



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 :

David Lohou

Le jeudi 27 février 2014

Titre :

Contribution à la caractérisation fonctionnelle de protéines de contrôle de la sécrétion d'effecteurs de type III chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : chaperonnes et protéine à domaine T3S4

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche :

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Stéphane Genin

Dr. Fabienne Vaillau

Rapporteurs :

Dr. Marie-Anne Barny

Pr. Abdelmounaïm Allaoui

Autre(s) membre(s) du jury :

Dr. Boris Szurek, Examineur

Pr. Matthieu Arlat, Président

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le modèle en zigzag illustre l'amplitude des défenses végétales lors des interactions plante-bactérie pathogène.....	6
Figure 2. Les couples PRR/PAMP bactérien et PRR/DAMP identifiés.....	7
Figure 3. Schéma simplifié de l'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI).....	8
Figure 4. Schéma simplifié de la signalisation de la résistance systémique acquise (SAR).....	12
Figure 5. Illustration schématique de la diversité des composants de la PTI ciblés par les effecteurs de type III (ET3s).....	13
Figure 6. Code de liaison à l'ADN des effecteurs de type III TALs.....	17
Figure 7. Les différentes familles de protéines NLRs chez les plantes.....	19
Figure 8. Les différents modèles de reconnaissance R/Avr.....	21
Figure 9. Comparaison des immunités déclenchées par les PAMPs (PTI) et par les effecteurs (ETI).....	24
Figure 10. Modèle de l'évolution entre l'effecteur de type III (ET3) AvrPtoB et ses partenaires d'interaction <i>in planta</i>	25
Figure 11. Symptômes du flétrissement bactérien causé par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur plusieurs plantes hôtes.....	27
Figure 12. Cycle infectieux de <i>Ralstonia solanacearum</i>	28
Figure 13. Phylogénie du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
Figure 14. Schéma simplifié des principaux déterminants du pouvoir pathogène de <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
Figure 15. Schéma simplifié de la régulation des fonctions de virulence chez <i>Ralstonia solanacearum</i>	33
Figure 16. Schéma global de la structure du système de sécrétion de type III.....	38
Figure 17. Modèle de l'évolution du système de sécrétion de type III à partir d'un système flagellaire ancestral.....	40
Figure 18. Représentation schématique de l'organisation génomique des clusters de gènes codant pour les système de sécrétion de type III des groupes Hrp1 et Hrp2 des bactéries phytopathogènes.....	41

Figure 19. Représentation schématique des différents composants du système de sécrétion de type III.....	42
Figure 20. Modèle de l'implication des chaperonnes de type III (CT3s) dans l'adressage des effecteurs de type III (ET3s) au système de sécrétion de type III....	48
Figure 21. Structures de chaperonnes de type III (CT3s) appartenant aux classes IA, IB et II.....	48
Figure 22. Modèles proposés pour le mode d'action des protéines à domaine T3S4 (type III secretion substrate specificity switch) dans la transition de spécificité de substrat chez les bactéries pathogènes d'animaux.....	59
Figure 23. Les CT3s putatives de la souche GMI1000 de <i>R. solanacearum</i>	66
Figure 24. Les CT3s putatives HpaD et HpaB interagissent avec plusieurs ET3s....	68
Figure 25. Schéma récapitulatif des interactions identifiées entre les ET3s et les CT3s putatives HpaD et HpaB.....	69
Figure 26. Les CT3s putatives sont capables de s'associer en homo et/ou hétéro-oligomères.....	69
Figure 27. Importance des CT3s putatives dans l'élicitation des symptômes de la HR par <i>R. solanacearum</i>	69
Figure 28. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> sur Aubergine.....	70
Figure 29. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> sur <i>Medicago truncatula</i>	71
Figure 30. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> sur Tomate.....	71
Figure 31. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> sur <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
Figure 32. HpaP ne module pas la sécrétion de l'ET3 PopA mais inhibe son accumulation dans la bactérie.....	97
Figure 33. Croissance <i>in planta</i> de différents mutants du gène <i>hpaP</i>	98
Figure 34. Pouvoir pathogène du mutant <i>hpaP</i> sur l'écotype St40 du Pétunia, résistant à <i>R. solanacearum</i> GMI1000.....	99
Figure 35. Pouvoir pathogène du double mutant <i>hpaP/popP1</i> sur l'écotype St40 du Pétunia, résistant à <i>R. solanacearum</i> GMI1000.....	99

Figure 36. Implication de HpaP dans le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> sur Aubergine.....	99
Figure 37. HpaP interagit spécifiquement avec HpaD.....	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Tableau des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> séquencées et leurs caractéristiques.....	30
Tableau 2. Liste des protéines constituant le système de sécrétion de type III de bactéries pathogènes de plantes et d'animaux.....	43
Tableau 3. Liste des chaperonnes de type III identifiées chez des bactéries pathogènes d'animaux et de leurs partenaires d'interaction.....	48
Tableau 4. Liste des protéines de fusion générées pour les tests d'interaction en double-hybride chez la levure.....	67
Tableau 5. Liste des plasmides et souches utilisés dans cette étude.....	103

LISTE DES ABBREVIATIONS

3-OH PAME : acide 3-hydroxy palmitique

AD : activation domain

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

Avr : avirulence

BAK1 : brassinosteroid-insensitive 1 associated receptor kinase 1

BD : binding domain

BIK1 : *Botrytis*-induced kinase 1

CC : coiled-coil

CT3 : chaperonne de type III

DAMPs : damage-associated molecular pattern

EF-Tu : elongation factor thermo unstable

EFR : EF-Tu receptor

EPS : exopolysaccharides

ET : ethylene

ET3 : effecteur de type III

ETI : effector-triggered susceptibility

ETS : effector-triggered immunity

Flg ; flagelline

FLS2 : flagellin-sensing 2

Hpa : hrp-associated

HR : hypersensitive response

Hrp : hypersensitive response and pathogenicity

JA : jasmonic acid

LRR : leucine-rich repeat

MAMP : microbe-associated molecular pattern

MAPK : mitogen-associated protein kinase

MIMP : microbe-induced molecular pattern

NB : nucleotide binding

NLR : NB-LRR receptor

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PR : pathogenesis-related

PRR : pattern recognition receptor

PTI : PAMP-triggered immunity

R : résistance

RLCK : récepteur cytoplasmique à domamine kinase

RLK : receptor-like kinase

RLP : receptor-like protein

RNS : reactive nitrogen species

ROS : reactive oxygen species

SA : salicylic acid

SAR : systemic acquired resistance

SST2 : système de secretion de type II

SST3 : système de secretion de type III

T3S4 : type III secretion substrate specificity switch

TAL : transcription activator-like

TIR : toll-interleukin 1 receptor)

Yop : *Yersinia* outer protein

Ysc : *Yersinia* secretion

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	4
CHAPITRE I. LE DIALOGUE MOLECULAIRE DES INTERACTIONS PLANTES- MICROORGANISMES : ENTREE EN MATIERE.....	5
I. Coupables de haute trahison : l'immunité déclenchée par les PAMPs (ou PTI).....	6
I.1. Les PAMPs sont reconnus par les récepteurs PRRs de l'hôte	6
I.1.1. Le couple Flg/FLS2.....	7
I.1.2. Le couple EF-Tu/EFR.....	8
I.2. Les DAMPs.....	8
I.3. Voies de signalisation et réponses des plantes.....	9
I.3.1. Evénements de signalisation précoces	9
I.3.2. Evénements de signalisation plus tardifs.....	11
I.3.3. Réponses de la PTI	11
I.3.4. Propagation de la résistance : la résistance systémique acquise (ou SAR).....	12
II. Derrière les lignes ennemies : la sensibilité déclenchée par les effecteurs de type III (ou ETS)	13
II.1. Des ET3s suppriment la PTI	14
II.1.1. Des protéines associées à la membrane plasmique pour cible	14
II.1.2. Des composants des chloroplastes pour cible	15
II.1.3. Le trafic vésiculaire pour cible	15
II.1.4. Les cascades de MAPKs pour cible.....	16
II.1.5. Des composants du noyau pour cible	16
II.2. Des ET3s stimulent la libération de nutriments par la plante	17
III. Effet boomerang : l'immunité déclenchée par les effecteurs de type III (ou ETI).....	18
III.1. Les récepteurs NLRs	18
III.1.1. Généralités.....	18
III.1.2. Activation des NLRs.....	19
III.2. Modèles d'interactions R/Avr	20
III.2.1. Le modèle récepteur-ligand.....	21
III.2.2. Le modèle de garde	21
III.2.3. Le modèle du leurre.....	22
III.3. Signalisation et réponses de l'ETI.....	23
IV. Course sans fin à l'armement : ET3s <i>versus</i> NLRs.....	25
CHAPITRE II. LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	27
I. Spectre d'hôtes et cycle infectieux.....	27
I.1. Un spectre d'hôtes particulièrement large	27
I.2. Un cycle infectieux révélateur d'adaptation environnementale	28
II. Une classification en complexe d'espèces, reflet de la diversité	29
III. Un génome bipartite d'une grande plasticité.....	30
IV. Déterminants du pouvoir pathogène	31
V. Régulation des fonctions de virulence	33
VI. Les ET3s, d'importants déterminants du pouvoir pathogène	35
VI.1. <i>R. solanacearum</i> : un large répertoire d'ET3s.....	35
VI.2. ET3s caractérisés chez la souche GMI1000.....	36

CHAPITRE III. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III : STRUCTURE COMPLEXE ET REGULATION FINE	38
I. Le SST3 : fonction, origine et nomenclature.....	38
I.1. Généralités.....	38
I.2. Origine et évolution des SST3s.....	40
I.3. Nomenclature des SST3s.....	40
II. Architecture du SST3	41
II.1. Le corps basal du SST3	42
II.1.1. Les composants cytoplasmiques.....	42
II.1.2. L'appareil d'export de la membrane interne	43
II.1.3. Les anneaux de la membrane interne	43
II.1.4. Les anneaux de la membrane externe.....	44
II.1.5. La tige interne	45
II.2. La partie extracellulaire du SST3	45
II.2.1. L'aiguille ou pilus.....	45
II.2.2. Le translocon et les harpines	46
III. Adressage des ET3s au SST3 et contrôle de la sécrétion	47
III.1. Le signal de sécrétion	47
III.2. Les acteurs du contrôle de la sécrétion.....	48
III.2.1. Généralités.....	48
III.2.2. Focus sur les bactéries phytopathogènes.....	49
III.2.3. Focus sur les bactéries pathogènes d'animaux.....	58
III.2.3.1. Hiérarchie parmi les ET3s : encore les chaperonnes	58
III.2.3.2. Les protéines de type T3S4.....	59
III.2.3.3. Les protéines de la famille YopN	60
PROJET DE THESE	62
RESULTATS.....	65
CHAPITRE I. CARACTERISATION DE CHAPERONNES DE TYPE III PUTATIVES CHEZ	
R. SOLANACEARUM	66
I. Les chaperonnes de type III putatives chez la souche GMI1000	66
II. HpaB et HpaD interagissent spécifiquement avec certains ET3s	67
III. Les CT3s putatives s'associent de manières homo et/ou hétéromérique	68
IV. HpaB, contrairement à HpaD et FlIT-like, est requis pour la translocation <i>in planta</i> des ET3s PopP1 et AvrA.....	69
V. Les CT3s putatives exhibent différents niveaux d'importance pour le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>	70
CHAPITRE II. CARACTERISATION DE HPAP, PROTEINE DE TYPE T3S4 PUTATIVE CHEZ	
R. SOLANACEARUM	72
I. HpaP module la sécrétion d'effecteurs de type III et renferme un domaine T3S4 (Type III Secretion Substrate Specificity Switch) essentiel au pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>	73
II. HpaP module l'accumulation dans la bactérie de la harpine PopA.....	97
III. La mutation de <i>hpaP</i> n'affecte pas la croissance bactérienne <i>in planta</i>	97
IV. La diminution de sécrétion/translocation de PopP1 chez le mutant <i>hpaP</i> n'impacte pas l'aviorulence de <i>R. solanacearum</i> GMI1000 sur l'écotype résistant St40 du Pétunia.....	98
V. HpaP revêt une importance hôte-dépendante pour le pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>	99
VI. HpaP interagit physiquement avec la CT3 putative HpaD.....	100

MATERIELS ET METHODES	102
I. Matériel	103
I.1. Souches bactériennes et conditions de croissance.....	103
I.2. Matériel végétal et conditions de culture.....	103
II. Méthodes	104
II.1. Test de sécrétion de protéines <i>in vitro</i>	104
II.2. Test de pouvoir pathogène et analyses statistiques	105
II.3. Quantification des bactéries <i>in planta</i>	105
II.4. Tests d'élicitation de la HR sur Tabac.....	106
II.5. GST pull-down	106
II.6. Western-Blot.....	107
II.7. Double-hybride chez la levure	107
II.8. Bioinformatique	108
DISCUSSION	109
I. Caractérisation des CT3s putatives HpaB, HpaD et FliT-like.....	110
I.1. HpaB, une CT3 de première importance.....	110
I.2. HpaD et FliT-like, de potentielles CT3s spécifiques à <i>R. solanacearum</i>	113
II. Caractérisation de la protéine de type T3S4 HpaP.....	115
II.1. Rôle de HpaP dans le contrôle de la sécrétion de type III.....	115
II.2. HpaP est un facteur de spécificité d'hôte	117
II.3. HpaP est un élément important dans les étapes tardives de l'infection	118
CONCLUSION.....	120
BIBLIOGRAPHIE.....	125

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LE DIALOGUE MOLECULAIRE DES INTERACTIONS PLANTES- MICROORGANISMES : ENTREE EN MATIERE

L'interaction entre un agent pathogène et une plante peut aboutir à différentes issues. Cette issue est dite compatible si l'agent pathogène parvient à coloniser son hôte, et incompatible dans le cas contraire. La résistance de la plante est de loin l'issue la plus fréquente et est classiquement divisée en deux types. On parle de résistance non hôte lorsque tous les variants génétiques d'une même espèce pathogène sont incapables de coloniser une espèce végétale, quelle que soit la variété considérée. A l'inverse, si la résistance est effective seulement lors de l'interaction entre certains variants génétiques de l'agent pathogène et certains génotypes de l'espèce végétale, on parle de résistance hôte spécifique (Mysore & Ryu, 2004).

La résistance non hôte représente la forme de résistance la plus répandue. Elle repose en partie sur des défenses constitutives, telles que les barrières physiques que représentent la cuticule et la paroi cellulaire, ou la présence de métabolites secondaires antimicrobiens (Nürnberger *et al.*, 2005). Des défenses induites sont également mises en place après perception de l'agent pathogène. Il semble d'une part que la plante puisse détecter la présence de l'agent pathogène *via* des protéines agissant comme des senseurs de l'intégrité de la paroi et de la membrane plasmique végétales (Uma *et al.*, 2011). D'autre part, il apparaît que la résistance non hôte fait intervenir des mécanismes de perception (extra et intracellulaires) et de signalisation qui sont aussi impliqués dans la mise en place de la résistance hôte spécifique (Fan & Doerner, 2012), résultant en l'activation de défenses similaires entre les deux types de résistance. Ces derniers aspects sont donc décrits dans les sections qui suivent.

Les mécanismes de perception intra et extracellulaires de microorganismes pathogènes développés par les plantes sont le fruit de la coévolution entre les deux

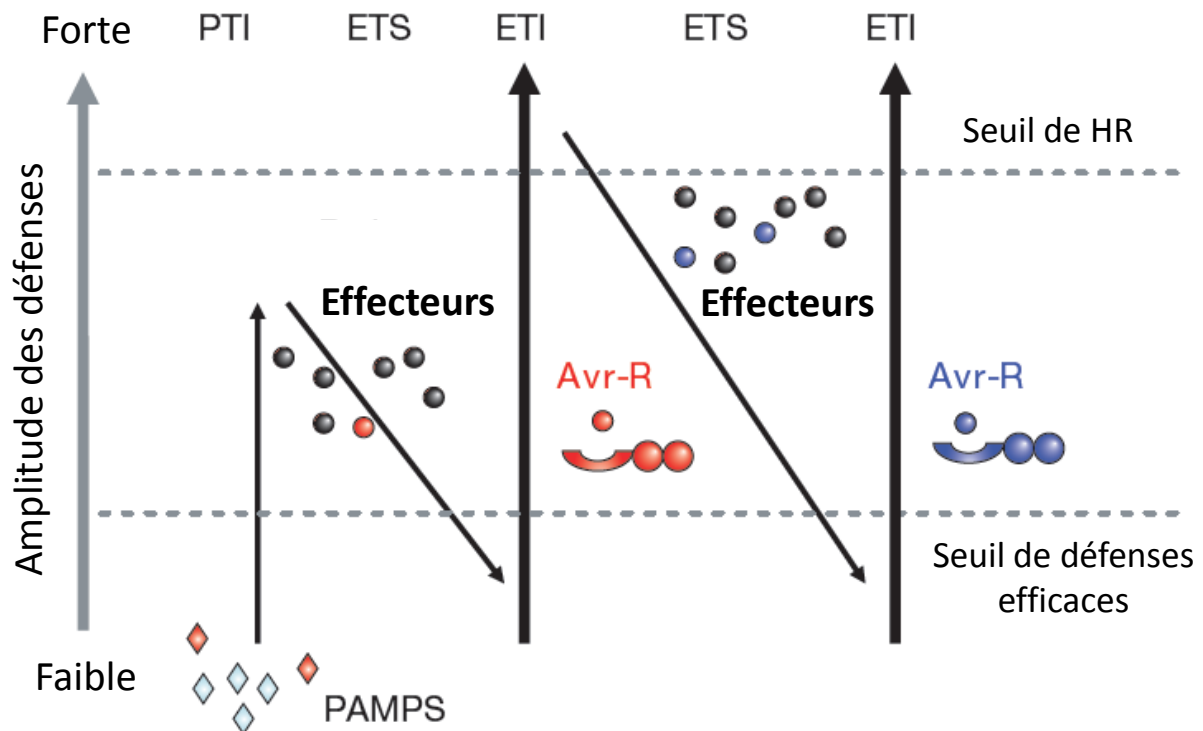


Figure 1. Le modèle en zigzag illustre l'amplitude des défenses végétales lors des interactions plante-bactérie pathogène. De gauche à droite : les plantes détectent la présence de certains PAMPs bactériens (losanges rouges) grâce à leurs récepteurs PRRs et mettent en place l'immunité déclenchées par les PAMPs (PTI). Des bactéries virulentes injectent des effecteurs de type III (ronds noirs) qui interfèrent avec la PTI, aboutissant à la sensibilité déclenchée par les effecteurs (ETI). Certains effecteurs (rond rouge) sont reconnus par les récepteurs intracellulaires NLRs (R rouge) et induisent la mise en place de l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI), une forme de résistance amplifiée qui franchit généralement le seuil de déclenchement de la réaction hypersensible (HR). Certaines bactéries sont sélectionnées, ayant perdu l'effecteur reconnu par la plante et/ou acquis des effecteurs (ronds bleus) qui suppriment l'ETI, et induisent à nouveau l'ETS. La sélection favorise de nouveaux allèles de NLRs des plantes (R bleu), qui peuvent reconnaître les nouveaux effecteurs acquis par la bactérie, aboutissant une nouvelle fois à l'ETI (d'après Jones & Dangl, 2006).

PAMPs : pathogen-associated molecular patterns ; PTI : PAMP-triggered immunity ; ETS : effector-triggered susceptibility ; ETI : effector-triggered immunity ; Avr : protéine d'avirulence ; R : protéine de résistance.

protagonistes. Mais cette coévolution implique en retour l'acquisition par les agents pathogènes de mécanismes d'échappement de la mise en place des défenses végétales. Il en résulte un véritable dialogue moléculaire entre l'agent pathogène et son hôte, qui conditionne l'issue de l'interaction. Ce dialogue peut être illustré par le modèle en zig-zag proposé en 2006 par Jones & Dangl et toujours d'actualité (Figure 1).

Les résultats présentés dans ce manuscrit s'inscrivant dans le cadre de l'étude d'une interaction plante-bactérie, le choix à été fait d'illustrer le modèle en zig-zag par des données centrées sur ce type d'interaction. La majorité des concepts reste cependant applicable aux interactions avec des microorganismes pathogènes d'autre nature.

I. Coupables de haute trahison : l'immunité déclenchée par les PAMPs (ou PTI)

Les plantes ont développé l'aptitude à percevoir la présence des agents pathogènes. Les premiers mécanismes d'alerte mettent en jeu des récepteurs membranaires appelés PRRs (pattern recognition receptors) capables de reconnaître des molécules microbiennes désignées sous le nom de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Il s'en suit une signalisation qui aboutit à l'activation de mécanismes de défense, pouvant donner lieu à une forme de résistance appelée immunité déclenchée par les PAMPs (PTI pour PAMP-triggered immunity). L'ensemble de ces étapes sont décrites dans les sections qui suivent.

I.1. Les PAMPs sont reconnus par les récepteurs PRRs de l'hôte

La présence des agents pathogènes est en premier lieu trahie par des molécules très conservées appelées PAMPs, qui sont indispensables à leur cycle de vie et présentent une vitesse d'évolution relativement lente (Jones & Dangl, 2006). Ces signatures moléculaires étant conservées aussi chez les microorganismes non pathogènes, certains leur préfèrent l'appellation de MAMPs (microbial-associated molecular patterns) (Mackey & McFall, 2006). La flagelline (Flg) du flagelle, le facteur

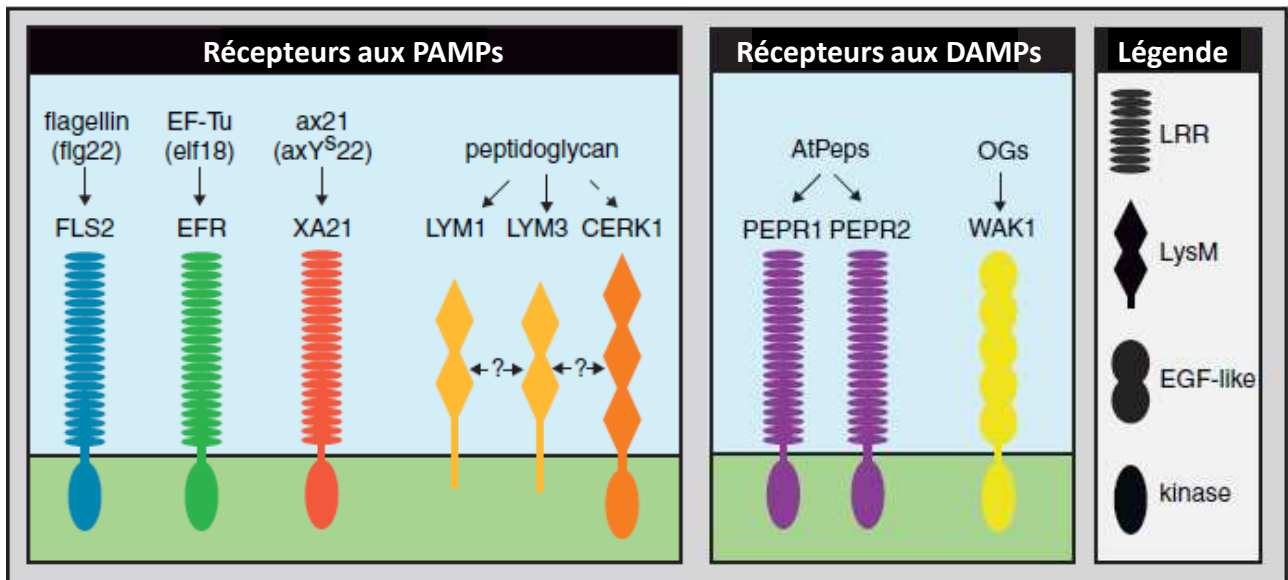


Figure 2. Les couples PRR/PAMP bactérien et PRR/DAMP identifiés. Panneau de gauche : les PRRs (pattern recognition receptors) dont les ligands sont des PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) connus. Le récepteur FLS2 reconnaît l'épitope flg22 de la flagelline bactérienne chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, la tomate et le riz. Le récepteur EFR, spécifique des *Brassicaceae*, reconnaît l'épitope elf18 du facteur d'élongation bactérien Tu. Le récepteur XA21 du riz reconnaît le peptide sécrété Ax21 (ou le peptide synthétique axY^{S22}). Les récepteurs LYM1 et LYM2 reconnaissent le peptidoglycane bactérien. Celui-ci interagit aussi faiblement avec le récepteur CERK1. Il est possible que ces trois récepteurs fonctionnent sous forme d'un complexe tripartite chez *A. thaliana* mais des interactions entre LYM1, LYM3 et CERK1 n'ont à ce jour pas été identifiées. Panneau de droite : les PRRs dont les ligands sont des DAMPs (damage-associated molecular patterns) connus. Les récepteurs PEPR1 et PEPR2 reconnaissent le peptide endogène AtPeps. Le récepteur WAK1 reconnaît les oligogalacturonides (OGs) issus de la paroi végétale (d'après Monaghan & Zipfel, 2012).

d'élongation EF-Tu (elongation factor thermo unstable), les peptidoglycanes des membranes ou encore les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries à caractère Gram négatif comptent parmi les exemples de PAMPs connus (Newman *et al.*, 2013) (Figure 2).

