.
- 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., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., and Collmer, A. (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4856-4861.
- 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.
- An, C., and Mou, Z. (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *J Integr Plant Biol* **53**: 412-428.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, 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., 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.

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U., and Jones, J.B. (2000a) Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 911-921.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Vallejos, C.E., Davis, M.J., and Jones, J.B. (2000b) Xv4-vrxv4: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1346-1355.
- Athinuwat, D., Prathuangwong, S., Cursino, L., and Burr, T. (2009) *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* soybean cultivar virulence specificity is determined by *avrBs3* homolog *avrXg1*. *Phytopathology* **99**: 996-1004.
- Atwell, S., Huang, Y.S., Vilhjalmsdottir, B.J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A.M., Hu, T.T., Jiang, R., Muliyil, N.W., Zhang, X., Amer, M.A., Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., de Meaux, J., Ecker, J.R., Faure, N., Kniskern, J.M., Jones, J.D., Michael, T., Nemri, A., Roux, F., Salt, D.E., Tang, C., Todesco, M., Traw, M.B., Weigel, D., Marjoram, P., Borevitz, J.O., Bergelson, J., and Nordborg, M. (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**: 627-631.
- Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J. (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369-377.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T., and Bonas, U. (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 629-638.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., and Dangl, J.L. (2011) Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7**: e1002132.
- Barrett, L.G., Bell, T., Dwyer, G., and Bergelson, J. (2011) Cheating, trade-offs and the evolution of aggressiveness in a natural pathogen population. *Ecol Lett* **14**: 1149-1157.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 145-152.
- Bhavsar, A.P., Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2007) Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* **449**: 827-834.
- Bisgrove, S.R., Simonich, M.T., Smith, N.M., Sattler, A., and Innes, R.W. (1994) A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell* **6**: 927-933.
- Bittner-Eddy, P.D., and Beynon, J.L. (2001) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene, *RPP13-Nd*, functions independently of NDR1 and EDS1 and does not require the accumulation of salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 416-421.
- Blanvillain, S. (Thèse 2007) Etude des récepteurs TonB-dépendants et d'un nouvel effecteur de type III de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509-1512.
- Boch, J., and Bonas, U. (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 419-436.

- Bocsanczy, A.M., Nissinen, R.M., Oh, C.S., and Beer, S.V. (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* **9**: 425-434.
- Bogdanove, A.J., Koebnik, R., Lu, H., Furutani, A., Angiuoli, S.V., Patil, P.B., Van Sluys, M.A., Ryan, R.P., Meyer, D.F., Han, S.W., Aparna, G., Rajaram, M., Delcher, A.L., Phillippy, A.M., Puiu, D., Schatz, M.C., Shumway, M., Sommer, D.D., Trapnell, C., Benahmed, F., Dimitrov, G., Madupu, R., Radune, D., Sullivan, S., Jha, G., Ishihara, H., Lee, S.W., Pandey, A., Sharma, V., Sriariyanun, M., Szurek, B., Vera-Cruz, C.M., Dorman, K.S., Ronald, P.C., Verdier, V., Dow, J.M., Sonti, R.V., Tsuge, S., Brendel, V.P., Rabinowicz, P.D., Leach, J.E., White, F.F., and Salzberg, S.L. (2011) Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J Bacteriol* **193**: 5450-5464.
- Bolot, S., GUY, E., Carrere, S., Barbe, V., Arlat, M., Noel, L. (2013) Genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain Xca5. Genome Announcements.
- Bonas, U., Stall, R.E., and Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* **218**: 127-136.
- Boucher, C., Genin, S., and Arlat, M. (2001) [Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria]. *C R Acad Sci III* **324**: 915-922.
- Brachi, B., Faure, N., Horton, M., Flahauw, E., Vazquez, A., Nordborg, M., Bergelson, J., Cuguen, J., and Roux, F. (2010) Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genet* **6**: e1000940.
- Brito, B., Marendra, 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.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L., and Kunkel, B.N. (2004) Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 162-174.
- Burdman, S., Shen, Y., Lee, S.W., Xue, Q., and Ronald, P. (2004) RaxH/RaxR: a two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for AvrXa21 activity. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 602-612.
- Buttner, D., Nennstiel, D., Klusener, B., and Bonas, U. (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **184**: 2389-2398.
- Buttner, D., Noel, L., Thieme, F., and Bonas, U. (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J Biotechnol* **106**: 203-214.
- Buttner, D., Lorenz, C., Weber, E., and Bonas, U. (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **59**: 513-527.
- Buttner, D., Noel, L., Stuttmann, J., and Bonas, U. (2007) Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1063-1074.
- Buttner, D., and He, S.Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150**: 1656-1664.
- Buttner, D. and Bonas, U. (2009) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **1-27**.

- Buttner, D. (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 262-310.
- Canonne, J., Marino, D., Noel, L.D., Arechaga, I., Pichereaux, C., Rossignol, M., Roby, D., and Rivas, S. (2010) Detection and functional characterization of a 215 amino acid N-terminal extension in the *Xanthomonas* type III effector XopD. *PLoS One* **5**: e15773.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Roby, D., and Rivas, S. (2011) The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the Arabidopsis transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *Plant Cell* **23**: 3498-3511.
- Canteros, B., Minsavage, G., Bonas, U., Pring, D., and Stall, R. (1991) A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to avrBs3. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 628-632.
- Carr, J.P., Lewsey, M.G., and Palukaitis, P. (2010) Signaling in induced resistance. *Adv Virus Res* **76**: 57-121.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E.T., and Staskawicz, B.J. (2002) Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8336-8341.
- Castaneda, A., Reddy, J.D., El-Yacoubi, B., and Gabriel, D.W. (2005) Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1306-1317.
- Century, K.S., Holub, E.B., and Staskawicz, B.J. (1995) *NDR1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6597-6601.
- Champoiseau, P.G., Jones, J.B. and Allen, C. (2009) *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant health progress.
- Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Preston, G., Yuan, J., He, S.Y., and Collmer, A. (1998) The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol* **180**: 5211-5217.
- Chatterjee, A., Cui, Y., and Chatterjee, A.K. (2002) Regulation of *Erwinia carotovora* *hrpL*(Ecc) (sigma-L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 971-980.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., and Frommer, W.B. (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527-532.
- Chen, Z., Kloek, A.P., Boch, J., Katagiri, F., and Kunkel, B.N. (2000) The *Pseudomonas syringae* *avrRpt2* gene product promotes pathogen virulence from inside plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1312-1321.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500.
- Cho, B.K., Zengler, K., Qiu, Y., Park, Y.S., Knight, E.M., Barrett, C.L., Gao, Y., and Palsson, B.O. (2009) The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nat Biotechnol* **27**: 1043-1049.
- Chou, F.L., Chou, H.C., Lin, Y.S., Yang, B.Y., Lin, N.T., Weng, S.F., and Tseng, Y.H. (1997) The *Xanthomonas campestris* *gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 265-269.
- Chung, E.H., da Cunha, L., Wu, A.J., Gao, Z., Cherkis, K., Afzal, A.J., Mackey, D., and Dangl, J.L. (2011) Specific threonine phosphorylation of a host target by two

- unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants. *Cell Host Microbe* **9**: 125-136.
- Ciesiolka, L.D., Hwin, T., Gearlds, J.D., Minsavage, G.V., Saenz, R., Bravo, M., Handley, V., Conover, S.M., Zhang, H., Caporgno, J., Phengrasamy, N.B., Toms, A.O., Stall, R.E., and Whalen, M.C. (1999) Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 35-44.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Costechareyre, D., Bertolla, F., and Nesme, X. (2009) Homologous recombination in *Agrobacterium*: potential implications for the genomic species concept in bacteria. *Mol Biol Evol* **26**: 167-176.
- Coupat-Goutaland, B., Bernillon, D., Guidot, A., Prior, P., Nesme, X., and Bertolla, F. (2011) *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 497-505.
- 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.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Russell, A.B., Martin, G.B., and Collmer, A. (2011) Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2975-2980.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459-463.
- da Silva, F.G., Shen, Y., Dardick, C., Burdman, S., Yadav, R.C., de Leon, A.L., and Ronald, P.C. (2004) Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 593-601.
- Dangl, J.L., Ritter, C., Gibbon, M.J., Mur, L.A., Wood, J.R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J.D., and Vivian, A. (1992) Functional homologs of the Arabidopsis *RPM1* disease resistance gene in bean and pea. *Plant Cell* **4**: 1359-1369.
- Danna, C.H., Millet, Y.A., Koller, T., Han, S.W., Bent, A.F., Ronald, P.C., and Ausubel, F.M. (2011) The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 9286-9291.
- De Feyter, R., Yang, Y., and Gabriel, D.W. (1993) Gene-for-genes interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 225-237.
- Debenert, T., Lehnackers, H., Arnold, M. and Dangl, D.L. (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J* **1**: 289-302

- Denance, N., Ranocha, P., Oria, N., Barlet, X., Riviere, M.P., Yadeta, K.A., Hoffmann, L., Perreau, F., Clement, G., Maia-Grondard, A., van den Berg, G.C., Savelli, B., Fournier, S., Aubert, Y., Pelletier, S., Thomma, B.P., Molina, A., Jouanin, L., Marco, Y., and Goffner, D. (2012) *Arabidopsis wat1 (walls are thin1)*-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant J.*
- Denny, T.P. (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 173-197.
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M., and Marco, Y. (1998) Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 659-667.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2404-2409.
- 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.
- Deslandes, L., and Rivas, S. (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.*
- Dharmapuri, S., and Sonti, R.V. (1999) A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 53-59.
- Eitas, T.K., Nimchuk, Z.L., and Dangl, J.L. (2008) *Arabidopsis* TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector *AvrB*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6475-6480.
- Eitas, T.K., and Dangl, J.L. (2010) NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 472-477.
- Elmore, J.M., Lin, Z.J., and Coaker, G. (2011) Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 365-371.
- Escolar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O., and Bonas, U. (2001) Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins *AvrBs1* and *AvrBsT*. *Mol Plant Pathol* **2**: 287-296.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 366-371.
- Fargier, E., and Manceau, C. (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* **56**: 805-818.
- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M., and Manceau, C. (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst Appl Microbiol* **34**: 156-165.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"? Pages 449-461 in: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265-276.
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C., and Zhou, J.M. (2012) A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**: 114-118.
- Fenselau, S., and Bonas, U. (1995) Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes

- eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 845-854.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J* **20**: 5400-5411.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E. (2005) *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell* **17**: 2601-2613.
- Filiatrault, M.J., Stodghill, P.V., Bronstein, P.A., Moll, S., Lindeberg, M., Grills, G., Schweitzer, P., Wang, W., Schroth, G.P., Luo, S., Khrebtukova, I., Yang, Y., Thannhauser, T., Butcher, B.G., Cartinhour, S., and Schneider, D.J. (2011) Transcriptome analysis of *Pseudomonas syringae* identifies new genes, noncoding RNAs, and antisense activity. *J Bacteriol* **192**: 2359-2372.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Microbiol* **9**: 275-296.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., and Alfano, J.R. (2007) A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**: 284-288.
- Furutani, A., Takaoka, M., Sanada, H., Noguchi, Y., Oku, T., Tsuno, K., Ochiai, H., and Tsuge, S. (2009) Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 96-106.
- 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.
- Gassmann, W. (2005) Natural variation in the *Arabidopsis* response to the avirulence gene *hopPsyA* uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1054-1060.
- Gaudriault, S., Brisset, M.N., and Barny, M.A. (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett* **428**: 224-228.
- 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. (2010) Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol* **187**: 920-928.
- Gibly, A., Bonshtien, A., Balaji, V., Debbie, P., Martin, G.B., and Sessa, G. (2004) Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1212-1222.
- Gimenez-Ibanez, S., Ntoukakis, V., and Rathjen, J.P. (2009) The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **4**: 539-541.
- Glazebrook, J., and Ausubel, F.M. (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8955-8959.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M. (1997) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**: 381-392.

- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis--2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 301-308.
- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S. (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**: 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-284.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T. (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1155-1163.
- Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R., Loniello, A.O., He, S.Y., and Collmer, A. (1996) Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell* **8**: 1095-1105.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z. (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**: 1122-1125.
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A. (2009a) Stomata and pathogens: Warfare at the gates. *Plant Signal Behav* **4**: 1114-1116.
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A. (2009b) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* **149**: 1017-1027.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., and Alfano, J.R. (2009) The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1069-1080.
- Gurlebeck, D., Szurek, B., and Bonas, U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J* **42**: 175-187.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* **163**: 233-255.
- Guttman, D.S., and Greenberg, J.T. (2001) Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 145-155.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G., and Greenberg, J.T. (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**: 1722-1726.
- Guy, E., Genissel, A., Hajri, A., Chabannes, M., David, P., Carrere, S., Lautier, M., Boureau, T., Arlat, M., Poussier, S. and Noel, L.D. (2012) Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics. **Soumis**.
- Guy, E., Lautier, M., Chabannes, M., Roux, B., Arlat, M. and Noel, L.D. (2012) Effector-triggered immunity mediated by the *Xanthomonas* XopAC protein depends on the *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinase RIPK and PBL2. **En préparation**.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., and Poussier, S. (2009) A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* **4**: e6632.
- Hatterman, D.R. and Ries, S.M. (1989) Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its Role in Infection. *Phytopathology* **79**: 284-289.

- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y. (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8577-8582.
- He, S.Y., Huang, H.C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**: 1255-1266.
- He, Y.Q., Zhang, L., Jiang, B.L., Zhang, Z.C., Xu, R.Q., Tang, D.J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J., Cao, J.R., Zhang, S.S., Wei, M.L., Liang, X.X., Lu, G.T., Feng, J.X., Chen, B., Cheng, J., and Tang, J.L. (2007) Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol* **8**: R218.
- Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-334.
- Herbers, K., Jutta Conrads-Strauch, J. and Bonas, U. (1992) Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* **356**: 172-174.
- Hirsch, M., and Staskawicz, B. (1996) Identification of a new *Arabidopsis* disease resistance locus, *RPS4*, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 55-61.
- Hopkins, C.M., White, F.F., Choi, S.H., Guo, A., and Leach, J.E. (1992) Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 451-459.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M.B. (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol* **50**: 377-389.
- Hou, S., Yang, Y., Wu, D., and Zhang, C. (2011) Plant immunity: evolutionary insights from PBS1, Pto, and RIN4. *Plant Signal Behav* **6**: 794-799.
- Huang, H.C., Lin, R.H., Chang, C.J., Collmer, A., and Deng, W.L. (1995) The complete hrp gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpinPss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologs. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 733-746.
- Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10098-10103.
- Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J. (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 537-543.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K., and Bonas, U. (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* **29**: 1379-1390.
- Huynh, T.V., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J. (1989) Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* **245**: 1374-1377.
- Innes, R.W., Bisgrove, S.R., Smith, N.M., Bent, A.F., Staskawicz, B.J., and Liu, Y.C. (1993) Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the *RPG1* locus of soybean. *Plant J* **4**: 813-820.
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaihara, T., Inagaki, Y., Toyoda, K. and Shiraishi, T. (2003) need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-defective mutants $\Delta fliC$ and $\Delta fliD$ in host tobacco plants. *J Gen Plant Pathol* **69**: 244-249.
- Jalan, N., Aritua, V., Kumar, D., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., Setubal, J.C., and Wang, N. (2011) Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*