Les plantes ont développé la capacité à percevoir ces PAMPs de manière extracellulaire grâce à des récepteurs appelés PRRs. Tous les PRRs connus sont localisés à la membrane plasmique et appartiennent soit à la famille des protéines RLKs (receptor-like kinases), qui contiennent un domaine extracellulaire de type LRR (leucine-rich repeat) riche en leucine, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire, soit à la famille des protéines RLPs (receptor-like proteins), qui diffèrent des RLKs en ce qu'elles ne possèdent qu'un petit domaine cytosolique sans domaine de signalisation manifeste (Newman *et al.*, 2013). Les deux couples PAMP/PRR les plus étudiés, Flg/FLS2 (flagellin-sensing 2) et EF-Tu/EFR (EF-Tu receptor), sont abordés ci-dessous.

La reconnaissance des PAMPs par les PRRs constitue la première ligne de défense active de la plante. Celle-ci aboutit à la mise en place de la résistance dite basale, autrement appelée PTI. Cette réponse de défense est plus ou moins forte et peut s'avérer efficace pour contrecarrer l'attaque d'un microorganisme pathogène insuffisamment adapté à l'hôte.

I.1.1. Le couple Flg/FLS2

La protéine FLS2 est un membre de la famille des protéines RLKs, renfermant 28 domaines de type LRR et un domaine sérine/thréonine kinase. Le PAMP reconnu par FLS2 est la flagelline, constituant majeur du flagelle, qui est une structure essentielle assurant la motilité des bactéries. Le flagelle permet souvent une meilleure adhésion à l'hôte (Newman *et al.*, 2013) et est une structure importante pour le pouvoir pathogène (Zipfel & Felix, 2005). Des études sur plusieurs plantes, dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, montrent que les plantes reconnaissent un domaine N-terminal de la flagelline très conservé : un peptide de 22 acides aminés nommé flg22 (Felix *et al.*, 1999). En réalité, il existe une variabilité au niveau de l'épitope reconnu par les plantes, de manière intra et inter-spécifique. On retrouve également une certaine variabilité de réponse d'une plante aux flagellines de

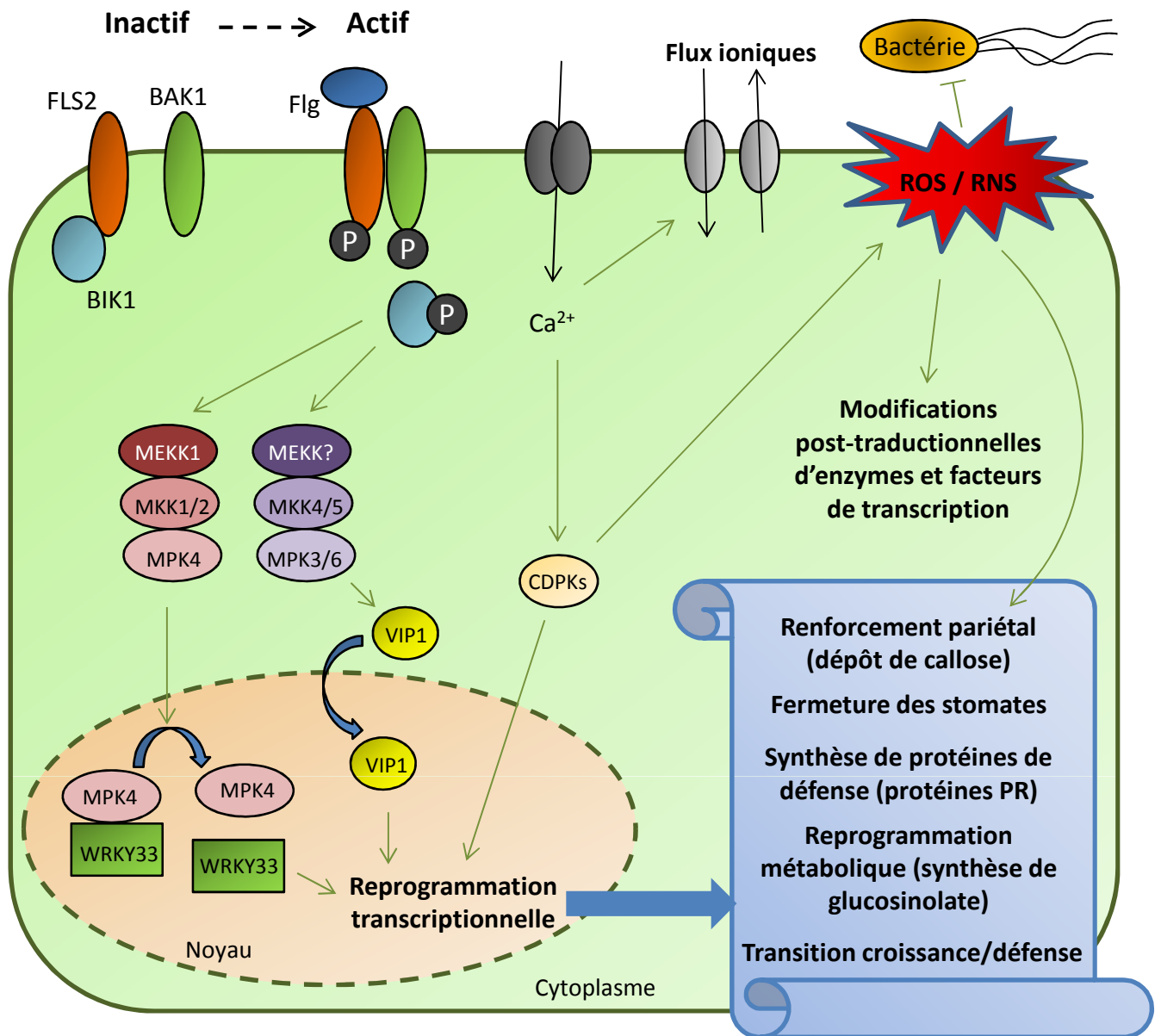


Figure 3. Schéma simplifié de l'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI). Dans l'exemple présenté, la flagelline bactérienne (Flg) est reconnue par le récepteur FLS2, induisant son interaction avec le co-récepteur BAK1 et la phosphorylation du complexe formé. Le co-récepteur BIK1 est libéré et active les composants de la voie de signalisation en aval, dont les MAP kinases. Deux cascades de signalisation distinctes aboutissent à l'activation de facteurs de transcription, responsables d'une reprogrammation transcriptionnelle massive. L'augmentation du niveau cellulaire de l'ion calcium Ca²⁺ participe aussi à cette reprogrammation. D'autres modifications de flux ioniques sont également induites. Les réponses de la PTI comprennent le renforcement de barrières préexistantes, la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) jouant des rôles de messagers et d'agents antimicrobiens, la synthèse de protéines de défense dont les protéines PR (Pathogenesis-related) et une reprogrammation métabolique liée à une transition entre croissance et défense. Les lignes vertes terminées par une flèche ou par une barre symbolisent respectivement des activations ou des effets inhibiteurs.

différentes souches d'un même agent pathogène (Sun *et al.*, 2006). Après traitement par la flagelline, FLS2 interagit avec BAK1 (brassinosteroid-insensitive 1 associated receptor kinase 1), un autre récepteur membranaire à domaine kinase, de manière ligand-dépendante (Chinchilla *et al.*, 2007). L'interaction induit la phosphorylation et l'activation du complexe formé (Schulze *et al.*, 2010). L'activation permet à BIK1 (*Botrytis*-induced kinase 1), un récepteur cytoplasmique à domaine kinase (RLCK) constitutivement lié à FLS2, d'être libéré. Cette dissociation permettrait à BIK1 de phosphoryler des composants de la voie de signalisation en aval, aboutissant *in fine* aux réponses de défense de la PTI (Lu *et al.*, 2010) (Figure 3).

I.1.2. Le couple EF-Tu/EFR

La protéine EF-Tu est un des facteurs d'élongation bactériens associés aux ribosomes lors de la traduction de l'ARNm en séquences peptidiques. C'est la protéine la plus abondante dans le cytoplasme bactérien (Jeppesen *et al.*, 2005). Ce qui, couplé avec son caractère essentiel pour la bactérie, explique probablement pourquoi les plantes ont acquis la capacité à détecter cette protéine. Un peptide de 18 acides aminés situé dans la région N-terminale de la protéine EF-Tu, nommé elf18, est reconnu par le récepteur EFR qui n'a pour l'instant été identifié que chez des membres de la famille des *Brassicaceae* (Zipfel *et al.*, 2006). EFR est un PRR de la famille des protéines RLKs et possède un domaine extracellulaire composé de 24 domaines LRR et un domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire (Zipfel *et al.*, 2006). BAK1 pourrait également être impliqué dans la formation d'un complexe avec EFR, induisant la phosphorylation de ce récepteur (Schulze *et al.*, 2010). Bien que les PRRs FLS2 et EFR interagissent avec leurs ligands respectifs de manière spécifique, les mêmes protéines kinases sont induites en aval, aboutissant à l'induction du même pool de gènes et à la mise en place des mêmes réponses de défense (Zipfel *et al.*, 2006) (Figure 3).

I.2. Les DAMPs

La présence des agents pathogènes est aussi trahie de manière plus indirecte. Les plantes sont ainsi capables de reconnaître des molécules du « soi modifié », issues de l'action de l'agent pathogène sur la paroi ou la membrane plasmique végétale. Ces éliciteurs sont appelés DAMPs (damage-associated molecular

patterns) (Boller & Felix, 2009) ou MIMPs (microbe-induced molecular patterns) (Mackey & McFall, 2006) et induisent, à l'instar des PAMPs, la PTI.

Un exemple de DAMP identifié chez *A. thaliana* est le peptide Pep1, reconnu par le récepteur PEPR1 de la famille des RLKs (Yamaguchi *et al.*, 2006) (Figure 2). Pep1 est dérivé du domaine C-terminal d'un précurseur cytosolique nommé PROPEP1 (Huffaker *et al.*, 2006). L'expression de PROPEP1 est notamment activée par les blessures et certains MAMPs (Krol *et al.*, 2010).

I.3. Voies de signalisation et réponses des plantes

L'application de PAMPs purifiés sur des cellules végétales en culture a permis d'étudier avec une assez bonne précision la cinétique des événements de signalisation des plantes en réponse aux PAMPs (Boller & Felix, 2009). On peut distinguer les événements de signalisation très précoces, observés dans les quelques minutes après traitement, de ceux qui surviennent jusqu'à 30 minutes plus tard. Bien que certaines réponses de défense à proprement parler aient lieu également précocement, la majorité d'entre elles sont observées plus tardivement, plusieurs heures voire plusieurs jours après traitement avec des PAMPs.

I.3.1. Événements de signalisation précoces

De nombreuses protéines sont spécifiquement phosphorylées après stimulation par les PAMPs (Peck *et al.*, 2001). Cette modification du statut de phosphorylation est probablement le premier événement après activation des PRRs (Schwessinger & Ronald, 2012). L'inhibition de la phosphorylation par des inhibiteurs de protéines kinases entraîne en effet un blocage des autres événements précoces.

D'autre part, une rapide alcalinisation du milieu extérieur, accompagnée d'une dépolarisation de la membrane plasmique, sont détectables (Mithöfer *et al.*, 2005) (Figure 3). Ces phénomènes sont dus à des modifications de flux ioniques à travers la membrane plasmique : influx d'ions H^+ et Ca^{2+} et efflux d'ions K^+ et de divers anions dont l'ion nitrate (NO_3^-) (Wendehenne *et al.*, 2002). L'ion Ca^{2+} est connu pour son rôle de second messager : l'augmentation de son niveau dans le cytoplasme entraîne l'activation de canaux membranaires impliqués dans le transport d'autres ions (Lecourieux *et al.*, 2002 ; Jeworutzki *et al.*, 2010), ainsi que de protéines kinases

calcium-dépendantes (CDPKs) qui participent à la mise en place de la PTI (Boudsocq *et al.*, 2010).

Parmi les événements de signalisation très précoces figure également l'activation de cascades de signalisation de MAP kinases (Mitogen-associated protein kinases) (Figure 3). Ces cascades de signalisation aboutissent à l'activation de nombreux facteurs de transcription, dont les fonctions dans la défense sont généralement inconnues (Popescu *et al.*, 2009). Vingt MAP kinases ont été identifiées chez *A. thaliana* et trois d'entre elles sont activées rapidement en réponse aux PAMPs (Pitzschke *et al.*, 2009). Ces dernières sont impliquées dans deux cascades de signalisation distinctes.

La première régule négativement les défenses et met en jeu, d'amont en aval, la MAP kinase kinase kinase MEKK1, les MAP kinase kinases MKK1 et MKK2 et la MAP kinase MPK4. MPK4 fait constitutivement partie d'un complexe comprenant le facteur de transcription WRKY33. Son activation entraîne la libération de ce dernier, capable ensuite d'activer l'expression du gène PAD3 (phytoalexin deficient 3) dont le produit est impliqué dans la synthèse de camalexine, un composé antimicrobien de la famille des phytoalexines (Qiu *et al.*, 2008) (Figure 3).

La seconde cascade de MAP kinases régule positivement les défenses et implique MKK4, MKK5, MPK3 et MPK6 (Pitzschke *et al.*, 2009). MPK3 phosphoryle VIP1 (vire2-interacting protein 1), un facteur de transcription de type bZIP, permettant son import nucléaire (Figure 3). VIP1 activerait des gènes de défense, comme le suggère la transactivation dans des protoplastes d'*A. thaliana* du promoteur du gène codant pour la protéine antimicrobienne PR1 (pathogenesis-related 1) (Djamei *et al.*, 2007).

Enfin, des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species), telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'anion superoxyde (O²⁻), et des espèces réactives de l'azote (RNS pour reactive nitrogen species) sont générées de manière très précoce, aboutissant à ce qu'on appelle communément le burst oxydatif (Figure 3). L'accumulation de ROS et RNS induit une modification du statut redox de la cellule, responsable de modifications post-traductionnelles impliquant les cystéines de certaines protéines. Ces modifications permettent de contrôler l'activité et la

relocalisation d'enzymes et de facteurs de transcription liés à la défense (Spoel & Loake, 2011 ; Bellin *et al.*, 2013).

I.3.2. Événements de signalisation plus tardifs

Parmi les événements de signalisation plus tardifs, survenant jusqu'à 30 minutes après traitement par les PAMPs, une production accrue d'éthylène est observable. L'augmentation du niveau de cette hormone de stress est imputable à l'augmentation de l'activité d'une enzyme appelée ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) synthase (Spanu *et al.*, 1994). La concentration en ACC, précurseur de l'éthylène, est en effet le facteur limitant de la voie de biosynthèse de cette hormone.

D'autre part, les PRRs subissent une endocytose induite par la fixation de leur ligand respectif (Robatzek *et al.*, 2006 ; Bar & Avni, 2009). Cette internalisation aurait un rôle dans la signalisation ou permettrait simplement un recyclage des récepteurs activés (Geldner & Robatzek, 2008 ; Sharfman *et al.*, 2011).

Des études ont montré que différents MAMPs induisent globalement les mêmes modifications d'expression génique, soit l'induction d'à peu près un millier de gènes et la répression d'environ 200 autres gènes (Ramonell *et al.*, 2002 ; Zipfel *et al.*, 2006 ; Ferrari *et al.*, 2007 ; Libault *et al.*, 2007). Le set de gènes activés est particulièrement riche en protéines RLKs. On trouve aussi des récepteurs aux PAMPs tels que FLS2 et EFR, indiquant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive (Zipfel *et al.*, 2004).

I.3.3. Réponses de la PTI

Des différents événements de signalisation que nous venons d'aborder découlent une reprogrammation transcriptionnelle massive *via* l'activation de facteurs de transcription et le remodelage de la chromatine (Ma *et al.*, 2011), aboutissant aux réponses de défense en elles-mêmes (Figure 3).

Les différentes barrières physiques préexistantes sont renforcées : fermeture des stomates (Melotto *et al.*, 2008) et renforcement pariétal par dépôt de callose (Gomez-Gomez *et al.*, 1999) (Figure 3). Les ROS, outre leur rôle dans la signalisation tel que décrit plus haut, sont également impliqués dans le renforcement

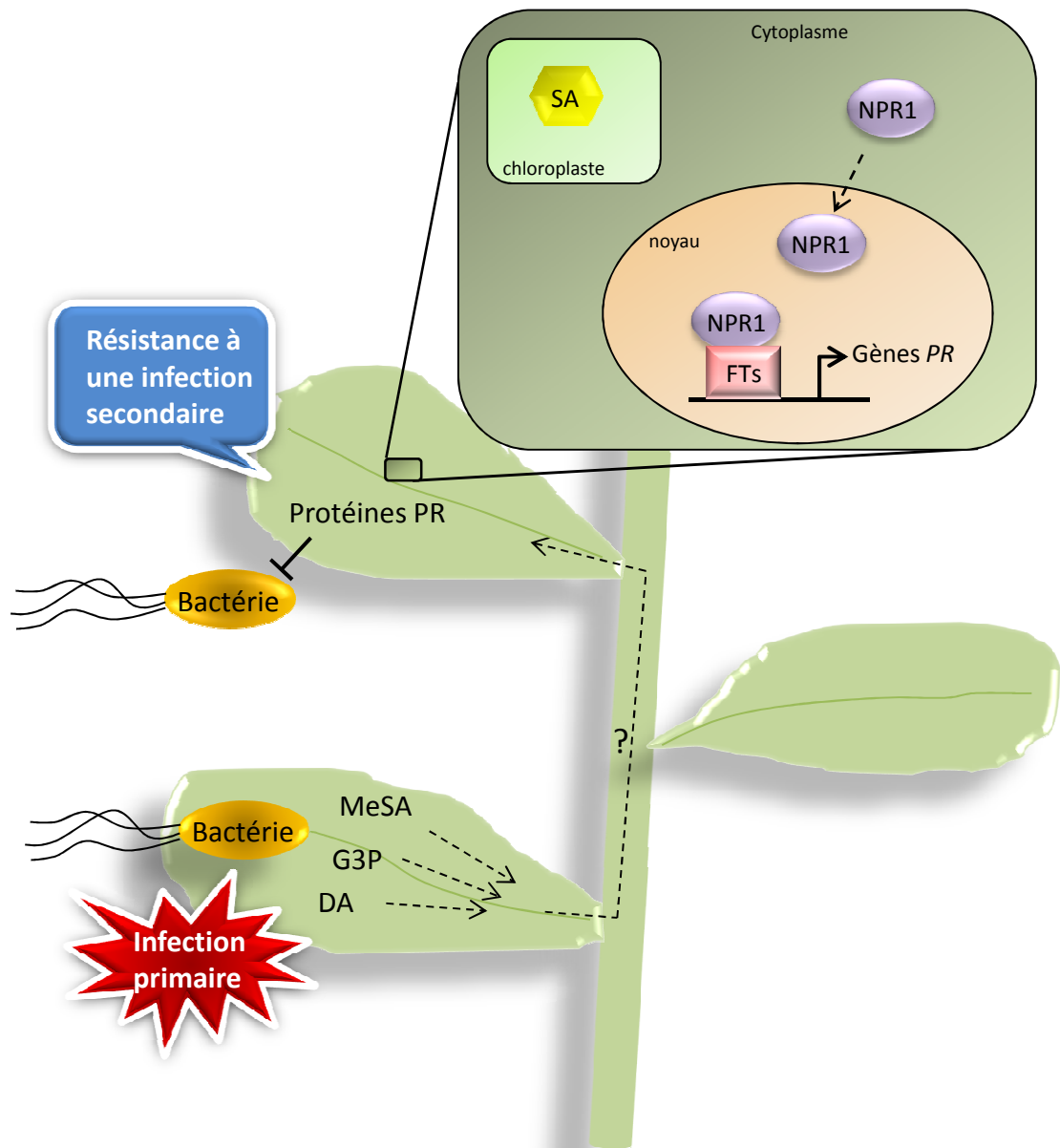


Figure 4. Schéma simplifié de la signalisation de la résistance systémique acquise (SAR). Une infection primaire par un agent pathogène peut entraîner la production au site d'infection d'acide salicylique (SA) dans les chloroplastes et de signaux d'immunité mobiles, parmi lesquels l'acide méthylsalicylique (MeSA), le glycérol-3-phosphate (GEP) et l'abiétane diterpénoïde déhydroabiétinal (DA). Ces molécules sont probablement envoyées du site d'infection vers le reste de la plante, induisant la SAR. La SAR est notamment caractérisée par une accumulation cellulaire de SA qui entraîne un changement du potentiel redox de la cellule, aboutissant à l'import nucléaire du cofacteur transcriptionnel NPR1 (nonexpressor of *PR* gene 1). NPR1 interagit avec des facteurs de transcription (FTs) et active l'expression de gènes *PR* (pathogenesis-related) codant pour des protéines antimicrobiennes (d'après Fu & Dong, 2013).

de la paroi, en induisant la réticulation des polymères pariétaux. Ils interviennent de plus directement comme agents antimicrobiens.

De nombreuses protéines de défense sont synthétisées en réponse aux PAMPs, dont les protéines PR (Figure 3). Leurs modes d'action précis sont de manière générale peu connus. Les protéines PR comprennent plusieurs familles de protéines parmi lesquelles des peptides antimicrobiens et des enzymes, comme des glucanases ou chitinases, dont l'activité est dirigée contre les structures des agents pathogènes (Newman *et al.*, 2013).

Les PAMPs induisent également une reprogrammation métabolique (Sana *et al.*, 2010) (Figure 3). Chez les *Brassicaceae* la synthèse de glucosinolates, un des principaux groupes de métabolites secondaires de défense, est stimulée (Clay *et al.*, 2009). Par ailleurs, une inhibition de croissance de plantules d'*A. thaliana* est observée en réponse aux PAMPs, ce qui pourrait être le résultat d'une reprogrammation métabolique permettant la transition entre croissance et défense. Cette transition pourrait être liée à l'induction d'un microARN identifié comme régulateur négatif des récepteurs à l'auxine, conduisant ainsi à l'inhibition de l'expression des gènes répondant à cette hormone de croissance (Navarro *et al.*, 2006).

I.3.4. Propagation de la résistance : la résistance systémique acquise (ou SAR)

La résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance) correspond à la mise en place, en réponse à un agent pathogène, de réponses de défense à large spectre au niveau des tissus non infectés, afin de se prémunir contre une surinfection par l'agent pathogène. La SAR nécessite la génération d'un signal au niveau de site d'infection et son transport de manière systémique *via* le système vasculaire. La nature de ce signal est toujours une question non résolue, bien qu'un certain nombre de candidats aient été récemment identifiés : MeSA (methyl salicylic acid), G3P (glycerol-3-phosphate), DA (abietane diterpenoid dehydroabietinal) (Park *et al.*, 2007 ; Jung *et al.*, 2009 ; Chanda *et al.*, 2011 ; Chaturvedi *et al.*, 2012) (Figure 4). Les signaux de la SAR induisent une reprogrammation transcriptionnelle systémique, dépendante du cofacteur de transcription NPR1 (nonexpressor of *PR*

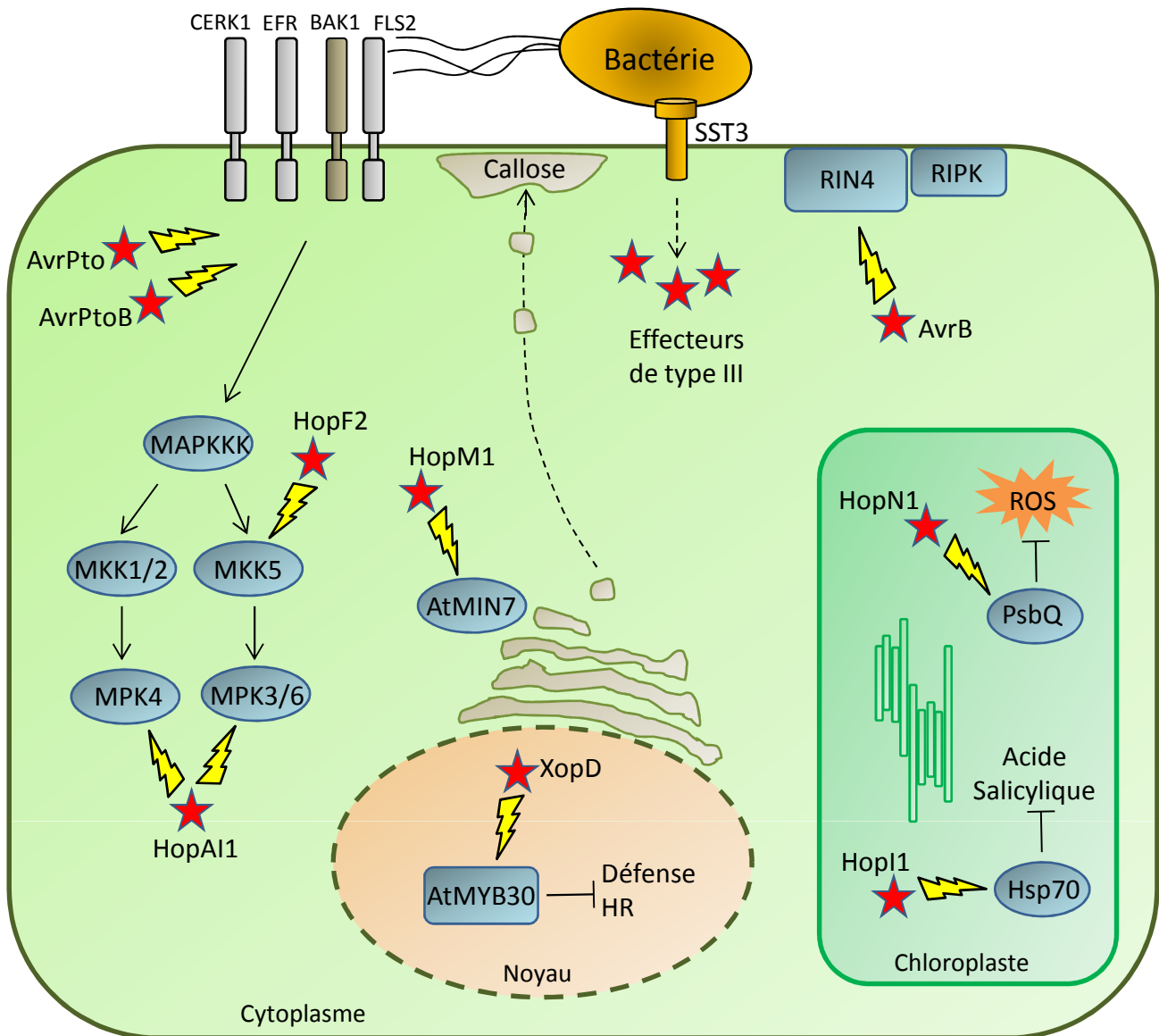


Figure 5. Illustration schématique de la diversité des composants de la PTI ciblés par les effecteurs de type III (ET3s). Les bactéries pathogènes injectent des effecteurs de type III (étoiles rouges) dans la cellule hôte *via* le système de sécrétion de type III (SST3). Une fois transloqués dans la cellule végétale, les ET3s ciblent différents compartiments cellulaires où ils manipulent une large panel de fonctions cellulaires. Parmi ceux-ci, AvrPto et AvrPtoB ciblent les complexes de récepteurs associés à la membrane plasmique ; AvrB cible RIN4, un régulateur négatif des défenses, au niveau de la membrane plasmique ; HopAI1 et HopF2 ciblent les cascades de signalisation des MAP kinases ; HopI1 et HopN1 sont adressés dans le chloroplaste où ils ciblent respectivement la chaperonne Hsp70, inhibant l'accumulation d'acide salicylique, et la protéine associée au photosystème II PsbQ, inhibant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; HopM1 est localisé dans le réseau trans-Golgien où il inhibe l'accumulation pariétale de callose en ciblant AtMIN7, un composant clé du trafic vésiculaire ; XopD est adressé au noyau où il cible AtMYB30, un régulateur positif des réactions de défense (d'après Deslandes & Rivas, 2012).

gene 1) et de facteurs de transcription associés (Dong, 2004 ; Pieterse & van Loon, 2004). Ce qui aboutit notamment à l'expression de gènes *PR* codant pour des composés antimicrobiens (Durrant & Dong, 2004). La SAR confère une certaine immunité sur le long-terme, pouvant durer jusqu'à plusieurs mois (Kuc, 1987).

Bien qu'il soit classiquement considéré que la SAR est associée à une forme de résistance appelée immunité déclenchée par les effecteurs de type III (voir section III), une étude a montré qu'une résistance systémique est mise en place en réponse à un traitement par la flagelline ou les lipopolysaccharides bactériens, suggérant que les MAMPs puissent aussi induire la SAR (Mishina & Zeier, 2007).

II. Derrière les lignes ennemies : la sensibilité déclenchée par les effecteurs de type III (ou ETS)

Bien qu'il existe un certain polymorphisme au niveau des PAMPs, celui-ci reste limité, probablement en raison de la fonction physiologique primordiale qu'occupent les PAMPs pour les microorganismes pathogènes. La possibilité pour ces derniers d'éviter la reconnaissance des PAMPs par les PRRs en est d'autant restreinte. Les agents pathogènes ont de fait développé une stratégie de suppression de la PTI en interférant directement avec les événements de signalisation dans la cellule végétale. Cette fonction est réalisée chez les bactéries par des protéines appelées effecteurs de type III (ET3s), injectées dans le cytoplasme de la cellule végétale, et qui aboutissent collectivement à la sensibilité déclenchée par les ET3s (ETS pour effector-triggered susceptibility). Les ET3s ciblent une large gamme de composants de la PTI, à des localisations cellulaires très diverses. Récemment, un rôle dans la libération de nutriments par la plante, au bénéfice de la bactérie, a également été suggéré pour certains ET3s. L'injection, ou translocation, dépend d'une seringue moléculaire, le système de sécrétion de type III (SST3), sur lequel nous nous pencherons plus particulièrement dans le chapitre III de l'introduction. Notons tout de même que des toxines, comme la coronatine ou la syringoline chez *Pseudomonas syringae* (Brooks *et al.*, 2005 ; Groll *et al.*, 2008), et les exopolysaccharides (Aslam *et al.*, 2008) participent également à la suppression de la PTI. Une vision globale de la diversité des fonctions cellulaires ciblées par les ET3s est illustrée dans les sections qui suivent et schématisée par la Figure 5. Sauf mention contraire, les cas abordés

sont issus de *P. syringae*, bactérie pour laquelle les connaissances sur les ET3s sont les plus avancées.

II.1. Des ET3s suppriment la PTI

II.1.1. Des protéines associées à la membrane plasmique pour cible

De nombreux ET3s sont connus pour cibler des composants de la PTI localisés à la membrane plasmique. Les ET3s AvrPto et AvrPtoB interagissent notamment avec les domaines kinases de récepteurs PRRs tels que FLS2 et EFR, ainsi qu'avec leur corécepteur BAK1 (Shan *et al.*, 2008 ; Xiang *et al.*, 2008) (Figure 5). L'impact de l'interaction sur la formation des complexes PRR-BAK1 a fait l'objet de résultats contradictoires (Xiang *et al.*, 2011). Quoi qu'il en soit, AvrPto et AvrPtoB inhibent l'activité kinase de leurs cibles et par conséquent la signalisation en aval et la mise en place de la PTI (Xiao *et al.*, 2007). AvrPto bloque ainsi la phosphorylation par FLS2 de BIK1, une protéine de type RLCK (Xiang *et al.*, 2008). Par ailleurs, AvrPtoB possède un domaine C-terminal présentant une homologie structurale avec les protéines de type RING finger et ubiquitine ligase E3, connues pour leurs rôles dans la dégradation de protéines *via* leur ubiquitination. Il est proposé qu'AvrPtoB puisse faciliter, au travers de son activité ubiquitine ligase, la dégradation de FLS2 par le protéasome (Gohre *et al.*, 2008).

RIN4 (RPM1-interacting protein) est un autre exemple de protéine associée à la membrane plasmique, impliquée dans la PTI et ciblée par différents ET3s. Elle est caractérisée comme un régulateur négatif de la PTI (Kim *et al.*, 2005b) dont le rôle apparaît central au vu du nombre important d'ET3s qui la ciblent (Deslandes & Rivas, 2012). Parmi ces derniers, l'ET3 AvrB induit la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé chez les membres de la famille de RIN4, induisant l'inhibition de la PTI (Mackey *et al.*, 2002 ; Chung *et al.*, 2011) (Figure 4). Cette phosphorylation nécessite probablement l'intervention d'un autre interacteur d'AvrB : RIPK, une protéine associée à RIN4 et capable de la phosphoryler *in vitro* (Liu *et al.*, 2011). Cette hypothèse est soutenue par le fait que RIPK est surexprimée en réponse à une

bactérie virulente, ce qui illustre probablement une stratégie de manipulation d'un régulateur négatif de la PTI par l'agent pathogène.

II.1.2. Des composants des chloroplastes pour cible

Une fois injecté dans la cellule végétale, l'ET3 HopI1 est localisé dans les chloroplastes, lieu de synthèse de l'acide salicylique (SA) (Figure 4). Cet ET3 supprime la production de SA et les réponses de défense qui en dépendent, et affecte la structure des thylakoïdes chloroplastiques (Jelenska *et al.*, 2007). HopI1 possède un domaine J d'interaction avec la chaperonne cytoplasmique Hsp70 (Heat shock protein), pour laquelle un rôle positif dans la PTI est suggéré (Jelenska *et al.*, 2010). Cet ET3 est capable de recruter Hsp70 dans les chloroplastes et de stimuler *in vitro* son activité d'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, il est proposé que HopI1, en modulant l'activité de la chaperonne Hsp70, puisse affecter le repliement d'un composant de la PTI lié à la synthèse ou au transport du SA.

HopN1 est un deuxième exemple d'ET3 agissant dans les chloroplastes (Figure 4). Cet ET3 possède une activité de cystéine protéase. Au niveau des thylakoïdes, HopN1 interagit de manière dépendante de sa triade catalytique avec PsbQ, un composant des photosystèmes II (Rodriguez-Herva *et al.*, 2012). PsbQ est notamment un régulateur positif de la production de ROS en réponse aux bactéries pathogènes. HopN1 colocalise avec PsbQ et entraîne sa dégradation, inhibant ainsi les défenses de la plante.

II.1.3. Le trafic vésiculaire pour cible

HopM1 est un ET3 qui s'accumule au niveau du réseau trans-golgien et des endosomes précoces des cellules végétales (Figure 4). Il interagit avec AtMIN7 (*A. thaliana* HopM1 interactor 7) (Nomura *et al.*, 2006 ; Nomura *et al.*, 2011), une protéine appartenant à la famille des GEF (guanine nucleotide exchange factor) dont les membres jouent un rôle clé dans le trafic vésiculaire et sont probablement impliqués dans le dépôt de callose lors de la PTI. HopM1 induit la dégradation d'AtMIN7 par le protéasome 26S, aboutissant à l'inhibition des dépôts de callose.

II.1.4. Les cascades de MAPKs pour cible

L'ET3 HopA11 interagit avec les MAPKs MPK3 et MPK6, toutes deux impliquées dans la même cascade de signalisation qui régule positivement la PTI (Zhang *et al.*, 2007) (Figure 4). HopA11 exhibe une activité phosphothréonine lyase permettant l'inactivation des MAPKs par déphosphorylation non réversible, ce qui aboutit à l'inhibition de l'expression de gènes de défense et du renforcement pariétal.

Parmi les ET3 ciblant la signalisation des MAPKs, HopF2 a été identifié comme interacteur de plusieurs MKKs (Figure 4). Il a notamment été montré que HopF2 est capable d'ADP-ribosyler MKK5 *in vitro* et d'inhiber son activité kinase (Wang *et al.*, 2010), suggérant que l'ET3 HopF2 pourrait inhiber la PTI en interférant avec la cascade de signalisation des MAPKs.

II.1.5. Des composants du noyau pour cible

Un exemple d'ET3 localisé dans le noyau de la cellule hôte est XopD de *Xanthomonas campestris*. Cette protéine possède plusieurs domaines caractérisés : un domaine C-terminal exhibant une activité SUMO protéase (small ubiquitine-like modifier) (Hotson *et al.*, 2003), deux motifs EAR (ERF-associated amphiphilic repression) de répression transcriptionnelle répétés en tandem et conférant la capacité à XopD à réprimer l'expression de gènes de défense (Kim *et al.*, 2008), et enfin un domaine HLH (helix-loop-helix) nécessaire à sa localisation nucléaire (Canonne *et al.*, 2011). XopD interagit spécifiquement, *via* son domaine HLH, avec le facteur de transcription AtMYB30, un régulateur positif des réactions de défense (Raffaele *et al.*, 2008 ; Canonne *et al.*, 2011) (Figure 4). Ce même domaine HLH est par ailleurs nécessaire et suffisant pour supprimer l'activité d'AtMYB30 et par conséquent l'activation des gènes de défense qui en dépendent. Il est probable que XopD cible d'autres protéines et/ou gènes, eu égard à la diversité des activités biochimiques qu'il arbore.

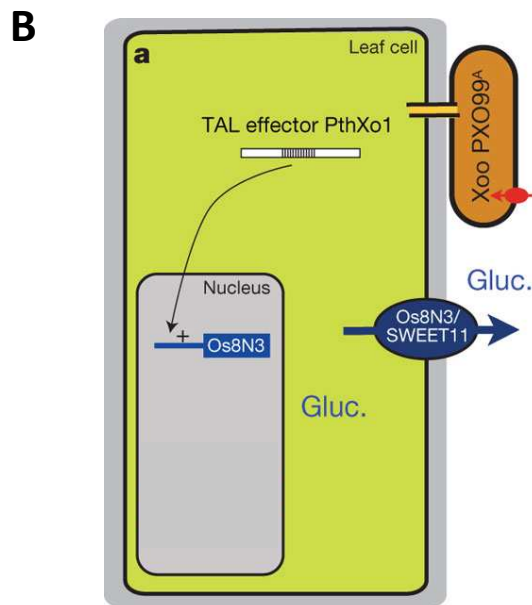
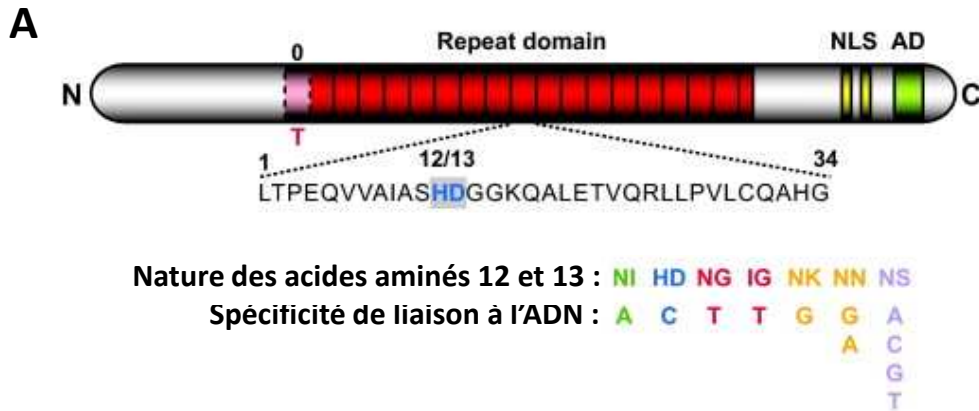


Figure 6. (A) Code de liaison à l'ADN des effecteurs de type III TALs. Les protéines TALs (transcription activator-like) contiennent un signal d'adressage au noyau (NLS pour nuclear localization signal) et un domaine d'activation (AD pour activation domain) nécessaires à leur fonction de facteurs de transcription. Le domaine central est constitué de répétitions en tandem (repeat domain) et confère la spécificité de liaison à l'ADN. Chaque répétition de 34 acides aminés interagit avec une paire de base, selon une spécificité déterminée par les acides aminés 12 et 13. Cette spécificité peut comprendre une ou plusieurs bases. (d'après Scholze & Boch, 2011). **(B) Modèle proposé pour le rôle du TAL PthXo1.** La bactérie phytopathogène *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* injecte le TAL PthXo1 dans les cellules du Riz. PthXo1 induit directement l'expression du gène *OsSWEET11* qui code pour un transporteur de glucose (Gluc.). La bactérie pourrait tirer partie de l'efflux de glucose dans le milieu extérieur pour son propre métabolisme et sa multiplication (Chen *et al.*, 2010).

II.2. Des ET3s stimulent la libération de nutriments par la plante

En dehors de la fonction de suppresseur de la PTI endossée par la grande majorité des ET3s, un rôle a été récemment mis en évidence dans la manipulation des flux métaboliques de la plante. Cette découverte concerne des ET3s appelés TALs (transcription activator-like). Ces ET3s n'ont été identifiés que chez les bactéries phytopathogènes *Xanthomonas* spp. et *Ralstonia solanacearum* (Scholze & Boch, 2011). Ils sont structurés en trois domaines : un domaine de liaison à l'ADN, un signal d'adressage au noyau (NLS) et un domaine d'activation typique de facteurs de transcription (Figure 6 A). Les TALs sont ainsi capables de se fixer aux promoteurs de leurs gènes cibles et d'activer leur transcription (Kay *et al.*, 2007 ; Romer *et al.*, 2007). Le domaine de liaison à l'ADN est composé de modules répétés et hautement conservés au sein desquels deux résidus sont cependant variables. La nature de ces deux résidus détermine la spécificité de liaison à l'ADN, chaque module interagissant avec un nucléotide (Boch *et al.*, 2009 ; Moscou & Bogdanove, 2009).

La fonction des TALs dans la virulence est encore méconnue. Cependant, des études suggèrent pour certains d'entre eux un rôle dans l'activation de gènes codant pour des transporteurs de sucres. Le TAL PthXo1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* induit en effet l'expression du gène *OsSWEET11* chez le Riz (Yang *et al.*, 2006) (Figure 6 B). Ce gène appartient à une famille de transporteurs membranaires impliqués dans l'export de sucres (Chen *et al.*, 2010), mais sa fonction n'a en revanche pas été validée expérimentalement. L'expression d'*OsSWEET11* facilitant la colonisation bactérienne dans la plante, ce gène est défini comme un gène de sensibilité. D'autres gènes *SWEET* ont également été identifiés comme cibles de divers TALs (Antony *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2011). L'hypothèse est que ces TALs activent l'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres de la cellule végétale vers le milieu extracellulaire, permettant à la bactérie d'en bénéficier pour sa propre nutrition.

III. Effet boomerang : l'immunité déclenchée par les effecteurs de type III (ou ETI)

Les ET3s, acquis par les bactéries et transloqués dans la cellule végétale, permettent majoritairement de supprimer la PTI et d'aboutir à une infection réussie. Cependant, la coévolution plantes-bactéries a mené à l'acquisition par les plantes de protéines capables de percevoir ces ET3s : les protéines de résistance (protéines R). Un ET3 détecté de cette manière joue dès lors un rôle de facteur d'avirulence (Avr) dans l'interaction. Cette reconnaissance aboutit à la mise en place d'une deuxième barrière de défense, on parle de résistance spécifique ou d'immunité déclenchée par les ET3s (ETI pour effector-triggered immunity). L'ETI se caractérise par une forte efficacité à faire échouer l'infection par l'agent pathogène, qui s'explique par une amplitude des réponses de défense et une vitesse de leur mise en place plus grande que lors de la PTI. L'ETI se traduit ainsi souvent par une mort cellulaire programmée des cellules végétales, dite réaction hypersensible (HR pour hypersensitive response), localisée au site d'infection et restreignant la multiplication du microorganisme pathogène (Dangl *et al.*, 1996).

Dès 1971, le concept de résistance gène-pour-gène a été introduit par Flor (Flor, 1971). Il établit que la résistance d'une plante à un agent pathogène donné nécessite la présence des produits d'un gène *avr* du côté de l'agent pathogène et d'un gène *R* correspondant du côté de la plante hôte.

Les sections qui suivent présentent les récepteurs NLRs et leurs modes d'activation, les différents modèles d'interaction R/Avr identifiés à ce jour, ainsi que les voies de signalisation et les réponses mises en place lors de l'ETI.