- F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. *J Bacteriol* **193**: 6342-6357.
- 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.
- Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J., Walters K., Betteridge, P., Teverson, D. and Taylor, J. (1991) Gene-for-Gene Interaction Between *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* and *Phaseolus*. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 553-562.
- Jeong, B.R., Lin, Y., Joe, A., Guo, M., Korneli, C., Yang, H., Wang, P., Yu, M., Cerny, R.L., Staiger, D., Alfano, J.R., and Xu, Y. (2011) Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity. *J Biol Chem* **286**: 43272-43281.
- Jha, G., Rajeshwari, R., and Sonti, R.V. (2005) Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 891-898.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* **19**: 4004-4014.
- Jiang, B.L., He, Y.Q., Cen, W.J., Wei, H.Y., Jiang, G.F., Jiang, W., Hang, X.H., Feng, J.X., Lu, G.T., Tang, D.J., and Tang, J.L. (2008) The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. *Res Microbiol* **159**: 216-220.
- Jiang, W., Jiang, B.L., Xu, R.Q., Huang, J.D., Wei, H.Y., Jiang, G.F., Cen, W.J., Liu, J., Ge, Y.Y., Li, G.H., Su, L.L., Hang, X.H., Tang, D.J., Lu, G.T., Feng, J.X., He, Y.Q., and Tang, J.L. (2009) Identification of six type III effector genes with the PIP-box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1401-1411.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., and Schaad, N.W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**: 755-762.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Kamdar, H.V., Kamoun, S., and Kado, C.I. (1993) Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *J Bacteriol* **175**: 2017-2025.
- Kao, C.C., Barlow, E., and Sequeira, L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **174**: 1068-1071.
- Katzen, F., Ferreiro, D.U., Oddo, C.G., Ielmini, M.V., Becker, A., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol* **180**: 1607-1617.
- Kay, S., Boch, J., and Bonas, U. (2005) Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 838-848.
- 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.
- Kemp, B.P., Horne, J. Bryant, A. and Cooper., R.M. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**: 209-218.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L. (2005a) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target,

- RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6496-6501.
- Kim, J.F., and Beer, S.V. (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* **180**: 5203-5210.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005b) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**: 749-759.
- Kim, S.H., Kwon, S.I., Saha, D., Anyanwu, N.C., and Gassmann, W. (2009) Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant Physiol* **150**: 1723-1732.
- Kim, Y.J., Lin, N.C., and Martin, G.B. (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* **109**: 589-598.
- Kinch, L.N., Yarbrough, M.L., Orth, K., and Grishin, N.V. (2009) Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB. *PLoS One* **4**: e5818.
- Knoop, V., Staskawicz, B., and Bonas, U. (1991) Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of hrp genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol* **173**: 7142-7150.
- Kobayashi, D.Y., Tamaki, S.J., and Keen, N.T. (1989) Cloned avirulence genes from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 157-161.
- Kobayashi, D.Y., Tamaki, S.J., and Keen, N.T. (1990) Molecular characterization of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 94-102.
- Komano, T., Utsumi, R., and Kawamukai, M. (1991) Functional analysis of the fic gene involved in regulation of cell division. *Res Microbiol* **142**: 269-277.
- Kruglyak, L. (2008) The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* **9**: 314-318.
- Kunkel, B.N., Bent, A.F., Dahlbeck, D., Innes, R.W., and Staskawicz, B.J. (1993) RPS2, an Arabidopsis disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell* **5**: 865-875.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496-3507.
- Kvitko, B.H., Park, D.H., Velasquez, A.C., Wei, C.F., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J., and Collmer, A. (2009) Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog* **5**: e1000388.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., Jones, J.D., and Zipfel, C. (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* **28**: 365-369.
- Lagaert, S., Belien, T., and Volckaert, G. (2009) Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 1064-1073.
- Lee, A.H., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P.W., Quach, V., Lewis, J.D., Liu, Y.C., Bornke, F., Angers, S., Wilde, A., Guttman, D.S., and Desveaux, D. (2012) A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathog* **8**: e1002523.
- Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H., Koh, N.H., Seo, J.S., and Go, S.J. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res* **33**: 577-586.
- 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.
- Lee, S.W., Han, S.W., Bartley, L.E., and Ronald, P.C. (2006) From the Academy: Colloquium review. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18395-18400.
- Lee, S.W., Han, S.W., Sririyanum, M., Park, C.J., Seo, Y.S., and Ronald, P.C. (2009) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science* **326**: 850-853.
- Lewis, J.D., Wu, R., Guttman, D.S., and Desveaux, D. (2010) Allele-specific virulence attenuation of the *Pseudomonas syringae* HopZ1a type III effector via the *Arabidopsis* ZAR1 resistance protein. *PLoS Genet* **6**: e1000894.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J. (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168**: 512-522.
- Liu, J., Elmore, J.M., and Coaker, G. (2009a) Investigating the functions of the RIN4 protein complex during plant innate immune responses. *Plant Signal Behav* **4**: 1107-1110.
- Liu, J., Elmore, J.M., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Staskawicz, B.J., and Coaker, G. (2009b) RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol* **7**: e1000139.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.J., and Coaker, G. (2011) A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* **9**: 137-146.
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U., and Buttner, D. (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* **69**: 344-360.
- Lovell, H.C., Mansfield, J.W., Godfrey, S.A., Jackson, R.W., Hancock, J.T., and Arnold, D.L. (2009) Bacterial evolution by genomic island transfer occurs via DNA transformation *in planta*. *Curr Biol* **19**: 1586-1590.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 496-501.
- Luderer, R., Rivas, S., Nurnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A., Romeis, T., Wehrfritz, J.M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J.D., De Wit, P.J., and Joosten, M.H. (2001) No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 867-876.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 743-754.
- Mackey, D., Belkadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L. (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379-389.
- Malamud, F., Torres, P.S., Roeschlin, R., Rigano, L.A., Enrique, R., Bonomi, H.R., Castagnaro, A.P., Marano, M.R., and Vojnov, A.A. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* **157**: 819-829.
- Mansfield, J., Jenner, C., Hockenull, R., Bennett, M.A., and Stewart, R. (1994) Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 726-739.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sririyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., and Foster, G.D. (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 614-629.