III.1. Les récepteurs NLRs

III.1.1. Généralités

L'essentiel des protéines R identifiées sont des protéines NLRs (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat), qui appartiennent au sous-groupe des protéines de type STAND (signal transduction ATPases with numerous domains), inclus dans la superfamille des AAA-ATPases. Les protéines NLRs sont caractérisées par un

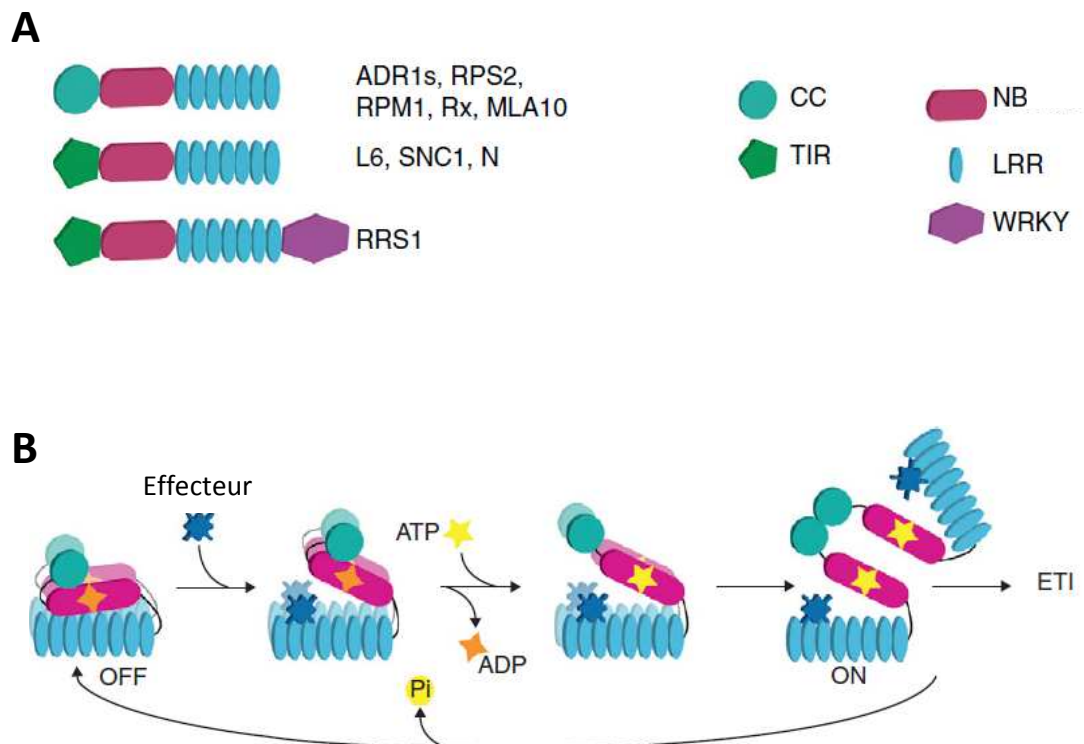


Figure 7. A) Les différentes familles de protéines NLRs chez les plantes. Trois familles ont été identifiées avec des architectures différentes. Des exemples de représentants de chaque famille sont indiqués à droite de la représentation schématique correspondante. A droite sont représentés les domaines coiled-coil (CC), Toll/interleukin-1 (TIR), Nucleotide binding (NB), leucine-rich repeat (LRR) et le domaine de type facteur de transcription WRKY. **B) Modèles généraux d'activation des NLRs.** L'état de repos (OFF) des protéines NLRs est maintenu par le rôle inhibiteur du domaine LRR. Une protéine NLR peut reconnaître un effecteur de type III jouant un rôle de protéine Avr (étoile bleue). Cette reconnaissance induit un changement de conformation du domaine LRR et permet la libération d'ADP (étoile orange) et la fixation d'ATP (étoile jaune). Il en résulte un deuxième changement de conformation qui permet aux domaines N-terminaux d'interagir entre eux, activant ainsi la protéine NLR (ON). Le retour à l'état de repos implique la déphosphorylation d'ATP en ADP (d'après Bonardi *et al.*, 2012).

domaine central de liaison aux nucléotides (NB pour nucleotide-binding), un nombre variable de répétitions riches en leucine (LRRs) localisées dans la région C-terminale, et un domaine N-terminal variable (Figure 7 A). Ce dernier est généralement un domaine CC (coiled-coil) ou un domaine TIR (toll-interleukin 1 receptor). Le domaine LRR, particulièrement polymorphe car soumis à une forte sélection positive (Michelmore & Meyers, 1998), apparaît comme le déterminant majeur de la spécificité d'interaction des NLRs (Shen *et al.*, 2003 ; Rairdan & Moffett, 2006).

La majorité des protéines NLRs sont localisées dans le cytoplasme, bien qu'une certaine diversité existe. La localisation nucléaire d'une fraction de RPS4 chez *A. thaliana* est par exemple nécessaire à sa fonction (Wirthmueller *et al.*, 2007). L'autre fraction de RPS4 est endosomale. D'autres NLRs sont associés aux membranes : chez *A. thaliana* toujours, RPM1 est localisée à la membrane plasmique (Boyes *et al.*, 1998) et RPP1A est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et des membranes golgiennes (Weaver *et al.*, 2006). Finalement, la diversité des compartiments cellulaires ciblés par les ET3s, telle que décrite dans la section précédente, pourrait expliquer cette diversité de localisations cellulaires des NLRs.

III.1.2. Activation des NLRs

Considérant d'un côté le besoin pour la plante au repos de garder les récepteurs NLRs inactifs, le coût des défenses étant important, et de l'autre la nécessité d'activer rapidement les NLRs en réponse à un agent pathogène, ces récepteurs sont vraisemblablement soumis à une régulation fine. A l'état de repos, les protéines NLRs doivent adopter une conformation leur permettant de percevoir les ET3s. Des complexes de chaperonnes, telles que HSP90, SGT1 et RAR1, sont impliqués dans la stabilisation de ces récepteurs et dans leur capacité à être activés (Leister *et al.*, 2005 ; Azevedo *et al.*, 2006 ; Boter *et al.*, 2007).

Une interaction entre les différents domaines a été démontrée pour plusieurs NLRs (Moffett *et al.*, 2002 ; Leister *et al.*, 2005 ; Ueda *et al.*, 2006 ; Ade *et al.*, 2007 ; van Ooijen *et al.*, 2008). EDVID, un motif conservé et présent dans la plupart des domaines CC, est notamment impliqué dans ces interactions (Rairdan *et al.*, 2008).

Le domaine LRR, outre son rôle dans la spécificité d'interaction avec les partenaires des NLRs, est impliqué dans la régulation, positive ou négative, de l'activité des NLRs : d'une part, plusieurs études ont montré qu'une délétion du domaine LRR aboutit à une auto-activation du récepteur (Rairdan & Moffett, 2006 ; Weaver *et al.*, 2006 ; Ade *et al.*, 2007) ; d'autre part, le domaine LRR est nécessaire au déclenchement de la HR par une version du récepteur mutée au niveau du domaine NB (Rairdan & Moffett, 2006 ; van Ooijen *et al.*, 2008).

Le domaine dit NB des protéines NLRs est en réalité composé de deux éléments : le domaine NB en lui-même et le domaine ARC (adaptor shared by APAF-1, certain *R* gene products and CED-4). Ces deux domaines confèrent la capacité à lier l'ATP et à l'hydrolyser, notamment *via* un motif P-loop (van Ooijen *et al.*, 2008). Un mutant affecté dans l'hydrolyse de l'ATP est maintenu dans un état actif après perception de l'ET3 (Ade *et al.*, 2007 ; van Ooijen *et al.*, 2008). L'ensemble des données disponibles a conduit à un modèle qui propose que les NLRs agissent comme des interrupteurs moléculaires régulés par leur liaison aux nucléotides (Tameling *et al.*, 2006) (Figure 6 B). Ainsi, la reconnaissance de l'ET3 entraîne une modulation des interactions entre domaines au sein de la protéine NLR, induisant un premier changement conformationnel, notamment au niveau du motif P-loop. Il en résulte une transition entre liaison à l'ADP et liaison à l'ATP, ce qui induit un second changement de conformation, l'activation de récepteur et donc de la signalisation en aval. Le retour à l'état inactif requiert l'hydrolyse de l'ATP.

Par ailleurs, des études récentes indiquent que le changement de conformation dépendant de la transition ADP-ATP induit probablement une oligomérisation du récepteur nécessaire à l'activation de la signalisation en aval (Figure 7 B). Les domaines NB-ARC, CC et TIR seraient impliqués dans cette oligomérisation (Mestre & Baulcombe, 2006 ; Ade *et al.*, 2007 ; Gutierrez *et al.*, 2010 ; Bernoux *et al.*, 2011 ; Maekawa *et al.*, 2011).

III.2. Modèles d'interactions R/Avr

Le modèle de reconnaissance d'un ET3, agissant comme protéine Avr, par un récepteur NLR proposait initialement une interaction physique directe entre les deux protéines. Ce modèle appelé « récepteur-ligand » est considéré aujourd'hui plus

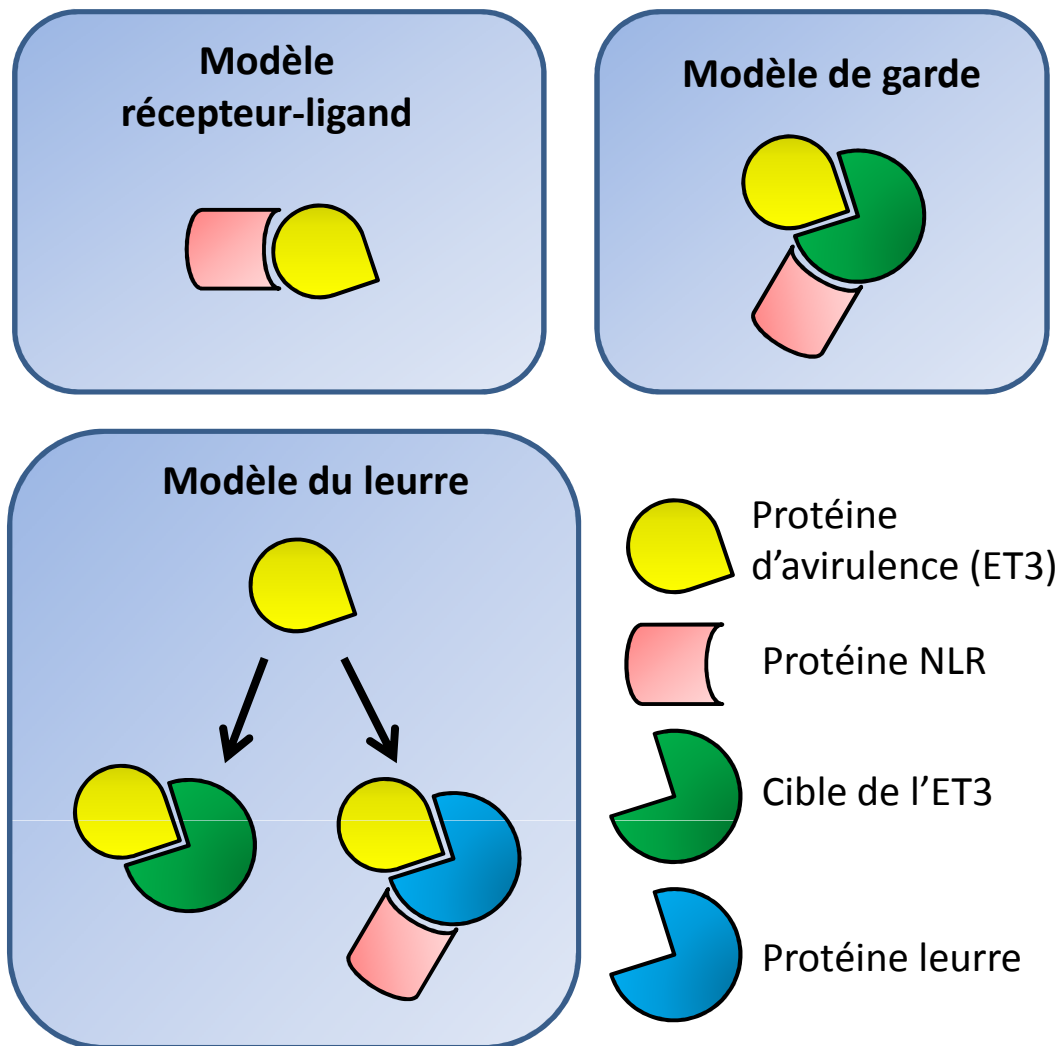


Figure 8. Les différents modèles de reconnaissance R/Avr. Selon le modèle récepteur-ligand, la protéine bactérienne d'avirulence (Avr ; jaune) est directement reconnue par la protéine NLR de la plante (rouge). Dans le cadre du modèle de garde, la protéine d'avirulence est reconnue à travers les modifications qu'elle induit sur sa protéine cible (verte), qui est ainsi « gardée » par la protéine NLR. Ce système permet à la plante de détecter l'activité de plusieurs effecteurs de type III, appartenant à différentes espèces pathogènes, qui partagent une même cible végétale. Le modèle du leurre est basé sur le modèle de garde mais se différencie par le fait que la protéine gardée (bleue) n'a d'autre fonction que celle d'être ciblée par l'effecteur de type III et de déclencher les réponses de défense de la plante.

comme une exception que comme la règle, plusieurs études ayant contribué depuis à l'émergence de modèles d'interaction indirecte : le modèle de garde et le modèle du leurre.

III.2.1. Le modèle récepteur-ligand

Bien que la grande majorité des couples R/Avr fasse intervenir une reconnaissance indirecte de l'ET3, quelques cas d'interaction directe sont connus, correspondant au modèle récepteur-ligand (Figure 8). Le seul concernant une interaction plante-bactérie met en jeu la reconnaissance de l'ET3 PopP2 de *R. solanacearum* par la protéine RRS1-R chez *A. thaliana*. PopP2 renferme un domaine NLS et exhibe une activité acétyltransférase (Deslandes *et al.*, 2003 ; Tasset *et al.*, 2010). RRS1-R est une NLR de type TIR-NB-LRR atypique car comportant également un motif C-terminal caractéristique des facteurs de transcription WRKY. L'expression de PopP2 chez *A. thaliana* induit l'accumulation de RRS1-R dans le noyau, où les deux protéines interagissent (Tasset *et al.*, 2010). Le rôle exact de RRS1-R dans le déclenchement des défenses n'est pas connu mais il est suggéré que la protéine, initialement un régulateur négatif des défenses, puisse activer des gènes de défense après reconnaissance de PopP2 et de son activité acétyltransférase (Deslandes & Rivas, 2012).

III.2.2. Le modèle de garde

De nombreux travaux suggèrent que les plantes ont surtout développé une stratégie de reconnaissance indirecte des ET3s, ce qui a abouti à la proposition d'un modèle de garde (Dangl & Jones, 2001) (Figure 8). Les ET3s ne sont pas reconnus directement *via* leur structure, mais indirectement au travers de leur action sur les protéines de défense qu'ils ciblent. Ces dernières sont ainsi « gardées » par les protéines R. Cette stratégie prend tout son sens considérant que (i) les bactéries possèdent des répertoires d'ET3s conséquents et très variables, (ii) les bactéries évoluent plus vite que les plantes, et (iii) les ET3s présentent une certaine redondance fonctionnelle, ciblant les mêmes protéines végétales.

Chez *A. thaliana*, RIN4 est le parfait exemple d'une protéine gardée et illustre la redondance fonctionnelle des ET3s. RIN4 est notamment ciblée par trois ET3s de

P. syringae : AvrB, AvrRpm1 et AvrRpt2. Ces ET3s, en ciblant RIN4, une protéine impliquée dans la régulation négative des défenses de la plante, inhibent la PTI (Kim *et al.*, 2005b ; Chung *et al.*, 2011). Les fonctions d'AvrB et AvrRpm1 nécessitent la phosphorylation de RIN4. Cependant, chez les écotypes d'*A. thaliana* résistants, la protéine NLR RPM1 perçoit cette modification de RIN4 et déclenche l'ETI. Par ailleurs, RMP1 provoque une ETI bien plus forte en réponse à AvrRpm1 qu'en réponse à AvrB, suggérant que cet ET3 phosphoryle plusieurs résidus ou induit d'autres modifications post-traductionnelles reconnues par RPM1 (Kim *et al.*, 2005b). AvrRpt2 est une protéine à cystéine qui subit un clivage autocatalytique une fois dans la cellule végétale, aboutissant à une forme stable et active (Coaker *et al.*, 2005). AvrRpt2 clive aussi RIN4, qui présente deux séquences similaires aux sites de clivage de l'ET3 (Kim *et al.*, 2005a). Il est probable que les produits de dégradation soient de meilleurs inhibiteurs de PTI que la protéine pleine longueur (Afzal *et al.*, 2011). En revanche, la protéine NLR RPS2, quand elle est présente, est capable de détecter ce clivage et d'induire l'ETI (Axtell & Staskawicz, 2003 ; Mackey *et al.*, 2003).

III.2.3. Le modèle du leurre

Toujours dans le cadre d'une interaction R/Avr indirecte, un deuxième type de scénario a été mis en évidence : le modèle du leurre (van der Hoorn & Kamoun, 2008) (Figure 8). Contrairement au modèle de garde classique, la protéine gardée n'est plus un acteur de la PTI mais une protéine qui a évolué pour n'avoir d'autre fonction que celle d'être ciblée par des ET3s et ainsi déclencher l'ETI, en association avec une protéine R. L'avantage de ce scénario serait d'éviter à la protéine gardée d'être soumise à des forces de sélection en opposition : d'un côté échapper à l'ET3 et préserver sa fonction dans la PTI, et de l'autre renforcer l'interaction avec l'ET3 pour déclencher l'ETI.

Le couple Pto/AvrPto fonctionne d'après ce modèle. Cet ET3 de *P. syringae* inhibe la PTI chez certains écotypes d'*A. thaliana* sensibles, en interagissant notamment avec les domaines kinases de plusieurs protéines PRRs dont FLS2. Il en résulte un blocage de la phosphorylation de la protéine de type RLCK BIK1 par FLS2, inhibant ainsi la signalisation en aval et la PTI (Xiang *et al.*, 2008). Les écotypes résistants synthétisent la protéine Pto, une sérine/thréonine kinase

intracellulaire localisée à la membrane plasmique (Xing *et al.*, 2007). Il est probable que Pto ait évolué afin de détourner AvrPto des protéines PRRs ciblées initialement. Après reconnaissance d'AvrPto, Pto est capable de déclencher l'ETI, assisté de Prf, un autre récepteur NLR (Pedley & Martin, 2003).

Il existe un autre type de relation R/Avr un peu particulier qui s'apparente au modèle du leurre. L'ET3 AvrBs3 est un TAL de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* qui induit l'hypertrophie des cellules de variétés de poivrons sensibles, favorisant probablement la prolifération et la dispersion de la bactérie pathogène (Marois *et al.*, 2002). AvrBs3 interagit avec la boîte UPA (upregulated by AvrBS3) du promoteur du gène *UPA20*, codant pour un facteur de transcription qui est un régulateur clé de la croissance cellulaire (Kay *et al.*, 2007). Les variétés de poivron résistantes ont acquis le gène Bs3 qui code pour une protéine homologue de mono-oxygénase et dont le promoteur présente la même boîte UPA. Par conséquent, AvrBs3 se fixe au promoteur de Bs3, se détournant du gène UPA20, ce qui aboutit à la mise en place de l'ETI (Römer *et al.*, 2007 ; Römer *et al.*, 2009). Dans ce cas, le leurre n'est pas gardé mais est lui-même impliqué activement dans l'ETI.

III.3. Signalisation et réponses de l'ETI

Les événements de signalisation de l'ETI, après activation des NLRs, sont encore peu compris. Deux modules de signalisation sont mis en jeu : (i) une voie implique NDR1 (non-race specific disease resistance 1) qui régule dans la plupart des cas la résistance dépendante de protéines NLRs de type CC-NB-LRRs, et (ii) un complexe EDS1 (enhanced disease susceptibility 1) / PAD4 (phytoalexin deficient 4) / SAG101 (senescence-associated gene 101) qui est associé à la résistance dépendante de protéines NLRs de type TIR-NB-LRRs (Aarts *et al.*, 1998). Ces deux systèmes impliquent une signalisation redox et l'accumulation de SA (Shapiro & Zhang, 2001 ; Wiermer *et al.*, 2005 ; Torres, 2010). ROS et SA agissent de manière synergique dans l'établissement de la HR (Shirasu *et al.*, 1997).

De plus en plus d'exemples dans la littérature décrivent l'importance d'une localisation nucléaire des NLRs pour la mise en place de l'ETI, suggérant une action sur l'expression génique. Parmi les exemples les mieux décrits, SNC1 (suppressor of npr1-1, constitutive 1) chez *A. thaliana* a récemment été identifié comme

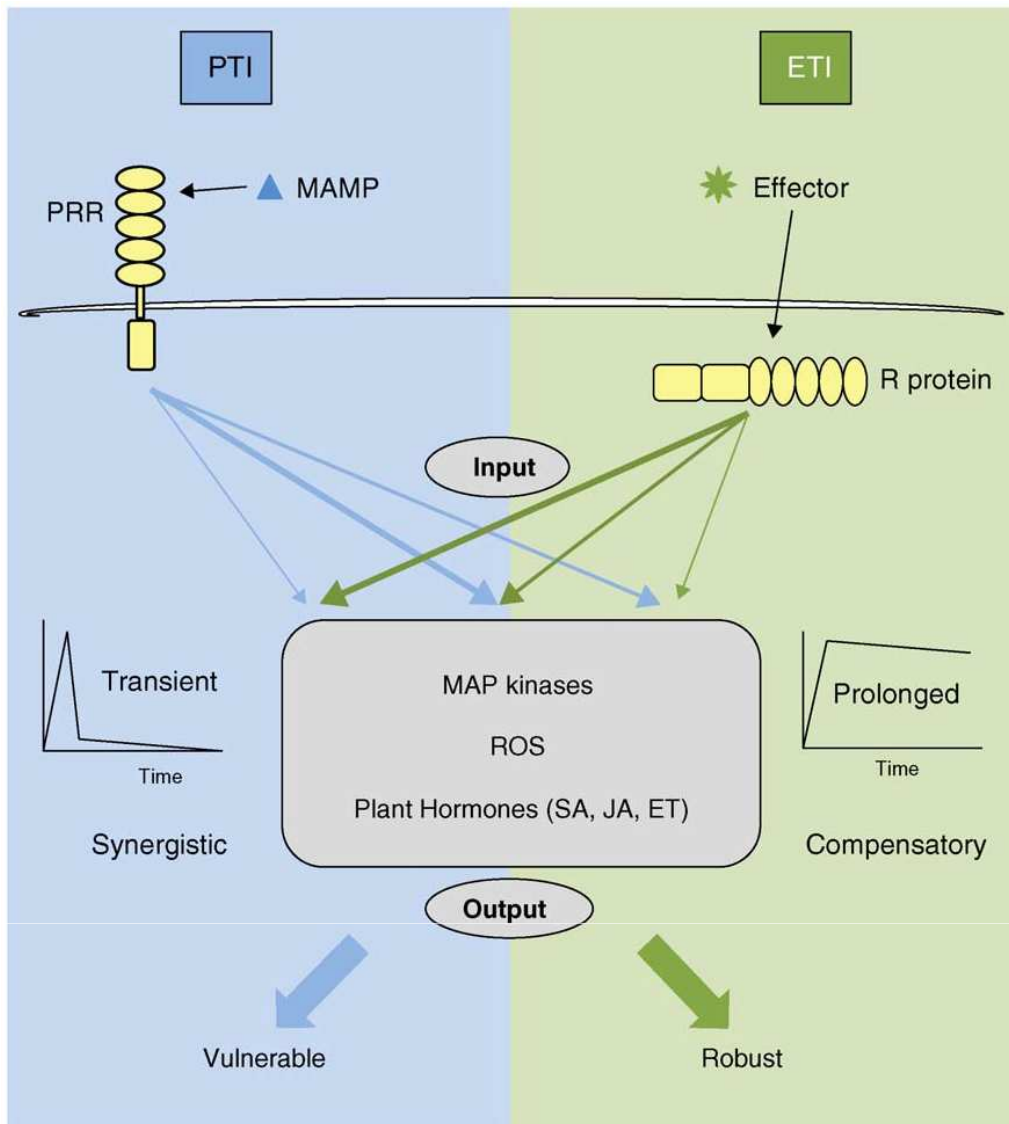


Figure 9. Comparaison des immunités déclenchées par les PAMPs (PTI) et par les effecteurs (ETI). La PTI (en bleu) et l'ETI (en vert) utilisent globalement les mêmes réseaux de signalisation après perception de l'agent pathogène par les récepteurs PRR ou par les protéines R, respectivement. La différence pourrait principalement résider dans l'intensité et la durée d'utilisation de ces réseaux, ce qui est symbolisé par des flèches de différentes épaisseurs. Les différentes utilisations des réseaux sont reflétées par : i) des réponses induites transitoires pour la PTI et prolongées pour l'ETI, et ii) une synergie entre les différents secteurs de signalisation est observée pour la PTI alors que des relations de compensation entre ces secteurs dominent lors de l'ETI (d'après Tsuda & Katagiri, 2010).

MAMP : microbe-associated molecular pattern ; PRR : pattern-recognition receptor ; PTI : PAMP-triggered immunity ; ETI : effector-triggered immunity ; R protein : resistance protein ; MAP : mitogen-associated protein ; ROS : reactive oxygen species ; SA : salicylic acid ; JA : jasmonic acid ; ET : ethylene

interagissant avec le facteur de transcription TPR1 (topless-related 1) pour réprimer l'expression de DND1 et DND2 (defense, no death 1 & 2) codant pour des transporteurs d'ions impliqués dans la régulation négative des défenses (Clough *et al.*, 2000 ; Jurkowski *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2010).

Contrairement à la PTI, l'ETI est souvent associée à la HR. Cependant, La signalisation aboutissant à la HR partage des similitudes avec la signalisation de la PTI, notamment une accumulation de SA, de ROS et de RNS, ainsi que l'activation de cascades de MAPKs, des changements de concentrations calciques cytoplasmiques, une reprogrammation transcriptionnelle et la synthèse de composés antimicrobiens (Mur *et al.*, 2008). Un chevauchement significatif de la reprogrammation transcriptionnelle a été mis en évidence en réponse aux PAMPs et aux ET3s (Navarro *et al.*, 2004). Il semble que l'ETI soit finalement une réponse accélérée et amplifiée par rapport à la PTI. La différence serait donc plus quantitative que qualitative (Figure 9).

Les MAMPs, par exemple, induisent une accumulation de ROS rapide et transitoire. En revanche, en réponse à un agent pathogène exprimant un ET3 reconnu par la plante, une accumulation de ROS en deux phases est observée : une première phase transitoire et de relativement faible amplitude, déclenchée certainement par les MAMPs ; puis une deuxième phase prolongée et de plus forte amplitude, élicitée par l'ET3 (Torres *et al.*, 2006). De manière similaire, les protéines MPK3 et MPK6 sont activées de manière plus prolongée en réponse à *P. syringae* exprimant l'ET3 AvrRpt2 que lorsque l'ET3 est absent (Underwood *et al.*, 2007).

La signalisation hormonale est importante dans l'ETI comme dans la PTI. Les voies dépendantes du SA, de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) peuvent être requises de manière variable pour la mise en place des défenses, en fonction de l'agent pathogène considéré (Katagiri, 2004). Cependant, il a été montré que ces voies de signalisation sont mises à contribution différemment dans la PTI et dans l'ETI (Tsuda *et al.*, 2009) (Figure 9). Il apparaît qu'elles fonctionnent de manière synergique au cours de la PTI, alors qu'elles auraient des effets plutôt compensatoires lors de l'ETI, ce qui expliquerait en partie la meilleure robustesse de l'ETI vis-à-vis des perturbations liées à l'arsenal des microorganismes pathogènes.

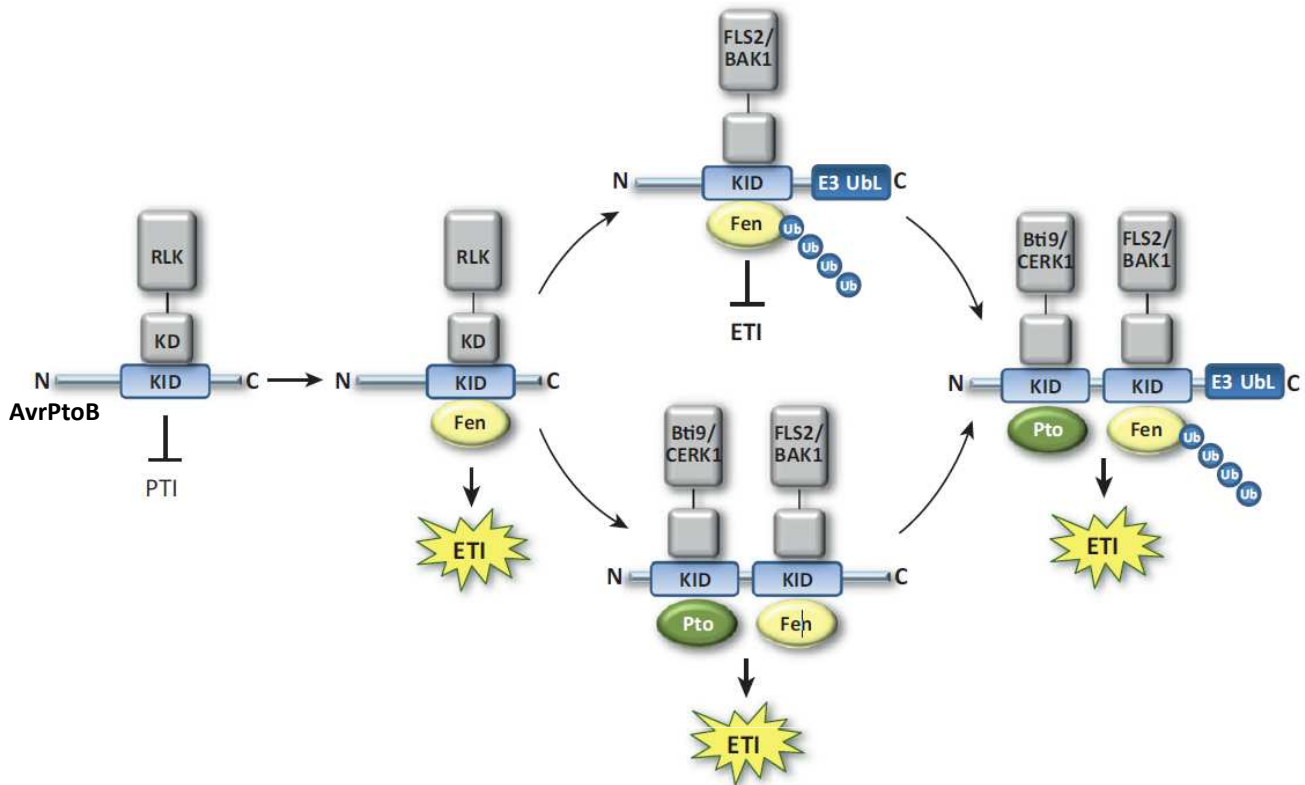


Figure 10. Modèle de l'évolution entre l'effecteur de type III (ET3) AvrPtoB et ses partenaires d'interaction *in planta*. Ce modèle propose que l'ET3 AvrPtoB (en bleu) avait initialement un unique domaine inhibiteur d'activité kinase (KID) dont la fonction est d'inhiber la signalisation dépendante de récepteur de type kinase (RLK, en gris). Un ancêtre de la protéine végétale Fen a pu évoluer pour reconnaître ce domaine KID et induire l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI). Dans un deuxième temps, un domaine ubiquitine ligase aurait été acquis par la protéine AvrPtoB, permettant de dégrader la protéine Fen et d'éviter l'ETI. Finalement, un événement de duplication en tandem et de divergence ultérieure du domaine KID aurait permis à Pto, qui évite la dégradation par AvrPtoB en phosphorylant cette protéine, de reconnaître ce second domaine KID et de restaurer l'ETI. Un scénario alternatif propose que la duplication du domaine KID ait eu lieu avant l'acquisition du domaine ubiquitine ligase (Deslandes & Rivas, 2012).

IV. Course sans fin à l'armement : ET3s versus NLRs

En conclusion, outre *via* les PAMPs, les plantes ont acquis la capacité à percevoir la présence des microorganismes pathogènes grâce à des récepteurs intracellulaires qui interagissent avec des ET3s, initialement des suppresseurs de la PTI, retournant ainsi ces facteurs de virulence contre le pathogène. Cependant, la coévolution hôte-agent pathogène est un processus continu, aboutissant à une course infinie à l'armement. De nouveaux mécanismes de virulence et de défense sont ainsi acquis par les différents protagonistes, conduisant tour à tour à la réussite ou à l'échec de l'infection.

La sélection naturelle conduit les agents pathogènes à perdre ou modifier les ET3s reconnus par la plante, ou encore à acquérir de nouveaux ET3s qui suppriment l'ETI. En retour, la sélection naturelle conduit les NLRs à acquérir de nouvelles spécificités pour reconnaître à nouveau ces ET3s et déclencher l'ETI.

Cette coévolution peut être illustrée par l'exemple éloquent que fournit l'ET3 AvrPtoB de *P. syringae*. AvrPtoB supprime la PTI chez les variétés de Tomate sensibles (Xiao *et al.*, 2007). Son interaction avec les domaines kinase de la protéine PRR FLS2 et de son corécepteur BAK1 inhibe la signalisation en aval (Shan *et al.*, 2008). Chez les variétés de Tomate résistantes, AvrPtoB interagit *via* son domaine N-terminal avec les protéines RLCKs Pto et Fen (Rosebrock *et al.*, 2007 ; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009). Fen appartient à la même famille que Pto et est capable de déclencher l'ETI chez les variétés de Tomate pour lesquelles la protéine Pto est absente. Il semble que ces deux protéines RLCKs soient des leurres pour AvrPtoB (Xing *et al.*, 2007). Cependant, contrairement à Pto, Fen ne déclenche pas l'ETI en réponse à AvrPtoB, ce dernier étant capable d'ubiquitiner Fen, aboutissant à sa dégradation (Rosebrock *et al.*, 2007). Pto est en revanche protégée d'une telle dégradation, probablement en phosphorylant AvrPtoB au niveau de son domaine ubiquitine ligase.

De l'ensemble des données disponibles sur AvrPtoB et ses interacteurs a émergé un modèle qui propose que Fen ait dans un premier temps évolué pour interagir en tant que leurre avec l'ET3 AvrPtoB inhibiteur de la PTI, aboutissant ainsi à l'établissement de l'ETI (Figure 10). Pour contourner l'ETI, AvrPtoB aurait acquis

une activité ubiquitine ligase lui permettant d'induire la dégradation de Fen. Finalement, Pto aurait évolué pour agir à son tour comme leurre vis-à-vis de l'effecteur, tout en étant préservé d'une éventuelle dégradation en phosphorylant le domaine ubiquitine ligase d'AvrPtoB, aboutissant de nouveau à l'ETI.

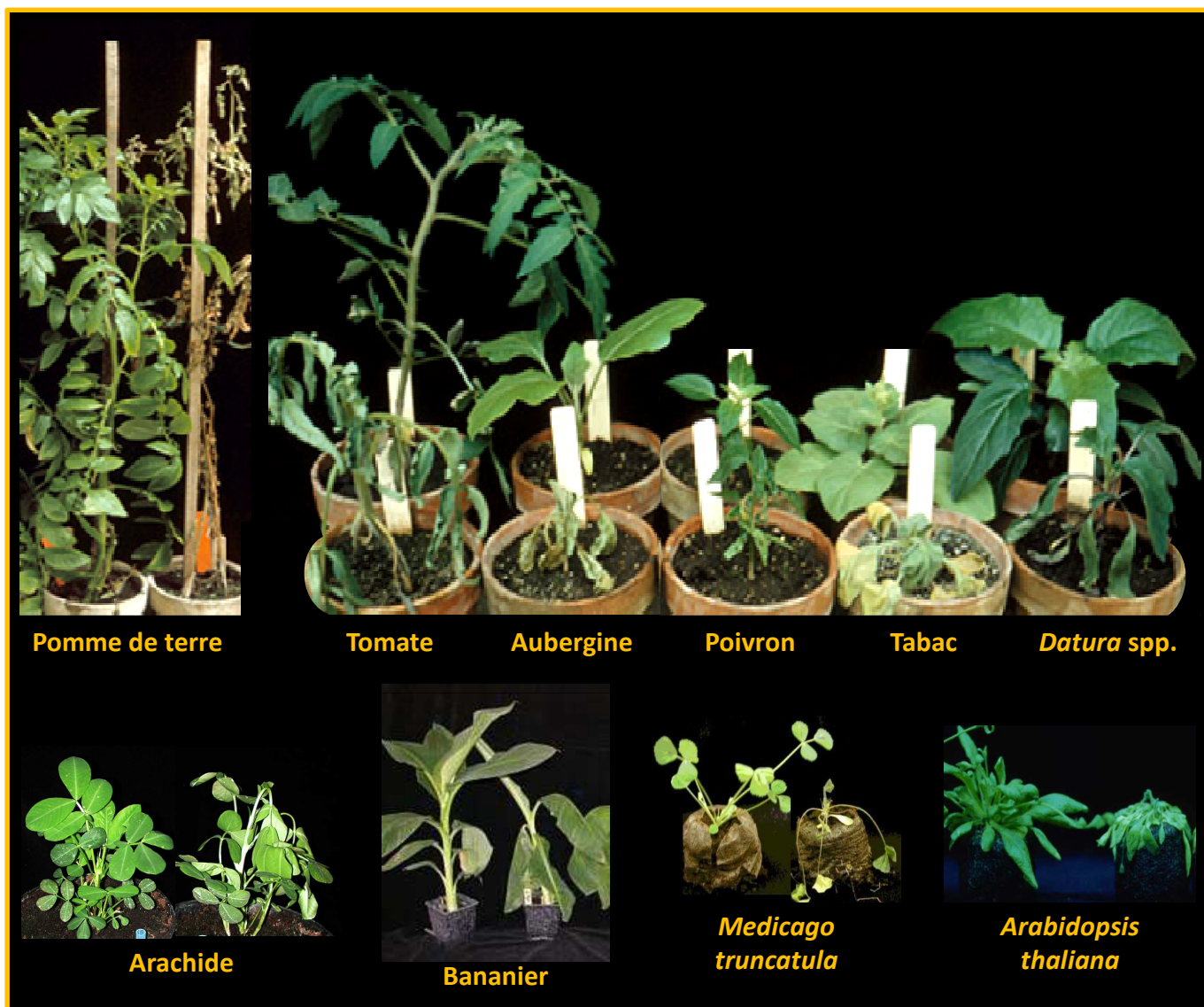


Figure 11. Symptômes du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sur plusieurs plantes hôtes. Pour chacune des espèces hôtes représentées, une plante saine et une plante inoculée avec *R. solanacearum* sont montrées. *R. solanacearum* présente la particularité d'avoir un spectre d'hôtes très important, infectant plus de 200 espèces végétales.

CHAPITRE II

LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE

RALSTONIA SOLANACEARUM

I. Spectre d'hôtes et cycle infectieux

I.1. Un spectre d'hôtes particulièrement large

R. solanacearum, bactérie phytopathogène à caractère Gram négatif, est l'agent responsable de la maladie dite du flétrissement bactérien. Elle fait partie du phylum des protéobactéries, auquel appartiennent de nombreux autres genres de bactéries pathogènes de plantes (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, ...) comme d'animaux (*Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, ...). Au sein de ce phylum, *R. solanacearum* appartient à l'ordre des *Burkholderiales*, qui comprend notamment les bactéries pathogènes des genres *Bordetella* ou *Burkholderia*.

Le flétrissement bactérien est reconnu comme une des plus importantes bactérioses dans le monde. Un récent sondage réalisé auprès de la communauté scientifique place ainsi *R. solanacearum* en deuxième position, derrière *Pseudomonas syringae*, sur la base de leurs intérêts scientifique et économique (Mansfield *et al.*, 2012). Le flétrissement bactérien est une maladie répandue au niveau des zones tropicales et subtropicales du globe terrestre, et rapportée comme émergente dans certaines zones à climat tempéré, telles que l'Amérique du Nord et l'Europe (Elphinstone *et al.*, 2005). *R. solanacearum* présente un spectre d'hôtes exceptionnellement large, étant capable d'infecter plus de 200 espèces végétales différentes, représentant plus de 53 familles botaniques de mono et dicotylédones (Elphinstone *et al.*, 2005). Des espèces d'intérêt agronomique telles la Pomme de

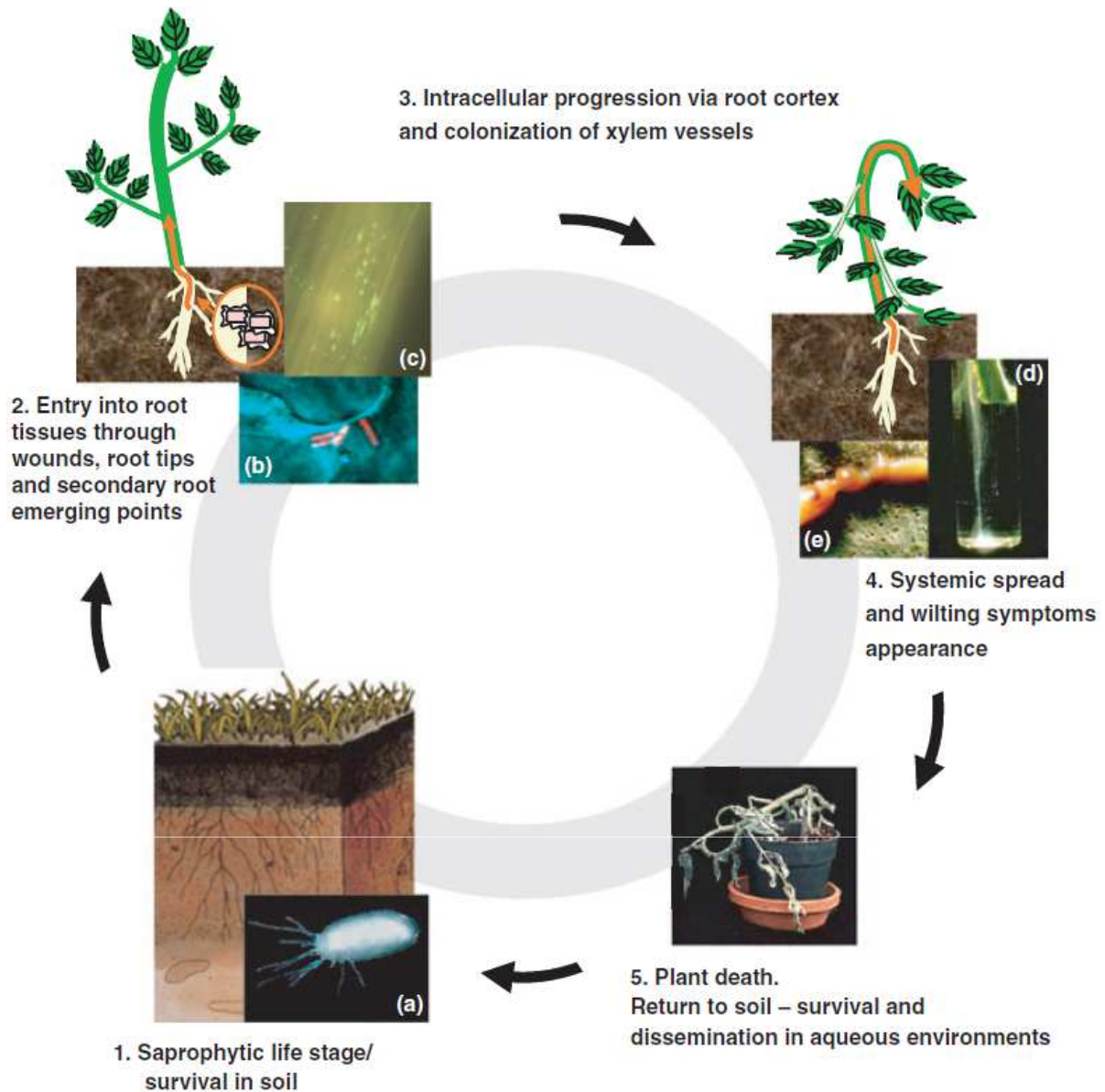


Figure 12. Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*. La bactérie est capable de survivre dans le sol pendant de longues périodes. Une fois le contact établi avec les racines d'une plante hôte, *R. solanacearum* pénètre dans les tissus racinaires puis envahit le système vasculaire. Les symptômes de flétrissement sont associés à une forte multiplication dans les vaisseaux du xylème et à une production massive d'exopolysaccharides (EPS), pouvant aboutir à la mort de la plante. (a) Observation au microscope électronique à transmission de la souche de référence GMI1000. (b) Observation au microscope confocal de bactéries (en rouge) attachées à la surface des cellules végétales. (c) Bactéries exprimant la GFP (green-fluorescent protein) observées à la surface de racines de tomates. (d) *R. solanacearum* exsudant dans l'eau à partir d'une tige sectionnée de tomate infectée. (e) Exopolysaccharides bactériens exsudant des vaisseaux d'une tige après section transversale (Genin, 2010).

terre, la Tomate, le Bananier ou l'Arachide, ainsi que des espèces modèles comme *A. thaliana* ou *Medicago truncatula*, sont concernées (Figure 11).

La capacité à infecter une large gamme d'hôtes n'est pas partagée par toutes les souches de *R. solanacearum*. Certaines présentent ainsi une spécificité d'hôtes marquée, comme les souches responsables de la maladie de Moko sur Bananier. Cependant, la question du spectre d'hôtes de *R. solanacearum* demeure complexe, sachant que peu de souches ont été parfaitement caractérisées et que certains tests de pathogénie en conditions contrôlées sont susceptibles d'élargir artificiellement la gamme d'hôtes (Genin, 2010). Par ailleurs, la phylogénie de *R. solanacearum* ne révèle pas de corrélation entre les spectres d'hôtes et les groupes phylogénétiques.

I.2. Un cycle infectieux révélateur d'adaptation environnementale

R. solanacearum est une bactérie tellurique qui pénètre dans la plante au niveau des extrémités racinaires et traverse les tissus pour atteindre les vaisseaux conducteurs du xylème (Figure 12). L'infection se poursuit par la colonisation systémique de la plante, *via* son système vasculaire. Dans le xylème, la bactérie produit massivement des exopolysaccharides (EPS) qui sont largement à l'origine de l'obstruction des vaisseaux, perturbant le flux de sève et aboutissant *in fine* aux symptômes de flétrissement de la plante. *R. solanacearum* peut atteindre en quelques jours une très forte densité dans la plante, jusqu'à 10^{10} bactéries par gramme de tissu. Le cycle de vie de *R. solanacearum* inclut une phase saprophytique : la bactérie est capable de survivre dans le sol pendant plusieurs années, notamment dans les cours d'eau qui constituent un important moyen de dissémination. La survie de la bactérie repose sur son aptitude à dégrader les débris végétaux et à coloniser des adventices ou autres plantes de manière asymptomatique (Hayward, 1991 ; Genin & Boucher 2004). Par ailleurs, la résistance de *R. solanacearum* à un appauvrissement nutritif est révélée par la capacité que conserve un inoculum à infecter efficacement des plantes hôtes, même après incubation pendant 132 jours dans de l'eau ultrapure (van Overbeek *et al.*, 2004).