- 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.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 637-646.
- Martin, J.A., and Wang, Z. (2011) Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet* **12**: 671-682.
- McCarthy, M.I., Abecasis, G.R., Cardon, L.R., Goldstein, D.B., Little, J., Ioannidis, J.P., and Hirschhorn, J.N. (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* **9**: 356-369.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H., and Staskawicz, B.J. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J* **14**: 247-257.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C.Q., Al Sady, B., Clark, E.T., and Staskawicz, B.J. (2005) The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **41**: 801-814.
- Meyer, D., Lauber, E., Roby, D., Arlat, M., and Kroj, T. (2005) Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology* **6**: 327-333.
- Meyer, D., Cunnac, S., Gueneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., Boucher, C., and Arlat, M. (2006) PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol* **188**: 4903-4917.
- Meyer, D.F. and Bogdanove, A.J. (2009) Genomics-driven Advances in *Xanthomonas* biology. p. 147-163. *Plant Pathogenic Bacteria*. Jackson, R. W.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 809-834.
- Midha, S., Ranjan, M., Sharma, V., Pinnaka, A.K., and Patil, P.B. (2012) Genome sequence of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* strain LMG 941. *J Bacteriol* **194**: 3031.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., and Stall, R. E. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 41-47.
- Misas-Villamil, J.C., Kolodziejek, I., and van der Hoorn, R.A. (2011) *Pseudomonas syringae* colonizes distant tissues in *Nicotiana benthamiana* through xylem vessels. *Plant J* **67**: 774-782.
- Mittal, S., and Davis, K.R. (1995) Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 165-171.
- Monaghan, J., and Zipfel, C. (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 349-357.
- Morales, C.Q., Posada, J., Macneale, E., Franklin, D., Rivas, I., Bravo, M., Minsavage, J., Stall, R.E., and Whalen, M.C. (2005) Functional analysis of the early chlorosis factor gene. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 477-486.
- Moreira, L.M., Almeida, N.F., Jr., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., da Silva, A.C., da Silva, A.M., de Moraes, F.E., de Oliveira, J.C., de Souza, R.F., Facincani, A.P., Ferraz, A.L., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gimenez, D.F., Jones, J.B., Kitajima, E.W., Laia, M.L., Leite, R.P., Jr., Nishiyama, M.Y., Rodrigues Neto, J., Nociti, L.A., Norman, D.J., Ostroski, E.H., Pereira, H.A., Jr., Staskawicz, B.J., Tezza,

- R.I., Ferro, J.A., Vinatzer, B.A., and Setubal, J.C. (2010) Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* **11**: 238.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501.
- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U., and Staskawicz, B.J. (2000) Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13324-13329.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., and Orth, K. (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.
- Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galan, J.E., and Roy, C.R. (2011) Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477**: 103-106.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501-520.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M. (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**: 1344-1349.
- Napoli, C., and Staskawicz, B. (1987) Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**: 572-578.
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., and Narusaka, Y. (2009) *RRS1* and *RPS4* provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J* **60**: 218-226.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with *Avr* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* **135**: 1113-1128.
- Nimchuk, Z.L., Fisher, E.J., Desveaux, D., Chang, J.H., and Dangl, J.L. (2007) The HopX (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 346-357.
- Nino-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J. (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol* **7**: 303-324.
- Nishimura, M.T., and Dangl, J.L. (2010) *Arabidopsis* and the plant immune system. *Plant J* **61**: 1053-1066.
- Noel, 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.
- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. (2002) Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol* **184**: 1340-1348.
- Noel, L., Thieme, F., Gabler, J., Buttner, D., and Bonas, U. (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **185**: 7092-7102.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y. (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**: 220-223.
- Nomura, K., Mecey, C., Lee, Y.N., Imboden, L.A., Chang, J.H., and He, S.Y. (2011) Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10774-10779.

Références bibliographiques

- O'Brien, H.E., Thakur, S., and Guttman, D.S. (2011) Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 269-289.
- Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A. and Kaku, H. (2005) Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. *JARQ* **39**: 275-287.
- Parker, J.E., Barber, C.E., Fan, M.J., and Daniels, M.J. (1993) Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X. c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 216-224.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J. (1996) Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell* **8**: 2033-2046.
- Peck, S.C., Nuhse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., and Boller, T. (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* **13**: 1467-1475.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A., and Alfano, J.R. (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7652-7657.
- Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., and Alfano, J.R. (2005) The hrpK operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *J Bacteriol* **187**: 649-663.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F. (2004) Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 696-706.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., and Rott, P. (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomics* **10**: 616.
- Pinto, A.C., Melo-Barbosa, H.P., Miyoshi, A., Silva, A., and Azevedo, V. (2011) Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res* **10**: 1707-1718.
- Pitman, A.R., Jackson, R.W., Mansfield, J.W., Kaitell, V., Thwaites, R., and Arnold, D.L. (2005) Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. *Curr Biol* **15**: 2230-2235.
- Poplawsky, A.R., and Chun, W. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 466-475.
- Poplawsky, A.R., Urban, S.C., and Chun, W. (2000) Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5123-5127.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., and Jones, J.B. (2011) Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* **12**: 146.
- Potnis, N., Minsavage, G., Smith, J.K., Hurlbert, J.C., Norman, D., Rodrigues, R., Stall, R.E., and Jones, J.B. (2012) Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 307-320.