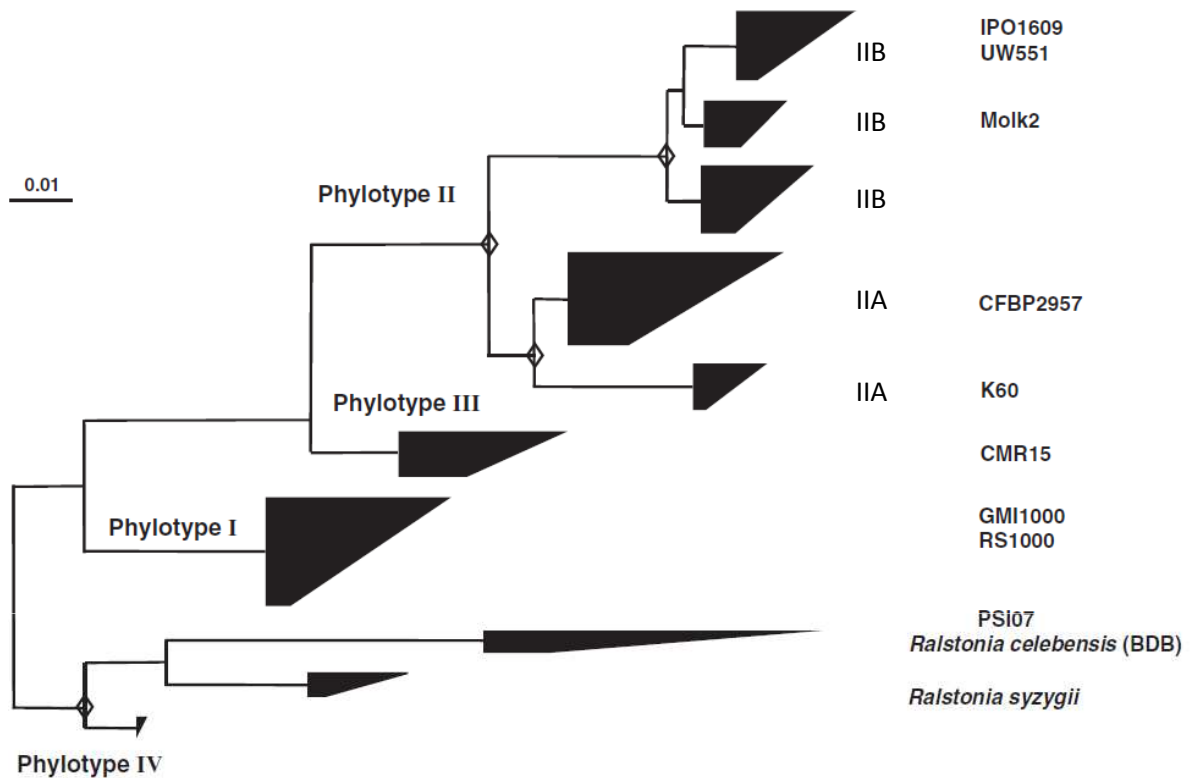


Figure 13. Phylogénie du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*. Phylogénie basée sur les séquences du gène *egl* codant pour l'endoglucanase de 771 souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*. La barre d'échelle représente une substitution nucléotidique pour 10 nucléotides. Le complexe d'espèces *R. solanacearum* est composé de 4 groupes principaux appelés phylotypes. Le phylotype II est divisé en deux sous-groupes principaux (IIA et IIB). Les noms de quelques souches séquencées et représentatives des phylotypes sont indiqués à droite de l'arbre (d'après Genin, 2010).

II. Une classification en complexe d'espèces, reflet de la diversité

Depuis 2005, la classification de *R. solanacearum* repose sur l'analyse des séquences de la région ITS (internal transcribed spacer) et des gènes *hrpB* (hypersensitive response and pathogenicity B) et *egl* (endoglucanase) (Fegan & Prior, 2005). De l'analyse de 140 souches isolées à travers le monde découle une classification en quatre phylotypes, qui corrént chacun avec une origine géographique : le phylotype I inclut essentiellement les souches d'origine asiatique, le phylotype II celles d'origine américaine, le phylotype III celles d'origine africaine, et enfin le phylotype IV regroupe les souches d'Indonésie, d'Australie et du Japon (Figure 13). Ce dernier phylotype comprend également *Ralstonia syzygii*, agent pathogène du giroflier, et les souches pathogènes du Bananier dites BDB (blood disease bacterium), très proches de *R. solanacearum*. Chaque phylotype peut être subdivisé en séquévars, sur la base de la séquence du gène *egl*.

Le nombre particulièrement important de données phylogénétiques concernant des souches du phylotype II a de plus permis de diviser ce phylotype en deux sous-groupes nommés IIA et IIB (Castillo & Greenberg, 2007 ; Cellier *et al.*, 2012), suggérant que de futurs affinements dans la phylogénie de *R. solanacearum* pourraient aussi avoir lieu au sein des autres phylotypes.

R. solanacearum présente une forte diversité en termes de génotypes, de phénotypes et de niches écologiques, conduisant à la définir comme un complexe d'espèces (Gillings *et al.*, 1993), soit un groupe de souches étroitement liées mais au sein duquel se retrouvent plusieurs espèces. Le complexe d'espèce *R. solanacearum* inclut ainsi *R. syzygii* et les souches BDB dans le phylotype IV (Taghavi *et al.*, 1996). L'utilisation d'une puce à ADN de la souche de référence GMI1000 appartenant au phylotype I, première souche de *R. solanacearum* séquencée (Salanoubat *et al.*, 2002), a révélé que les souches les plus éloignées de celle-ci présentent une hybridation de 68 % de leurs gènes (Guidot *et al.*, 2007), légèrement inférieure au seuil des 70 % classiquement admis pour définir une espèce.

Tableau 1. Tableau des souches de *Ralstonia solanacearum* séquencées et leurs caractéristiques (d'après Genin & Denny, 2012).

Souche	Origine	Isolé de	Phylotype (a)	État de la séquence	Taille du génome (kb)			CDS (b)	ET3s (d)	Référence
					Chromosome	Megaplasmide	Total			
GMI1000	Guyane française	Tomate	I (18)	complet	3 716	2 094	5 811	5 120	74	Salanoubat <i>et al.</i> , 2002
Y45	Chine	Tabac	I	ébauche	3 726	1 986	5 712	5 496	ND	Li <i>et al.</i> , 2011
FQY_4	Chine	ND	I	complet	3 715	2 090	5 805	5 153	ND	Cao <i>et al.</i> , 2013
K60	USA	Tomate	IIA (7)	ébauche	3 717	1 773	5 490	5 213	ND	Remenant <i>et al.</i> , 2012
CFBP2957	Antilles françaises	Tomate	IIA (36)	complet	3 539	2 114	5 683	5 310	72	Remenant <i>et al.</i> , 2010
IPO1609	Pays-Bas	Pomme de terre	IIB (1)	ébauche	ND	ND	5 313	4 546	60	Guidot <i>et al.</i> , 2009
UW551	Kenya	Geranium	IIB (1)	ébauche	ND	ND	5 895	4 371	58	Gabriel <i>et al.</i> , 2006
Molk2	Philippines	Bananier	IIB (3)	ébauche	ND	ND	5 961	5 061	75	Boucher, non publié
Po82	Mexique	Pomme de terre	IIB (4)	complet	3 481	1 949	5 430	5 019	75	Xu <i>et al.</i> , 2011
CMR15	Cameroun	Tomate	III (29)	complet	3 594	1 963	5 593	5 149	67	Remenant <i>et al.</i> , 2010
Psi07	Indonésie	Tomate	IV (10)	complet	3 508	2 085	5 606	5 247	74	Remenant <i>et al.</i> , 2010
BDB R229	Indonésie	Bananier	IV	ébauche	3 574	1 585	5 159	4 629	57	Remenant <i>et al.</i> , 2011
<i>R. solygyii</i> R24	Indonésie	Giroflier	IV	ébauche	3 681	1 743	5 424	4 867	48	Remenant <i>et al.</i> , 2011

(a) Le numéro entre parenthèses correspond au séquévar

(b) CDS : nombre de séquences codantes prédites

(c) ET3s : nombre d'effecteurs de type III prédits

Cette classification en quatre phylotypes a été remise en question très récemment. Sur la base du calcul d'un indice plus robuste, l'ANI (average nucleotide identity) (Remenant *et al.*, 2010 ; Remenant *et al.*, 2011), les auteurs suggèrent un remodelage en trois espèces distinctes : une comprenant les phylotypes I et III, une autre correspondant au phylotype II, et une dernière au phylotype IV. Cette étude repose cependant sur les seules huit souches séquencées à cette date, représentant les quatre phylotypes. Il est fort probable qu'avec l'augmentation à venir du nombre de souches séquencées, la classification au sein du complexe d'espèce *R. solanacearum* soit amenée à évoluer significativement.

III. Un génome bipartite d'une grande plasticité

Le génome de *R. solanacearum* est organisé en deux réplicons circulaires : un chromosome et un mégaplasme. Ce dernier est environ deux fois plus petit que le chromosome, mais a coévolué avec lui et porte plusieurs gènes de ménage (Salanoubat *et al.*, 2002 ; Coenye & Vandamme, 2003 ; Guidot *et al.*, 2007 ; Remenant *et al.*, 2010). Le génome est donc bipartite et le mégaplasme est techniquement plus proche d'un chromosome que d'un plasmide. Ces dix dernières années, 12 souches de *R. solanacearum* ont été séquencées, représentant les quatre phylotypes (Tableau 1). La grande majorité des gènes de ménage est portée par le chromosome tandis que le mégaplasme est particulièrement riche en îlots génomiques et en gènes spécifiques de certaines souches (Salanoubat *et al.*, 2002 ; Guidot *et al.*, 2007 ; Remenant *et al.*, 2010 ; Remenant *et al.*, 2011). Le mégaplasme porterait ainsi des gènes plutôt impliqués dans les modes de vie spécifiques des différentes souches, comme le suggère la variabilité importante de sa taille, comparé au chromosome (Genin & Denny, 2012). Cette hypothèse est soutenue par la présence sur le mégaplasme de la plupart des gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement et le pouvoir pathogène, assurant par exemple les sécrétions de type III et IV, la motilité flagellaire, la chimiotaxie et la production d'EPS.

Les événements de recombinaison contribuent fortement à l'évolution du génome de *R. solanacearum* (Wicker *et al.*, 2012). Les auteurs ont mis en évidence que les souches du phylotype I, qui présentent par ailleurs le spectre d'hôte le plus

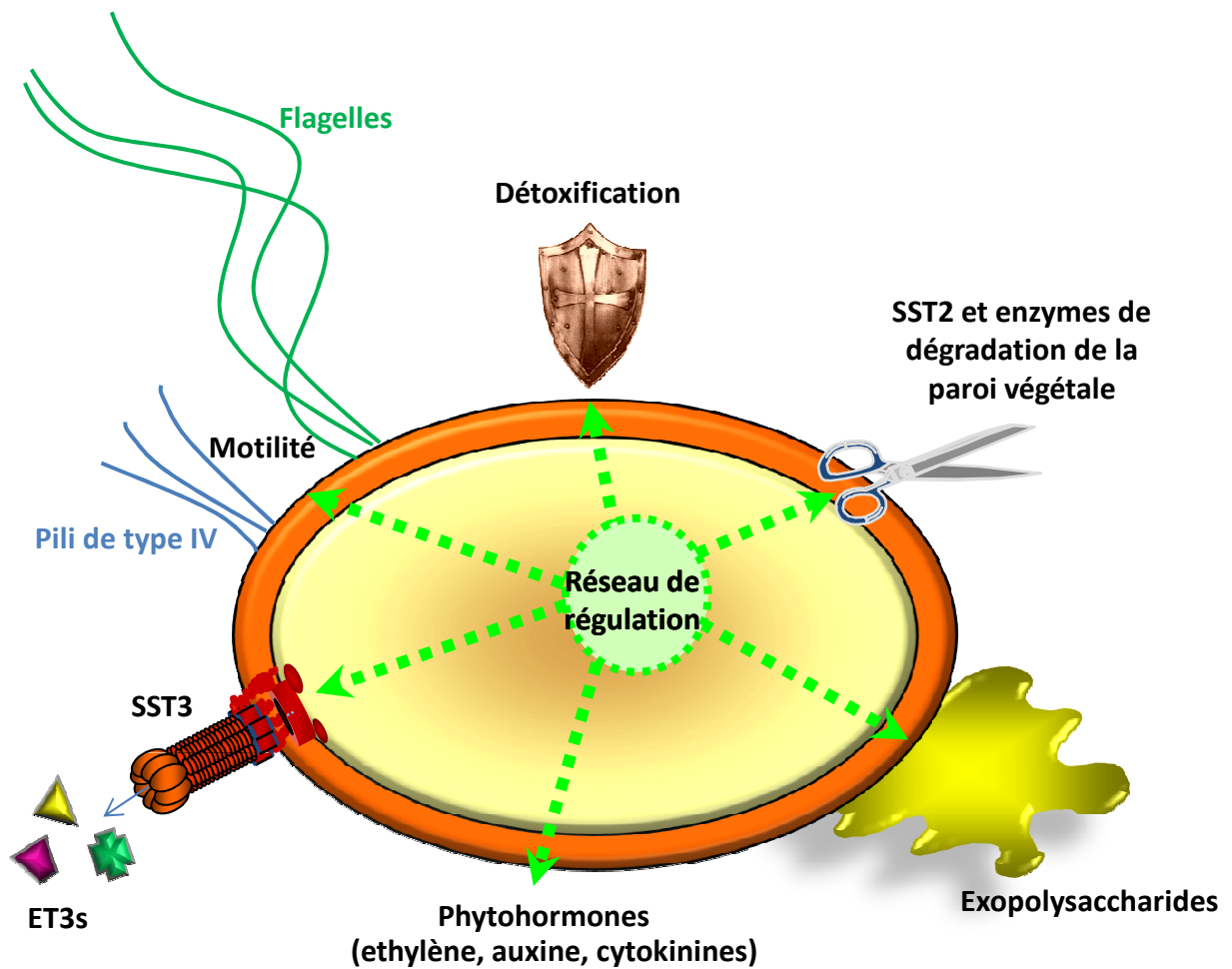


Figure 14. Schéma simplifié des principaux déterminants du pouvoir pathogène de *Ralstonia solanacearum*. L'injection des effecteurs de type III (ET3s) dans la cellule hôte via le système de sécrétion de type III et la production massive d'exopolysaccharides sont les déterminants majeurs du pouvoir pathogène de la bactérie. Celui-ci repose également sur la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi végétale via le système de sécrétion de type II (SST2), la motilité conférée par les flagelles et les pili de type IV, des mécanismes de détoxification ou encore la production d'hormones végétales.

large, sont les plus sujettes aux recombinaisons. Le phylotype IV apparaît quant à lui comme le principal donneur dans ces échanges génomiques. Les transferts horizontaux de gènes sont également un mécanisme important dans l'évolution génomique de *R. solanacearum* (Fall *et al.*, 2007 ; Coupat *et al.*, 2008 ; Guidot *et al.*, 2009 ; Remenant *et al.*, 2010). L'analyse de plusieurs souches a révélé la présence de nombreux îlots génomiques, souvent encadrés d'éléments mobiles comme des séquences d'insertions ou des bactériophages, signatures d'acquisitions de séquences génomiques par transfert horizontal (Remenant *et al.*, 2010 ; Remenant *et al.*, 2011 ; Remenant *et al.*, 2012). Une étude suggère que ces îlots génomiques aient été acquis par des souches ancestrales puis ont évolué au sein des différents phylotypes en étant transmis de manière verticale (Guidot *et al.*, 2007). Dans la souche de référence GMI1000, environ 13 % des gènes seraient d'origine étrangère (Fall *et al.*, 2007). L'aptitude de *R. solanacearum* à échanger du matériel génétique de manière horizontale a été démontrée en laboratoire : 80 % des souches sont naturellement compétentes et peuvent être transformées par des plasmides ou de l'ADN génomique, intégrant des fragments d'ADN jusqu'à 90 kb. Cette capacité est probablement un moteur important d'évolution et de diversité de pathogénie, comme le suggère le gain d'agressivité sur Tomate de certaines souches de *R. solanacearum* après un transfert d'ADN par transformation naturelle (Coupat-Goutaland *et al.*, 2011).

IV. Déterminants du pouvoir pathogène

R. solanacearum possède de nombreux déterminants qui participent à sa capacité à induire la maladie sur plante hôte (Figure 14). Le principal déterminant est le système de sécrétion de type III (SST3), permettant d'injecter de nombreux ET3s dans le cytoplasme de la cellule hôte (Poueymiro & Genin, 2009). Cette seringue moléculaire est codée par une vingtaine de gènes dont les délétions individuelles entraînent quasiment systématiquement une perte de virulence (Boucher *et al.*, 1985). Les principaux ET3s caractérisés chez *R. solanacearum* sont présentés dans la section VI de ce chapitre.

Hormis le SST3, les EPS de *R. solanacearum* représentent le facteur de pathogénie le plus important. Ces EPS, produits massivement *in planta*, sont

largement à l'origine de la perturbation du flux xylémien et sont nécessaires à une rapide colonisation systémique de la plante (Saile *et al.*, 1997 ; Denny, 2006). Des mutants de biosynthèse sont généralement incapables d'entraîner le flétrissement des plantes hôtes, même lors d'une inoculation directement dans la tige.

R. solanacearum possède également un système de sécrétion de type II (SST2) permettant l'export dans le milieu extracellulaire d'une trentaine de protéines parmi lesquelles des enzymes de dégradation de la paroi végétale (enzymes pectinolytiques et cellulolytiques). Un mutant dont le SST2 est non fonctionnel s'avère fortement impacté dans son pouvoir pathogène (Liu *et al.*, 2005).

La motilité de la bactérie est de même un élément important pour *R. solanacearum*. La défaillance des systèmes flagellaires et de chimiotaxie aboutit à une réduction de pathogénicité, excepté lorsque la bactérie est inoculée directement dans la tige, suggérant un rôle restreint aux étapes précoces de l'infection (Tans-Kersten *et al.*, 2001 ; Yao & Allen, 2006). A l'inverse, la motilité conférée par les pili de type IVa apparait impliquée aussi bien dans les étapes précoces que tardives de l'infection (Kang *et al.*, 2002). La sous-famille Flp des pili de type IVb, responsables de l'agrégation des bactéries, jouerait également un rôle dans le développement des symptômes (Wairuri *et al.*, 2012).

Le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* repose aussi sur son aptitude à se protéger de nombreux composés toxiques libérés par la plante. Ainsi est-elle capable de détoxifier les ROS à l'aide de plusieurs mécanismes redondants, exprimés *in planta* (Brown & Allen, 2004 ; Flores-Cruz & Allen, 2011). Le pouvoir pathogène est de même affecté pour les mutants des gènes *acrA* et *dimF*, codant vraisemblablement pour des pompes à efflux permettant l'expulsion de composés toxiques (Brown *et al.*, 2007). Bien que leurs fonctions n'aient pas été validées, des polyphénol oxydases cytoplasmiques pourraient participer à lutter contre les propriétés antimicrobiennes de composés phénoliques (Hernandez-Romero *et al.*, 2005).

La bactérie doit également s'adapter à des conditions environnementales défavorables rencontrées *in planta*. Une cytochrome oxydase, permettant la survie en conditions de carence en oxygène, est ainsi impliquée dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* (Colburn-Clifford & Allen, 2010). Le rôle des sidérophores

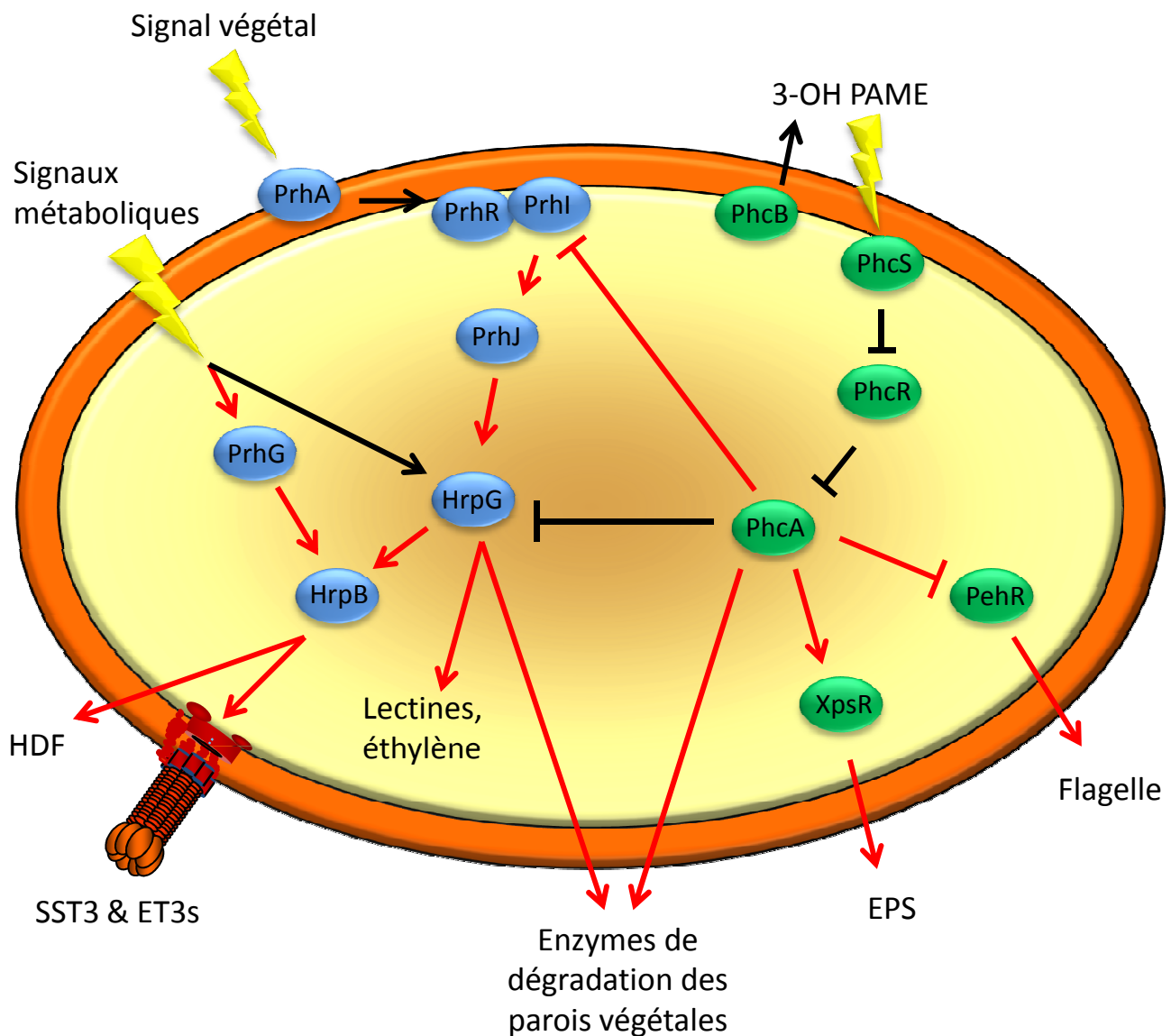


Figure 15. Schéma simplifié de la régulation des fonctions de virulence chez *Ralstonia solanacearum*. Les éclairs jaunes représentent les signaux captés par la bactérie. Les deux grandes voies de signalisation sont représentées en bleu et en vert. Les flèches et les barres en T indiquent respectivement les effets d'activation et d'inhibition, à un niveau transcriptionnel (rouge) ou post-traductionnel (noir). 3-OH PAME : acide 3-hydroxy palmitique ; HDF : Hrp-dependent factor ; SST3 : système de sécrétion de type III ; ET3s : effecteurs de type III ; EPS : exopolysaccharides (d'après Peeters *et al.*, 2013).

bactériens, chélateurs de fer, est reconnu dans les interactions plantes-microorganismes. *R. solanacearum* produit les deux sidérophores staphyloferrine B et micacocidine, cependant l'inactivation du premier ne semble pas impacter le pouvoir pathogène (Bhatt & Denny, 2004).

Certaines voies métaboliques paraissent impliquées spécifiquement *in planta*, comme le suggère la réduction de pathogénie d'un mutant affecté dans la biosynthèse de méthionine mais non auxotrophe (Gonzalez *et al.*, 2011).

Finalement, la synthèse de phytohormones pourrait participer au pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. La production d'éthylène et d'auxine est en effet régulée positivement par HrpG, un régulateur clé des fonctions de virulence. Un mutant de biosynthèse d'éthylène est néanmoins aussi virulent que la souche sauvage (Denny, 2006 ; Valls *et al.*, 2006). La mutation d'un gène contrôlant la biosynthèse de cytokinines a quant à elle un effet négatif sur le pouvoir pathogène (Denny, 2006).

V. Régulation des fonctions de virulence

L'ensemble des fonctions de virulence représentant un coût énergétique certain pour la bactérie, leur contrôle fait intervenir une régulation fine. *R. solanacearum* fournit un exemple relativement bien décrit de la sophistication de cette régulation. Cette régulation repose en partie sur deux grandes voies de contrôle de l'expression des gènes de virulence dont les protagonistes centraux sont respectivement PhcA (phenotypic conversion A), un régulateur transcriptionnel de la famille LysR, et HrpG, un régulateur à deux composants de type OmpR (Figure 15).

Le régulateur PhcA contrôle diverses fonctions de virulence. Son activation stimule la production d'EPS, *via* l'induction du régulateur transcriptionnel XpsR (Huang *et al.*, 1995). PhcA induit entre autres l'expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation des parois végétales et réprime de manière indirecte la motilité liée aux flagelles et aux pili de type IV (Kang *et al.*, 2002 ; Denny, 2006 ; Meng *et al.*, 2011).

L'activité de PhcA est elle-même contrôlée par un mécanisme dépendant de la densité cellulaire qui est unique à *R. solanacearum* (Genin & Denny, 2012). Ce

mécanisme fait intervenir la molécule 3-OH PAME (acide 3-hydroxy palmitique), synthétisée dans le milieu extracellulaire par PhcB (Flavier *et al.*, 1997) (Figure 15). En situation de faible densité cellulaire, l'activité de PhcA est réprimée par PhcR. En revanche, lorsque la densité cellulaire est élevée, la forte quantité de 3-OH PAME qui se retrouve dans le milieu extracellulaire a pour effet d'activer le système à deux composants PhcS/PhcR. PhcR est phosphorylé, avec pour conséquence la levée de la répression de PhcA (Clough *et al.*, 1997 ; Schell, 2000).

A l'instar de PhcA, la protéine HrpG régule aussi plusieurs facteurs de pathogénicité, putatifs ou avérés. HrpG active en particulier l'expression de HrpB, un régulateur de type AraC (Brito *et al.*, 1999), qui induit directement l'expression des gènes du SST3 (Genin *et al.*, 1992 ; Cunnac *et al.*, 2004a). HrpB se lie probablement à une boîte dite *hrpII* présente au niveau du promoteur de ses cibles (Cunnac *et al.*, 2004b). Parmi les autres éléments régulés positivement par HrpG se trouvent des facteurs d'adhésion (lectines), une catalase, des enzymes de biosynthèse de l'éthylène et de la méthionine, ou encore des enzymes de dégradation des parois végétales (Valls *et al.*, 2006 ; Plener *et al.*, 2012). D'autres facteurs sont aussi induits *via* HrpB, comme le 3-hydroxy-oxindole ou HDF (*hrpB*-dependent diffusible factor), potentiellement impliqué dans la compétition avec d'autres bactéries lors des phases précoces de l'infection (Occhialini *et al.*, 2005 ; Delaspre *et al.*, 2007). A l'opposé, HrpG inhibe indirectement la production d'EPS.

L'activation de HrpG dépend de la perception par PrhA d'un signal provenant de la paroi végétale (Aldon *et al.*, 2000). Le signal est transduit jusqu'à HrpG *via* les protéines membranaires PrhR et PrhI et le régulateur transcriptionnel PrhJ. D'autre part, il semble que l'activité de HrpG puisse être aussi modulée par divers signaux métaboliques (Genin *et al.*, 2005 ; Yoshimochi *et al.*, 2009b).

Les deux grandes voies de signalisation impliquant PhcA et HrpG ne sont pas indépendantes. PhcA aurait la capacité d'inhiber la voie dépendante de HrpG. En effet, PhcA montre une activité de répression des gènes du SST3, dépendante de HrpG (Genin *et al.*, 2005) (Figure 15). De plus, PhcA peut se fixer au promoteur du gène *prhI* et affecter son expression (Yoshimochi *et al.*, 2009a).

L'ensemble de ces résultats ont amené à considérer l'infection par *R. solanacearum* comme étant décomposée en deux étapes. Lors de la phase

précoce, HrpG est activé suite à la perception du signal issu de la plante et PhcA est réprimé en réponse à une faible densité cellulaire : le SST3 et la motilité sont activés. Lors de la phase tardive de l'infection, une forte densité cellulaire due à la multiplication des bactéries dans les vaisseaux xylémiens aboutit à l'activation de PhcA et la répression de HrpG : SST3 et motilité sont réprimés alors que la production d'EPS est induite.

Cependant, les observations de l'activité de répression de PhcA sur la voie impliquant HrpG ont été réalisées en milieu riche. De récentes données indiquent que la réalité *in planta* semble bien plus complexe. Différentes analyses transcriptomiques *in planta* suggèrent en effet que *hrpB* et des gènes codant pour des ET3s sont fortement induits dans le xylème (Jacobs *et al.*, 2012 ; Monteiro *et al.*, 2012a ; Monteiro *et al.*, 2012b). La compréhension de la régulation des fonctions de virulence et d'adaptation à l'environnement rencontré dans la plante reste donc une question largement ouverte. Ce que souligne la récente identification de PrhG, un paralogue de HrpG qui active aussi l'expression de *hrpB* dans certaines conditions de culture mais pas en réponse à des cellules végétales (Plener *et al.*, 2010).

VI. Les ET3s, d'importants déterminants du pouvoir pathogène

VI.1. *R. solanacearum* : un large répertoire d'ET3s

Ces dix dernières années, l'identification et la caractérisation fonctionnelle des ET3s a été au cœur des recherches sur les bactéries phytopathogènes. L'identification des répertoires d'ET3s a fait appel à plusieurs approches basées sur les homologies avec des ET3s déjà identifiés, sur la régulation transcriptionnelle, sur diverses caractéristiques telle que la présence de motifs eucaryotes, ou encore sur la sécrétion effective de ces ET3s candidats par le SST3. Il en résulte aujourd'hui une estimation d'environ 110 ET3s (Genin & Denny, 2012), qui pourraient être définis comme le pan-effectome du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Les souches GMI1000 et RS1000, appartenant au phylotype I, ont fait particulièrement l'objet de

travaux d'identification des ET3s, portant le répertoire de la souche GMI1000 à plus de 70 ET3s (Poueymiro & Genin, 2009 ; Mukahiara *et al.*, 2010). D'une manière générale, chaque souche séquencée semble posséder entre 60 et 75 ET3s, à l'exception des 48 ET3s potentiels de *R. syzygii*, ce qui représente un large répertoire en comparaison des 30 à 40 ET3s de *P. syringae* ou *Xanthomonas* spp. Il est remarquable qu'une cinquantaine de ces ET3s soient conservés chez des souches représentatives des quatre phylotypes, suggérant que l'ancêtre commun arborait déjà un large répertoire d'ET3s (Genin & Denny, 2012). Il semble que *R. solanacearum* ait intégré de nombreux ET3s par transferts horizontaux comme l'illustrent les homologues de TALs de *Xanthomonas* spp. ou d'AvrPtoB de *P. syringae* (Fall *et al.*, 2007 ; Poueymiro & Genin, 2009). Une autre caractéristique du répertoire d'ET3s de *R. solanacearum* réside dans l'existence de plusieurs familles d'ET3s, issues d'événements de duplication. Ces familles, au nombre de cinq, comprennent chacune de trois à sept membres et sont généralement conservées parmi les souches de *R. solanacearum* (Poueymiro & Genin, 2009 ; Mukaihara *et al.*, 2010 ; Remigi *et al.*, 2011 ; Sole *et al.*, 2012).

VI.2. ET3s caractérisés chez la souche GMI1000

Quelques ET3s ont été caractérisés chez la souche de référence GMI1000. Les paragraphes qui suivent présentent les ET3s caractérisés dont il sera question dans ce manuscrit.

L'ET3 le mieux caractérisé est certainement PopP2. Cette protéine appartient à la superfamille YopJ (*Yersinia* outer protein J), dont les membres sont distribués largement chez les bactéries pathogènes de plantes et d'animaux (Lewis *et al.*, 2011). PopP2 arbore un signal d'adressage au noyau fonctionnel et une triade catalytique requise pour son activité acétyltransférase (Deslandes *et al.*, 2003 ; Tasset *et al.*, 2010). PopP2 est un facteur d'virulence : chez l'écotype Nd-1 d'*A. thaliana*, l'ET3 est reconnu par RRS1-R, une protéine de résistance de type NLR. L'expression de PopP2 *in planta* conduit à la relocalisation de RRS1-R dans le noyau, où les deux protéines interagissent (Tasset *et al.*, 2010). Cependant, la résistance induite par RRS1-R nécessite un troisième protagoniste : RD19 (responsive to rehydratation 19). A l'instar de RRS1-R, cette cystéine protéase est

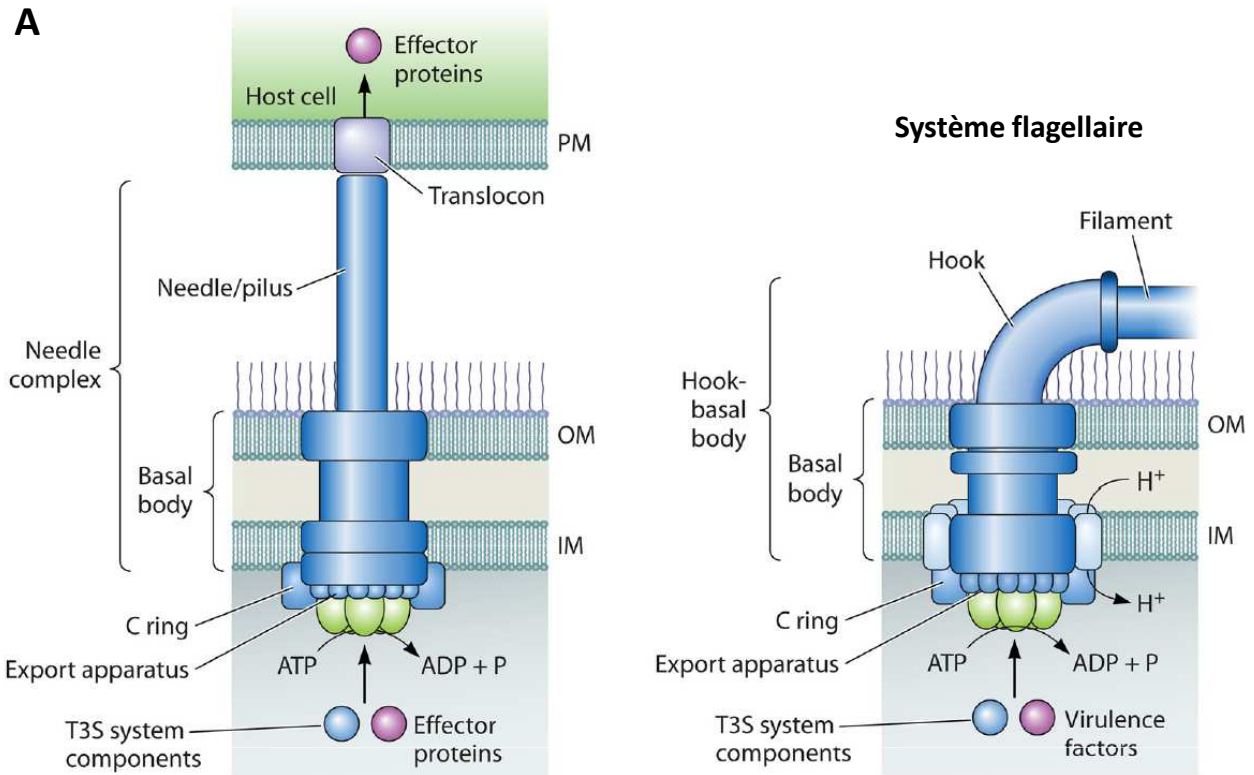
relocalisée dans le noyau en présence de PopP2 et interagit avec lui (Bernoux *et al.*, 2008). De manière intéressante, PopP2 est capable de s'autoacétyler et son activité acétyltransférase est requise pour sa fonction d'avirulence (Tasset *et al.*, 2010). Il est ainsi probable que son acétylation ou celle de protéines végétales cibles élicite la résistance médiée par RRS1-R.

Un rôle de facteur d'avirulence a également été démontré pour deux autres ET3s : PopP1, appartenant aussi à la superfamille YopJ, et AvrA. Ces deux ET3s sont collectivement responsables d'une HR induite par la souche GMI1000 sur trois espèces de Tabac (Poueymiro *et al.*, 2009). Seule la mutation des deux gènes *popP1* et *avrA* permet l'abolition de la HR et le développement des symptômes de maladie. Cependant, le rôle de ces deux ET3s diffère selon l'espèce inoculée : AvrA apparaît comme le principal déterminant reconnu par *Nicotiana tabacum* et *N. benthamiana*, alors que PopP1 est l'éliciteur principal de la HR sur *N. glutinosa* (Poueymiro *et al.*, 2009). PopP1 se comporte également comme un facteur d'avirulence sur l'écotype St40 de *Petunia hybrida*, induisant une réponse de défense de type HR (Lavie *et al.*, 2002).

Certains ET3s ont été caractérisés comme facteurs de virulence. C'est le cas d'AvrA et GALA7 sur la plante hôte *M. truncatula*. Ces ET3s se révèlent tous deux importants pour la pénétration dans les racines, GALA7 étant strictement requis (Angot *et al.*, 2006 ; Turner *et al.*, 2009). En revanche, lorsque les étapes précoces de l'infection sont facilitées par des racines coupées, seul GALA7 s'avère important pour le pouvoir pathogène, indiquant également un rôle de cet ET3 dans les étapes tardives de l'infection.

L'ET3 GALA7 exhibe des caractéristiques eucaryotes, par la présence de domaines LRR et F-box, et appartient à une famille d'ET3s comptant sept membres dans la souche GMI1000 (GALA1-7). Ces ET3s sont collectivement importants pour le pouvoir pathogène sur Tomate et *A. thaliana*, bien que certaines redondances existent de manière hôte-spécifique (Angot *et al.*, 2006 ; Remigi *et al.*, 2011). Il est probable que les protéines GALA jouent sur la stabilité des protéines de l'hôte en manipulant le système ubiquitine-protéasome (Angot *et al.*, 2007).

Système de sécrétion de type III



B

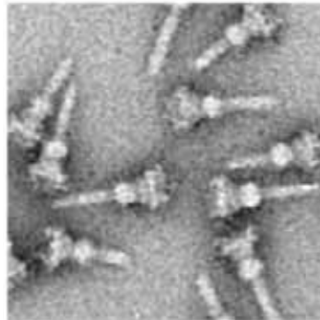


Figure 16. Schéma global de la structure du système de sécrétion de type III.

A) Comparaison des structures du système de sécrétion de type III (SST3 ; à gauche) et du système flagellaire (partie droite). Le SST3 de translocation et le système flagellaire ont en commun huit protéines conservées, constitutives du corps basal de chaque système. Les parties extracellulaires diffèrent nettement puisque le système flagellaire comporte un filament relié au corps basal par un crochet (Büttner, 2012). B) Observation du SST3 de *Salmonella* spp. en microscopie électronique (Schraidt *et al.*, 2010).

PM : plasma membrane ; OM : outer membrane ; IM : inner membrane.

CHAPITRE III

LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III : STRUCTURE COMPLEXE ET REGULATION FINE

I. Le SST3 : fonction, origine et nomenclature

I.1. Généralités

Chez les bactéries pathogènes, les SST3 sont de complexes nanoseringues qui permettent l'injection d'ET3s dans le cytoplasme des cellules hôtes. Ces appareils de sécrétion sont composés d'un corps basal, traversant successivement la membrane interne, le périplasme et la membrane externe de la bactérie. Cette partie basale est prolongée dans le milieu extracellulaire par un pilus par lequel transitent les ET3s sécrétés. Enfin, l'injection (ou translocation) de ces ET3s dans la cellule de l'hôte nécessite un dernier élément appelé translocon, qui s'insère dans la membrane plasmique eucaryote (Figure 16).

Le terme SST3 est classiquement employé pour désigner ce système d'injection des ET3s. Une plus grande rigueur obligerait cependant à spécifier SST3 « de translocation ». En effet, le terme SST3 fait aussi théoriquement référence au système flagellaire qui assure la motilité de la bactérie. Le SST3 de translocation, que l'on continuera à appeler simplement SST3 dans ce manuscrit pour plus de simplicité, et le système flagellaire ont en commun huit protéines conservées, constitutives du corps basal de chaque système (Figure 16). Les parties extracellulaires diffèrent nettement puisque le système flagellaire comporte un filament relié au corps basal par un crochet.

Chez les bactéries phytopathogènes, les protéines des SST3 sont codées par des gènes réunis au sein de clusters dits *hrp*, îlots de pathogénicité composés d'environ 25 gènes. Ces clusters *hrp* sont généralement localisés sur le chromosome bactérien. *R. solanacearum* fait figure d'exception puisque le cluster *hrp* est localisé sur le mégaplasmide et ne présente pas d'éléments caractéristiques des îlots de pathogénicité. Le contenu en bases GC est en effet similaire à celui du « core genome » et aucun élément mobile ne paraît être associé au cluster *hrp*, suggérant une coévolution avec le reste du génome bactérien (Genin & Boucher, 2004).

De manière intéressante, il apparaît que certaines souches de bactéries phytopathogènes possèdent plusieurs clusters codant pour des SST3. Les fonctions de ces clusters additionnels sont généralement mal connues. Citons l'exemple de souches d'*Erwinia amylovora* qui arborent, outre un SST3 impliqué dans les interactions avec les plantes, deux autres clusters présentant de fortes homologies avec des clusters connus chez un endosymbionte d'insectes, *Sodalis glossinidius*, et chez la bactérie pathogène d'animaux *Yersinia enterocolitica* (Triplett *et al.*, 2006). La délétion de ces clusters n'engendrant pas de diminution du pouvoir pathogène sur plantes hôtes, il a été suggéré un rôle dans l'interaction avec d'autres organismes, notamment les insectes (Zhao *et al.*, 2009). Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par le rôle connu que jouent les insectes dans la dissémination d'*E. amylovora*.

Le SST3 occupe bien souvent une place primordiale dans les interactions pathogènes mais son importance ne s'y cantonne pas. Sa contribution a ainsi été démontrée lors d'interactions symbiotiques entre les bactéries du genre *Rhizobium* et certaines espèces végétales de la famille des *Fabaceae* (Viprey *et al.*, 1998 ; Fauvart *et al.*, 2009). En outre, des clusters de gènes codant pour des SST3 ont été identifiés chez plusieurs bactéries impliquées dans d'autres types de symbiose, tel que le symbionte d'insectes *Sodalis glossinidius* (Dale *et al.*, 2001), ainsi que chez des bactéries non pathogènes comme *Pseudomonas fluorescens* (Preston *et al.*, 2001). Les rôles des SST3 dans ces interactions demeurent peu connus.

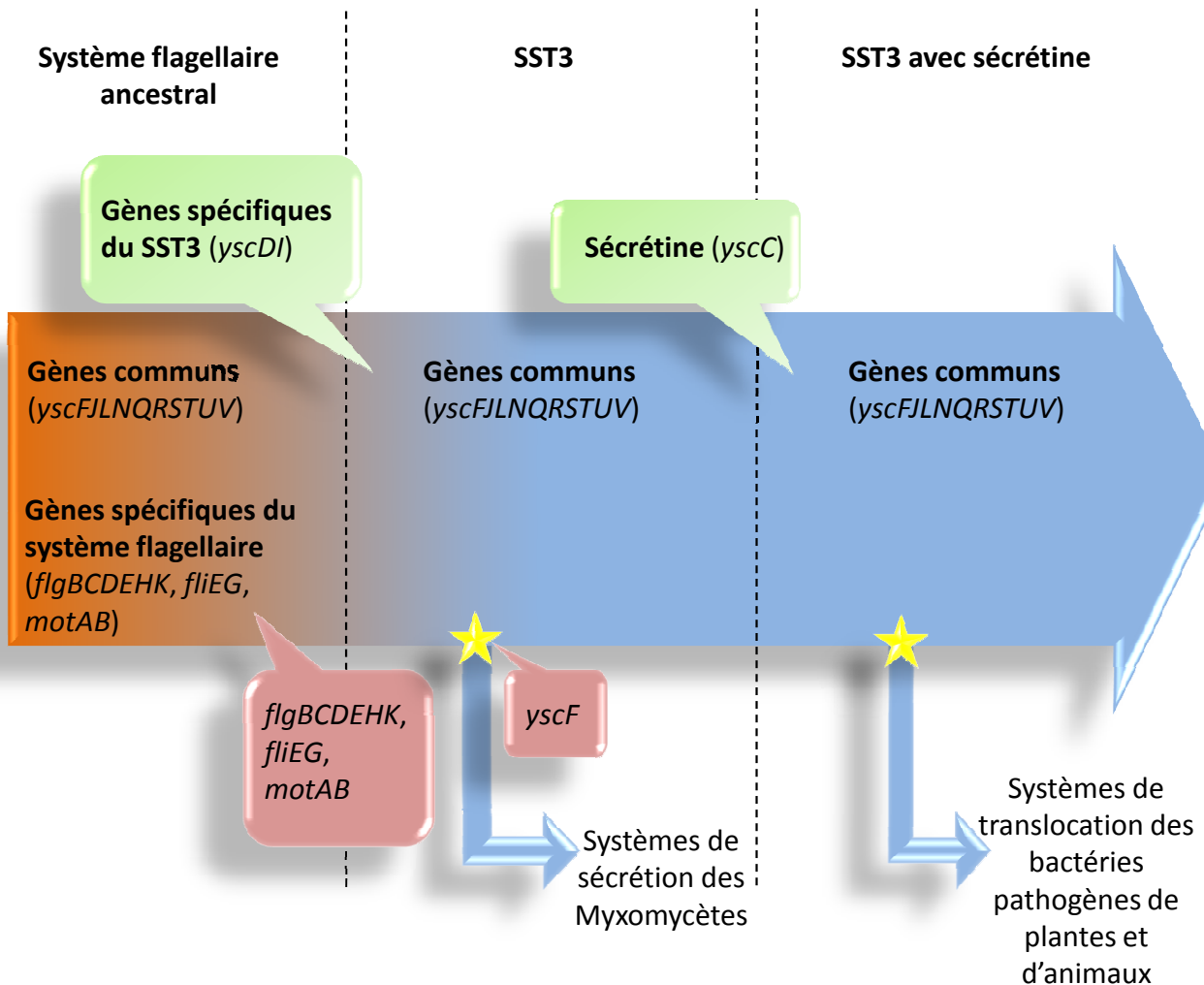


Figure 17. Modèle de l'évolution du système de sécrétion de type III à partir d'un système flagellaire ancestral. Les gènes communs au système flagellaire et au SST3 auraient été présents dans le système flagellaire ancestral. La perte de gènes spécifiques au système flagellaire aurait abouti à la perte de la fonction de motilité, sans pour autant supprimer la fonction de sécrétion. L'ancêtre du SST3 aurait évolué à travers une série de pertes et de gains de gènes, en se diversifiant. La lignée des systèmes de sécrétion des Myxomycètes aurait dérivé rapidement *via* la perte de plusieurs gènes, notamment *yscF*. L'acquisition de certains gènes, dont le gène codant pour la sécrétine, aurait permis l'apparition d'un système de translocation ancestral dépendant du contact avec la cellule hôte, et de manière concomitante de l'aptitude à interférer avec les fonctions cellulaires de l'hôte en injectant des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule eucaryote. Les flèches symbolisent les processus évolutifs dans le temps. Les acquisitions et pertes de gènes sont respectivement représentées par les bulles vertes et roses, et par les étoiles jaunes lorsque ces événements sont spécifiques d'un groupe d'organismes. La nomenclature des gènes du SST3 se réfère au système de *Yersinia* spp. (d'après Abby & Rocha, 2012).