- Poueymiro, M., and Genin, S. (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* **12**: 44-52.
- Puri, N., Jenner, C., Bennett, M., Stewart, R., Mansfield, J., Lyons, N., and Taylor, J. (1997) Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 247-256.
- Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2012) Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* **12**: 702-708.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B.L., Zeng, S., Gu, W.Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L., and He, C. (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**: 757-767.
- Racape, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., Nurnberger, T., Parlange, F., Puvarel, 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.
- Rademaker, J.L., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F.J. (2005) A comprehensive species to strain taxonomic framework for *xanthomonas*. *Phytopathology* **95**: 1098-1111.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., and Sonti, R.V. (1997) The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett* **415**: 125-128.
- Ranocha, P., Denance, N., Vanholme, R., Freyrier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., Kohler, L., Pouzet, C., Renou, J.P., Sundberg, B., Boerjan, W., and Goffner, D. (2010) Walls are thin 1 (WAT1), an *Arabidopsis* homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant J*.
- Ray, S.K., Rajeshwari, R., and Sonti, R.V. (2000) Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 394-401.
- Ritter, C., and Dangl, J.L. (1996) Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes. *Plant Cell* **8**: 251-257.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Kochner, P., Felix, G., Shiu, S.H., and Boller, T. (2007) Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* **64**: 539-547.
- Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J., and Mudgett, M.B. (2004) A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16624-16629.
- Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N., and Romantschuk, M. (1997a) Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett* **417**: 168-172.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He, S.Y. (1997b) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3459-3464.
- Romeis, T., Tang, S., Hammond-Kosack, K., Piedras, P., Blatt, M., and Jones, J.D. (2000) Early signalling events in the Avr9/Cf-9-dependent plant defence response. *Mol Plant Pathol* **1**: 3-8.
- Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., and Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* **318**: 645-648.

- Ronald, P.C., and Staskawicz, B.J. (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol Plant Microbe Interact* **1**: 191-198.
- Ronald, P.C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K.S., McCouch, S., and Tanksley, S.D. (1992a) Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. *Mol Gen Genet* **236**: 113-120.
- Ronald, P.C., Salmeron, J.M., Carland, F.M., and Staskawicz, B.J. (1992b) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bacteriol* **174**: 1604-1611.
- Rott, P.C., Costet, L., Davis, M.J., Frutos, R., and Gabriel, D.W. (1996) At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J Bacteriol* **178**: 4590-4596.
- Ryan, R.P., Vorholter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* **9**: 344-355.
- Rybak, M., Minsavage, G.V., Stall, R.E., and Jones, J.B. (2009) Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. *Mol Plant Pathol* **10**: 249-262.
- 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.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E., Rommens, C.M., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J. (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* **86**: 123-133.
- Salzberg, S.L., Sommer, D.D., Schatz, M.C., Phillippy, A.M., Rabinowicz, P.D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A.L., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D., Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P.B., Ishihara, H., Meyer, D.F., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J.M., Ryan, R.P., Hirata, H., Tsuyumu, S., Won Lee, S., Seo, Y.S., Sriariyanum, M., Ronald, P.C., Sonti, R.V., Van Sluys, M.A., Leach, J.E., White, F.F., and Bogdanove, A.J. (2008) Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* **9**: 204.
- Samudrala, R., Heffron, F., and McDermott, J.E. (2009) Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathog* **5**: e1000375.
- Sarkar, S.F., Gordon, J.S., Martin, G.B., and Guttman, D.S. (2006) Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* **174**: 1041-1056.
- Schaad, N.W. and Dianese, J.D. (1981) Cruciferous Weeds as Source of Inoculum of *Xanthomonas campestris* in Black Rot of Crucifers. *Phytopathology* **71**: 1215-1220.
- Schmidtke, C., Findeiss, S., Sharma, C.M., Kuhfuss, J., Hoffmann, S., Vogel, J., Stadler, P.F., and Bonas, U. (2012) Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Res* **40**: 2020-2031.
- Schorneck, S., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Jones, J.B., and Lahaye, T. (2008) Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol* **179**: 546-556.
- Schulze, S., Kay, S., Buttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Kruger, A., Lee, J., Muller, O., Scheel, D., Szczesny, R., Thieme, F., and Bonas, U. (2012) Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol* **195**: 894-911.
- Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., and Zipfel, C. (2011) Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death,

- and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet* **7**: e1002046.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W. (2003) Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**: 1230-1233.
- Sharma, V., Midha, S., Ranjan, M., Pinnaka, A.K., and Patil, P.B. (2012) Genome sequence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* strain LMG 859. *J Bacteriol* **194**: 2395.
- Shaw, J.J. and Kado, C.I. (1988) Whole Plant Wound Inoculation for Consistent Reproduction of Black Rot of Crucifers. *Phytopathology* **78**: 981-986.
- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P. (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**: 1098-1103.
- Simonich, M.T., and Innes, R.W. (1995) A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 637-640.
- Simpson, R.B. and Johnson, L.J. (1990) *Arabidopsis thaliana* as a Host for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 233-237.
- Sole, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D., Deslandes, L., and Valls, M. (2012) The *avr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 941-953.
- Song, C., and Yang, B. (2010) Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ(PXO99) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 893-902.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., and Ronald, P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804-1806.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., and Bent, A.F. (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* **18**: 764-779.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T., and Gabriel, D.W. (1992) An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 204-213.
- Szczesny, R., Buttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A., and Bonas, U. (2010a) Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol* **187**: 1058-1074.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U., and Buttner, D. (2010b) Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187**: 983-1002.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., and Van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**: 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., and Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**: 13-23.
- Tamaki, S., Dahlbeck, D., Staskawicz, B., and Keen, N.T. (1988) Characterization and expression of two avirulence genes cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **170**: 4846-4854.
- 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.

- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C. (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* **183**: 3597-3605.
- Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Kieffer-Jacquiod, S., Rivas, S., Marco, Y., and Deslandes, L. (2010) Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog* **6**: e1001202.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorholter, F.J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**: 7254-7266.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G., and Bonas, U. (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1250-1261.
- Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**: 373-378.
- Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M.A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J.D., and Murillo, J. (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *Embo J* **19**: 3204-3214.
- Tsuge, S., Nakayama, T., Terashima, S., Ochiai, H., Furutani, A., Oku, T., Tsuno, K., Kubo, Y., and Kaku, H. (2006) Gene involved in transcriptional activation of the hrp regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* **188**: 4158-4162.
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y. (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**: 658-672.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**: 1307-1316.
- Van der Biezen, E.A., and Jones, J.D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456.
- van Dijk, K., Fouts, D.E., Rehm, A.H., Hill, A.R., Collmer, A., and Alfano, J.R. (1999) The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J Bacteriol* **181**: 4790-4797.
- 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.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *xanthomonas*. *Phytopathology* **90**: 677-682.
- Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., Abuqamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.A., Hirt, H., and Mengiste, T. (2006) The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **18**: 257-273.

- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., and Taylor, J.D. (2001) Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. *Phytopathology* **91**: 492-499.
- Vicente, J.G., and Holub, E.B. (2012) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol*.
- Vivian, A. and Arnold, D.L. (2000) Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *Journal of Plant Pathology* **82**: 163-178.
- Vorholter, F.J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V.K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S.A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K., and Puhler, A. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* **134**: 33-45.
- Wang, L., Tang, X., and He, C. (2007) The bifunctional effector AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires plasma membrane-anchoring for host recognition. *Mol Plant Pathol* **8**: 491-501.
- Wanner, L.A., Mittal, S., and Davis, K.R. (1993) Recognition of the avirulence gene *avrB* from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 582-591.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U., and Koebnik, R. (2005) The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J Bacteriol* **187**: 2458-2468.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C., and Collmer, A. (2007) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **51**: 32-46.
- Wei, Z., Kim, J.F., and Beer, S.V. (2000) Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1251-1262.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S.V. (1992a) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85-88.
- Wei, Z.M., Sneath, B.J., and Beer, S.V. (1992b) Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* **174**: 1875-1882.
- Wei, Z.M., and Beer, S.V. (1995) *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* **177**: 6201-6210.
- 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.
- Whalen, M.C., Stall, R.E., and Staskawicz, B.J. (1988) Characterization of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6743-6747.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., and Staskawicz, B.J. (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**: 49-59.
- White, F.F., Potnis, N., Jones, J.B., and Koebnik, R. (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol* **10**: 749-766.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., and Desveaux, D. (2010) The type III effector HopF2Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2349-2354.

- Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., Corbeil, L.B., Koller, A., Mendez, J.C., Zekarias, B., Lazar, C., and Dixon, J.E. (2009) The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol Cell* **34**: 93-103.
- 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.
- Xiang, T., Zong, N., Zhang, J., Chen, J., Chen, M., and Zhou, J.M. (2011) BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 100-107.
- Xu, R.Q., Blanvillain, S., Feng, J.X., Jiang, B.L., Li, X.Z., Wei, H.Y., Kroj, T., Lauber, E., Roby, D., Chen, B., He, Y.Q., Lu, G.T., Tang, D.J., Vasse, J., Arlat, M., and Tang, J.L. (2008) AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol* **190**: 343-355.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010) PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 508-522.
- Yarbrough, M.L., Li, Y., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Ball, H.L., and Orth, K. (2009) AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* **323**: 269-272.
- Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. (2002) *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *Embo J* **21**: 2923-2935.
- Young, S.A., Park, S.K., Rodgers, C., Mitchell, R.E., and Bender, C.L. (1992) Physical and functional characterization of the gene cluster encoding the polyketide phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **174**: 1837-1843.
- Yu, J., Penalzoza-Vazquez, A., Chakrabarty, A.M., and Bender, C.L. (1999) Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol* **33**: 712-720.
- Yucel, I., Slaymaker, D., Boyd, C., Murillo, J., Buzzell, R.I., and Keen, N.T. (1994) Avirulence gene *avrPphC* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 3121: a plasmid-borne homologue of *avrC* closely linked to an *avrD* allele. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 677-679.
- Zeng, W., Melotto, M., and He, S.Y. (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 599-603.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y., and Zhou, J.M. (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**: 290-301.
- Zhao, B., Ardales, E.Y., Raymundo, A., Bai, J., Trick, H.N., Leach, J.E., and Hulbert, S.H. (2004) The *avrRxo1* gene from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* confers a nonhost defense reaction on maize with resistance gene *Rxo1*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 771-779.
- Zhou, H., Morgan, R.L., Guttman, D.S., and Ma, W. (2009) Allelic variants of the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 are differentially recognized by plant resistance systems. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 176-189.
- Zhu, S., Jeong, R.D., Venugopal, S.C., Lapchyk, L., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2011) SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathog* **7**: e1002318.
- Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J.M., Johnson, L.B., and White, F.F. (1998) AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 824-832.
- Zipfel, C., and Felix, G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**: 353-360.

- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760.
- Zipfel, C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10-16.
- Zipfel, C. (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 414-420.
- Zou, H., Zhao, W., Zhang, X., Han, Y., Zou, L., and Chen, G. (2010) Identification of an avirulence gene, *avrxa5*, from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Sci China Life Sci* **53**: 1440-1449.
- Zou, L.F., Wang, X.P., Xiang, Y., Zhang, B., Li, Y.R., Xiao, Y.L., Wang, J.S., Walmsley, A.R., and Chen, G.Y. (2006) Elucidation of the hrp clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6212-6224.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**: 265-273.

Author: Endrick GUY

Title: Contribution of the effectome and the type three effector XopAC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to its aggressiveness on *A. thaliana*

PhD supervisor: Laurent NOËL

Place and date of the PhD defense: Thursday, February 14th, 2013, salle de conférence Marc Ridet, campus INRA-Auzeville

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) is a vascular bacterial pathogen and the causal agent of black rot disease of Brassicaceae. To colonize its host plants, *Xcc* translocates virulence proteins called type 3 effectors (T3E) directly into the host cell thanks to its type 3 secretion system. Inside the host cell, T3E manipulates the cell metabolism to dampen the plant defenses and allow efficient multiplication of the pathogen. In order to identify T3E associated with a modification of the aggressiveness of *Xcc* on two ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (Kashmir and Columbia-0), a Genome-Wide Association (GWA) study was performed using the variable T3E of *Xcc*. The GWA study and the deletion of the T3E in the strain 8004 allowed the identification of nine T3E controlling aggressiveness of *Xcc*. Among them, *xopAC* was identified as the major avirulence gene of *Xcc* on Col-0 ecotype whereas *xopAM* is a minor avirulence gene on the same plant. Functional analyses of *xopAC* show that the two domains of XopAC (LRR and Fic) are required to its avirulence function on the Col-0 ecotype and for *xopAC*-induced necrosis on nonhost plants. The LRR domain is also necessary to localize XopAC *in planta* to the plasma membrane. Moreover, search for plant targets of XopAC identified two Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, RIPK and PBL2 which are required for the recognition of the strain 8004 by Col-0. This work gives the genetic bases to unravel the immunity of Brassicaceae to *Xcc*.

Key words: *Xanthomonas*, *Xcc*, GWA, *xopAC*, *xopAM*, Fic, LRR, RLCK, *RIPK* and *PBL2*

Discipline: Plants-Microorganisms Interaction

Laboratory: Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), 24 chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

Auteur : Endrick GUY

Titre : Contribution de l'effectome et de l'effecteur de type 3 XopAC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* à l'agressivité sur *A. thaliana*

Directeur de thèse : Laurent NOËL

Lieu et date de soutenance : Jeudi 14 Février 2013, salle de conférence Marc Ridet, campus INRA-Auzeville

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) est un pathogène vasculaire bactérien responsable de la nervation noire des Brassicacées. Afin de coloniser ses plantes hôtes, *Xcc* utilise un système de sécrétion de type 3 permettant d'injecter des protéines de virulence bactériennes appelées effecteurs de type 3 (ET3) directement à l'intérieur des cellules hôtes. Les ET3 manipulent alors le métabolisme de la cellule hôte et suppriment les défenses végétales pour favoriser la multiplication de la bactérie. Dans le but d'identifier des ET3 associés à un changement d'agressivité sur deux écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Kashmire et Columbia-0), une étude de génétique d'association (GWA) a été mise au point en utilisant les ET3 variables de *Xcc*. L'étude de GWA et la mutagénèse des ET3 de la souche 8004 ont permis d'identifier 9 ET3 associés à un changement différentiel d'agressivité de *Xcc* entre les deux écotypes d'*A. thaliana*. Parmi eux, *xopAC* a été identifié comme un gène majeur d'avirulence sur l'écotype Col-0 tandis que *xopAM* est un gène mineur d'avirulence sur cette même plante. L'analyse fonctionnelle de *xopAC* montre que les deux domaines de la protéine (LRR et Fic) sont nécessaires à sa fonction d'avirulence sur l'écotype Col-0 ainsi qu'à l'induction de nécrose chez des plantes non hôtes. Le domaine LRR est également requis pour la localisation membranaire de XopAC *in planta*. Enfin, la recherche des protéines végétales cibles de XopAC a permis d'identifier deux Receptor-Like Cytoplasmic Kinases, RIPK et PBL2, requis pour la reconnaissance de la souche 8004 de *Xcc* chez Col-0. Ce travail pose les bases génétiques de la dissection de l'immunité des Brassicacées à *Xcc*.

Mots clés : *Xanthomonas*, *Xcc*, GWA, *xopAC*, *xopAM*, Fic, LRR, RLCK, *RIPK* et *PBL2*

Discipline : Interaction Plantes-Microorganismes

Laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), 24 chemin de Borde Rouge – Auzeville, CS 52627, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