I.2. Origine et évolution des SST3s

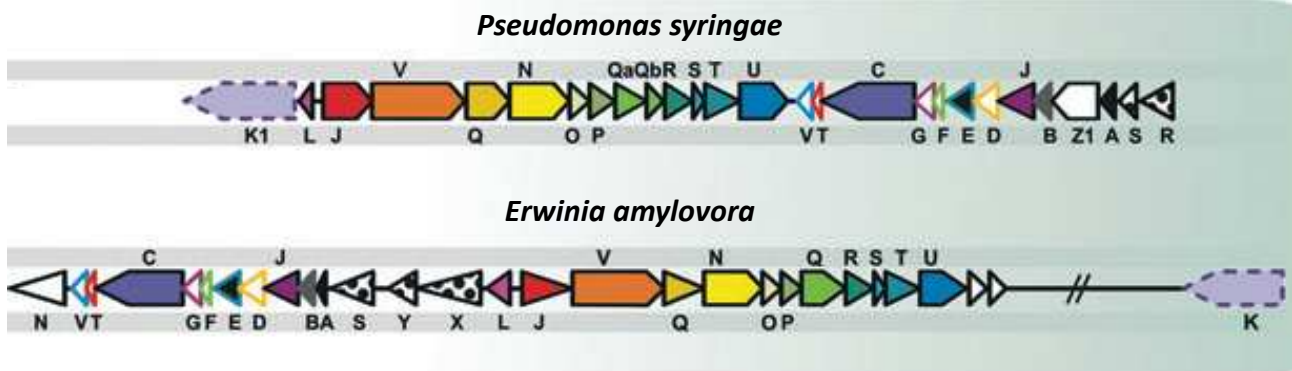
Le SST3 et le système flagellaire forment deux groupes monophylétiques. Jusqu'à très récemment il était suggéré qu'ils aient évolué indépendamment à partir d'un ancêtre commun (soit un système de sécrétion beaucoup d'une complexité moindre), subissant chacun par la suite un certain degré de diversification (Gophna *et al.*, 2003 ; Rohmer *et al.*, 2004). Une étude parue en 2012, basée sur l'analyse de plus de 200 SST3 et 350 systèmes flagellaires présents chez un large panel de phylum bactériens, suggère cependant que l'ancêtre commun du SST3 et du système flagellaire pourrait être une structure déjà impliquée dans le transport des composants du flagelle à travers les membranes bactériennes (Abby & Rocha, 2012) (Figure 17). Ce système de sécrétion aurait évolué en de multiples occasions pour permettre la sécrétion d'autres protéines bactériennes, acquérant ainsi une nouvelle fonction, processus évolutif connu sous le nom d'exaptation. Le SST3 serait finalement le résultat d'une de ces exaptations, suivie par une adaptation à sa nouvelle fonction *via* l'acquisition et la perte de gènes. Le système flagellaire est probablement très ancien et son apparition remonterait à une période antérieure à la diversification des bactéries en plusieurs lignées telles que nous les connaissons aujourd'hui (Pallen *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2007).

Contrairement au système flagellaire qui semble être transmis de manière verticale, de nombreux éléments suggèrent que les transferts horizontaux sont largement impliqués dans la transmission et l'évolution des SST3. Les clusters de gènes codant pour les SST3 sont en effet souvent localisés au niveau d'îlots génomiques, présentant entre autres un pourcentage en bases GC différent du reste du génome, un usage de codons alternatifs ou encore divers éléments transposables. Le transfert horizontal *in planta* d'îlots génomiques contenant des facteurs de pathogénie a été démontré, notamment par simple transformation chez *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Lovell *et al.*, 2009).

I.3. Nomenclature des SST3s

En 1996 a été proposée une nouvelle nomenclature unifiée pour les gènes des clusters codant les SST3 des différentes bactéries phytopathogènes étudiées (Bogdanove *et al.*, 1996). Cette nomenclature avait pour volonté de faire apparaître

Groupe Hrp1



Groupe Hrp2

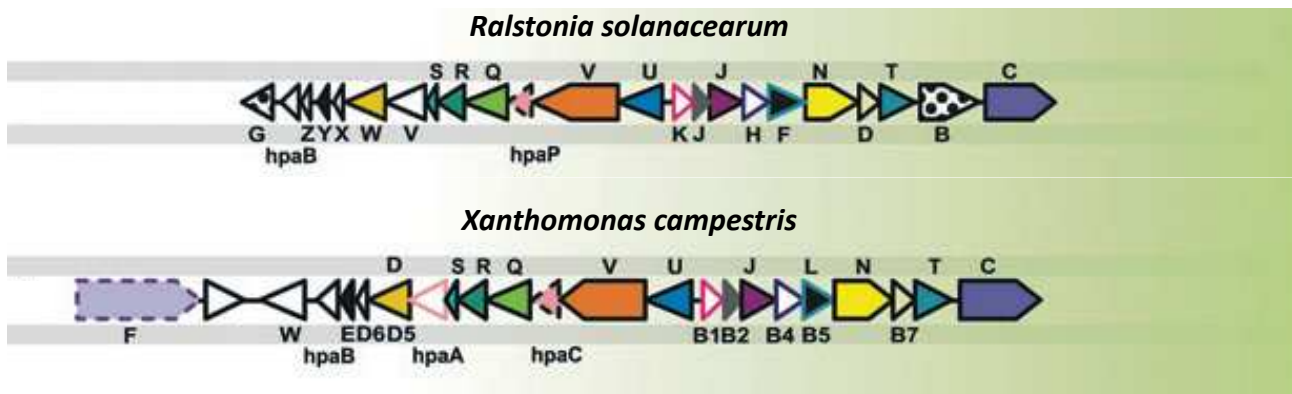


Figure 18. Représentation schématique de l'organisation génomique des clusters de gènes codant pour les système de sécrétion de type III des groupes Hrp1 et Hrp2 des bactéries phytopathogènes. Les bactéries *Pseudomonas syringae* et *Erwinia amylovora* possèdent un système de sécrétion de type III (SST3) appartenant au groupe 1 (Hrp1) alors que les SST3s des bactéries *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris* font partie du groupe 2 (Hrp2). Chaque flèche pleine correspond à un gène. Les gènes homologues sont colorés de la même manière. Les lettres situées au-dessus et au-dessous des clusters correspondent respectivement aux gène *hrc* et *hrp* (d'après Tampakaki et al., 2010).

le degré de conservation entre les gènes, les différents types de fonctions occupées par les produits de ces gènes, et les différences en terme d'impact sur le phénotype pour les mutants correspondants. Les gènes autrefois tous nommés *hrp* ont ainsi été divisés en trois classes. La première d'entre elles inclut neuf gènes codant pour des protéines conservées parmi les divers pathogènes d'animaux et de plantes, codant pour des éléments structuraux du SST3. Sur ces neuf gènes, huit sont également conservés dans le système flagellaire. Ces gènes ont été renommés *hrc* (*hrp* conserved), suivi d'une lettre attribuée sur la base de la nomenclature en vigueur pour les homologues *ysc* (*Yersinia* secretion) chez *Yersinia* spp. La deuxième classe comprend les gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels. Enfin, la troisième classe englobe d'autres gènes codant pour des composants du SST3 ainsi que pour des protéines impliquées dans le contrôle de la sécrétion de type III.

Les clusters *hrp* des bactéries phytopathogènes sont classés en deux familles tenant compte de l'organisation génétique, du niveau d'homologie des protéines codées et du système de régulation transcriptionnelle (Alfano & Collmer, 1997) (Figure 18). La famille dite Hrp1 comprend notamment les bactéries pathogènes modèles *P. syringae* et *E. amylovora*, alors que la famille Hrp2 inclut en particulier *R. solanacearum* et le genre *Xanthomonas*. Le mode de régulation transcriptionnelle du SST3 a déjà été présenté dans le chapitre II concernant *R. solanacearum* et ne sera pas traité ici (pour revue englobant les groupes Hrp1 et Hrp2, se référer à Tang *et al.* (2006) et Tampakaki *et al.* (2010)). Notons tout de même qu'une des caractéristiques commune aux deux systèmes de régulation transcriptionnelle est la présence de motifs conservés au niveau des promoteurs des gènes régulés, qu'ils soient des gènes du cluster *hrp* ou codant pour des ET3s. Les gènes des clusters de la famille Hrp1 possèdent un motif dit boîte *hrp* (GGAACC-N15/16-CCACNNA). Ceux des clusters *hrp* chez *R. solanacearum* et *X. campestris*, de la famille Hrp2, présentent respectivement des motifs dits boîte *hrpII* (TTCG-N16-TTCG) et boîte PIP (plant inducible promoter, TTCGC-N15-TTCGC).

II. Architecture du SST3

Très peu de données existent dans la littérature quant à la structure du T3SS pour les bactéries phytopathogènes. En revanche, de nombreux travaux ont été

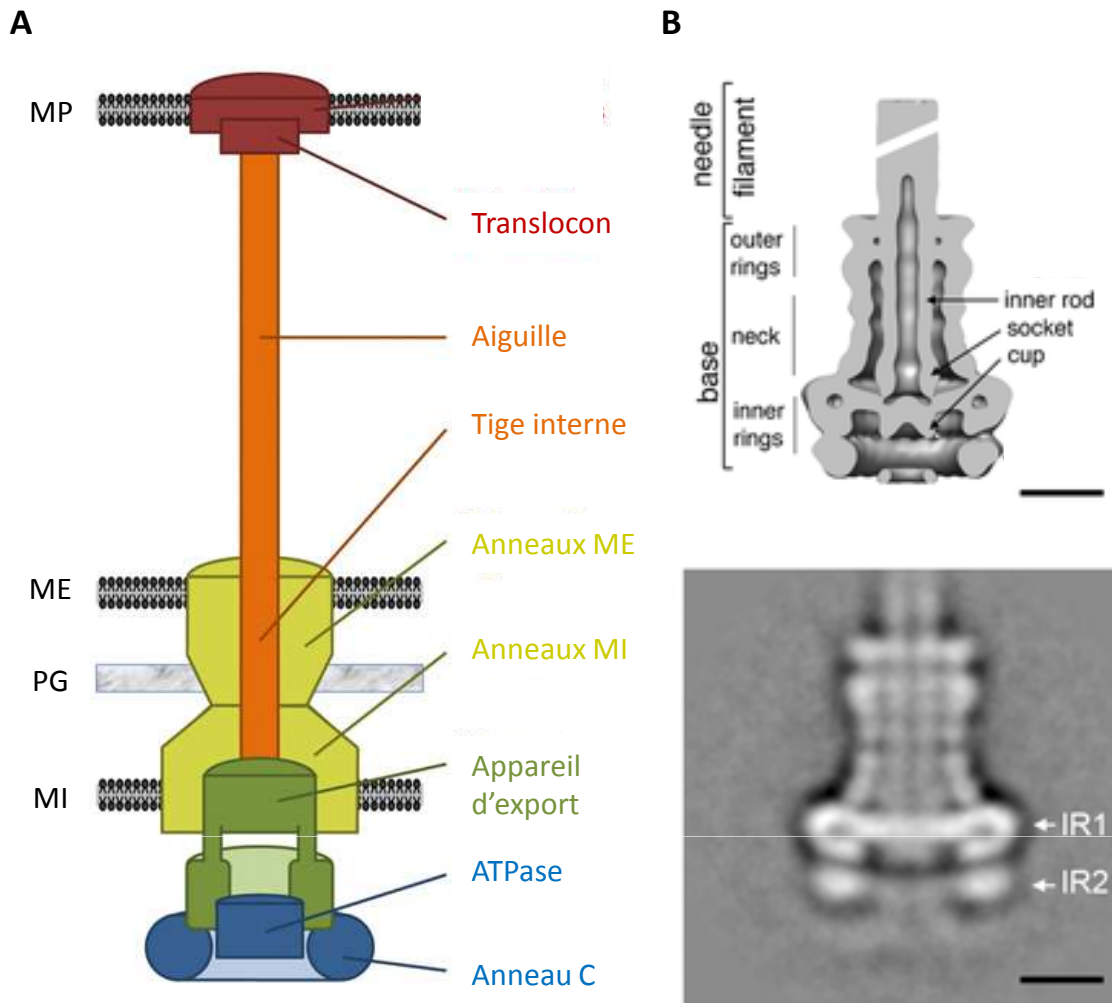


Figure 19. Représentation schématique des différents composants du système de sécrétion de type III. A) Le SST3 est composé d'un corps basal traversant les membranes bactériennes et d'une partie extracellulaire. Le corps basal est divisé en plusieurs éléments : des structures en anneaux au niveau des membranes interne (MI) et externe (ME), une tige interne périplasmique, un appareil d'export tourné vers le cytoplasme bactérien et des composants cytoplasmiques (ATPase et anneau C). La partie extracellulaire comprend quant à elle une aiguille (ou pilus chez les bactéries phytopathogènes) et un translocon qui s'insère dans la membrane plasmique eucaryote (MP). PG : peptidoglycanes (d'après Diepold *et al.*, 2012). B) Observation de la partie basale du SST3 de *Salmonella* spp. en cryo-microscopie électronique (image du haut) et coupe d'une reconstruction tridimensionnelle (image du bas). Les barres correspondent à 10 nm. IR : anneau de la membrane interne (d'après Schraidt *et al.*, 2010).

réalisés concernant les bactéries pathogènes d'animaux, reposant essentiellement sur des techniques de microscopie électronique, de cristallographie et d'interactions protéine-protéine, qui permettent aujourd'hui d'avoir une vision relativement précise de l'organisation structurale du SST3. Etant donné le niveau de conservation des composants du SST3, du moins pour le corps basal, entre bactéries pathogènes d'animaux et de plantes, il est fort probable que la majorité des connaissances issues de l'étude des premières puissent être appliquées aux secondes. Les paragraphes qui suivent sont donc essentiellement basés sur des données relatives aux bactéries pathogènes d'animaux. Les bactéries modèles les plus étudiées comprennent *Yersinia* spp. (SST3 Ysc), *Shigella* spp. et *Salmonella* spp. (SST3 Inv-Mxi-Spa) et les souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes (SST3 Ssa-Esc). Pour plus de simplicité, les familles de protéines évoquées seront dénommées selon la nomenclature utilisée chez *Yersinia* spp.

Le SST3 est composé d'un corps basal traversant les membranes bactériennes et d'une partie extracellulaire (Figure 19, Tableau 2). Le corps basal est divisé en plusieurs éléments : des structures en anneaux au niveau des membranes interne et externe, une tige périplasmique, un appareil d'export tourné vers le cytoplasme bactérien et quelques composants cytoplasmiques. La partie extracellulaire comprend quant à elle une aiguille (ou pilus) et un translocon qui s'insère dans la membrane eucaryote. Ces divers éléments structuraux du SST3 sont décrits ci-après, en débutant par la partie cytoplasmique pour terminer par la partie extracellulaire la plus distale.

II.1. Le corps basal du SST3

II.1.1. Les composants cytoplasmiques

Les composants cytoplasmiques du SST3 comprennent une ATPase et ses régulateurs, ainsi qu'une structure appelée anneau C. Plusieurs interactions ont été identifiées entre ces éléments ainsi qu'avec des composants du SST3 insérés dans la membrane interne (Jackson & Plano, 2000 ; Morita-Ishihara *et al.*, 2006 ; Lorenz & Büttner, 2009 ; Biemans-Oldenhinkel *et al.*, 2011 ; Lorenz *et al.*, 2012). L'ATPase, de la famille YscN, forme une structure hexamérique en anneau. Elle fournit probablement l'énergie nécessaire à la sécrétion des substrats du SST3 (Pozidis *et*

Tableau 2. Liste des protéines constituant le système de sécrétion de type III de bactéries pathogènes de plantes et d'animaux

Bactérie pathogène d'animaux	Bactéries pathogènes de plantes				Fonctions prédites
	SST3 Hrp1		SST3 Hrp2		
<i>Yersinia spp.</i>	<i>P. syringae</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>Xanthomonas spp.</i>	<i>R. solanacearum</i>	
Composants cytoplasmiques					
YscN	HrcN	HrcN	HrcN	HrcN	ATPase ; source d'énergie pour la sécrétion ; dissociation des complexes ET3-CT3
YscK + YscL	HrpE + HrpD	HrpE + HrpD	HrcL	HrpF	Régulateur de l'ATPase
YscQ	HrcQ _A + HrcQ _B	HrcQ	HrcQ	HrcQ	Anneau C ; site d'accueil de substrats du SST3
Appareil d'export					
YscR	HrcR	HrcR	HrcR	HrcR	
YscS	HrcS	HrcS	HrcS	HrcS	
YscT	HrcT	HrcT	HrcT	HrcT	
YscU	HrcU	HrcU	HrcU	HrcU	Site d'accueil de substrats du SST3 ; transition de spécificité de substrat
YscV	HrcV	HrcV	HrcV	HrcV	Site d'accueil de substrats du SST3
Anneaux de la membrane interne					
YscD	HrpQ	HrpQ	HrcD	HrpW	
YscJ	HrcJ	HrcJ	HrcJ	HrcJ	
Anneaux de la membrane externe					
YscC	HrcC	HrcC	HrcC	HrcC	Sécrétine
YscW	-	-	-	-	Pilotine
Tige périplasmique					
YscI	HrpB	HrpB	HrpB2	HrpJ	Ancrage de la seringue/pilus ; transition de spécificité de substrat
Composants extracellulaires					
YscF	HrpA	HrpA	HrpE	HrpY	Aiguille/pilus
LcrV	-	-	-	-	Plateforme d'assemblage du translocon
YopB + YopD	HrpK1	HrpK	HrpF	PopF1 + PopF2	Translocon
-	HrpZ1 + HrpW1 + HopAK1	HrpN + HrpW	XopA ¹	PopA + PopW	Harpines
Protéines T3S4					
YscP	HrpP	HrpP	HpaC	HpaP	Contrôle de la longueur de la seringue ; transition de spécificité de substrat

Les protéines homologues ou de fonctions similaires sont indiquées sur la même ligne. SST3 : système de sécrétion de type III ; ET3 : effecteur de type III ; CT3 : chaperonne de type III.

¹ La fonction de XopA n'est pas clairement définie, entre harpine et protéine du translocon.

al., 2003 ; Andrade *et al.*, 2007 ; Zarivach *et al.*, 2007). Une source alternative d'énergie a cependant été identifiée chez *Yersinia* spp. : la force proton-motrice, qui repose sur la différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane (Wilharm *et al.*, 2004 ; Ohgita *et al.*, 2013). La force proton-motrice ne semble en revanche pas impliquée dans la sécrétion de type III chez la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Lorenz & Büttner, 2009). Un rôle supplémentaire a été proposé pour l'ATPase, en lien avec l'adressage des ET3s au SST3 par des chaperonnes (voir la section III.2.1).

Les protéines de la famille YscQ forment probablement une structure oligomérique appelée anneau C. Cet anneau C serait impliqué dans la formation de sites d'accueil des substrats du SST3, comme le suggèrent de nombreuses interactions identifiées (Morita-Ishihara *et al.*, 2006 ; Spaeth *et al.*, 2009 ; Lara-Tejero *et al.*, 2011 ; Lorenz *et al.*, 2012).

II.1.2. L'appareil d'export de la membrane interne

L'appareil d'export est un complexe protéique inséré dans la membrane interne de la bactérie. Il est constitué de nombreux composants : les membres des familles YscR, YscS, YscT, YscU et YscV. Chaque protéine contient entre un et huit domaines transmembranaires et certaines présentent plusieurs domaines cytosoliques. YscU, YscV et leurs homologues arborent des domaines cytosoliques particulièrement importants car potentiellement impliqués dans la reconnaissance des substrats du SST3 (Allaoui *et al.*, 1994 ; Berger *et al.*, 2010). Des interactions entre les homologues de YscU et YscV chez la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *vesicatoria*, et plusieurs protéines sécrétées par le SST3 ont notamment été démontrées, soulignant le rôle de ces protéines comme plateformes d'accueil des substrats du SST3, à l'instar de l'anneau C (Lorenz *et al.*, 2008 ; Hartmann & Büttner, 2013).

II.1.3. Les anneaux de la membrane interne

A la base du SST3 se trouve une structure en anneaux, insérée dans la membrane interne bactérienne, qui forme un canal de deux à trois nanomètres de diamètre (Blocker *et al.*, 2001). Cette structure pourrait servir d'échafaudage pour la

mise en place de l'appareil d'export abordé précédemment. Ces anneaux sont composés d'au moins deux protéines : les membres des familles de lipoprotéines YscJ et YscD. Les membres de la famille YscJ forment une structure en anneau localisée sur le côté périplasmique de la membrane interne et probablement maintenue à cette dernière *via* la partie lipidique de YscJ et ses homologues (Silva-Herzog *et al.*, 2008 ; Schraidt *et al.*, 2010). Les membres de la famille YscD formeraient également une structure en anneau adjacente à la précédente (Diepold *et al.*, 2010). Des interactions protéines-protéines ont été mises en évidence entre les membres des deux familles, mais aussi avec une protéine des anneaux de la membrane externe et, chez *E. coli*, avec la protéine du pilus (Ogino *et al.*, 2006 ; Ross & Plano, 2011). Ces interactions suggèrent que les anneaux de la membrane interne sont connectés directement à ceux de la membrane externe et à la base de l'aiguille insérée dans la membrane bactérienne.

II.1.4. Les anneaux de la membrane externe

Une autre structure en forme d'anneaux est localisée à la membrane externe bactérienne. C'est une structure multimérique composée d'une famille de protéines appelée sécrétines, dont les membres sont aussi connus pour intervenir dans l'assemblage des systèmes de sécrétion de type II et IV (Ayers *et al.*, 2010). Les sécrétines présentent un peptide signal dans leur extrémité N-terminale, qui induit leur adressage vers le système Sec, permettant leur transport à travers la membrane interne jusqu'au périplasme où elles s'associent entre elles (Kimbrough & Miller, 2000). Les régions C-terminales des sécrétines traversent la membrane externe en formant une structure en anneaux. Il est suggéré que les régions N-terminales prolongent quant à elles le canal au niveau du périplasme, établissant ainsi une connexion entre les anneaux des membranes externe et interne (Schraidt *et al.*, 2010).

L'oligomérisation des sécrétines nécessite une autre famille de protéines du SST3 associées à la membrane externe : les pilotines (Crago & Koronakis, 1998 ; Burghout *et al.*, 2004). En leur absence, les sécrétines se retrouvent localisées à la membrane interne de la bactérie. Ces lipoprotéines n'ont cependant été identifiées que chez les bactéries pathogènes d'animaux.

II.1.5. La tige interne

La présence d'une structure interne en forme de tige creuse, localisée dans le périplasme, a été démontrée chez *Salmonella* spp. (Marlovits *et al.*, 2004). Cette structure est composée de plusieurs copies de la protéine de la famille YscI, pour laquelle des homologues existent chez les autres bactéries pathogènes. La tige interne serait localisée à l'intérieur du canal formé par les parties périplasmiques des anneaux des membranes interne et externe. Cette structure pourrait permettre l'ancrage du pilus, qui possède une partie insérée dans la membrane bactérienne (Sani *et al.*, 2007).

II.2. La partie extracellulaire du SST3

II.2.1. L'aiguille ou pilus

La partie extracellulaire du SST3 est principalement constituée d'un filament à l'intérieur duquel un canal permet le transport des ET3s à travers le milieu extracellulaire, et dont la croissance s'effectue par l'extrémité distale (Li *et al.*, 2002 ; Crepin *et al.*, 2005). La nature de ce filament diffère notablement entre les bactéries pathogènes d'animaux et les bactéries phytopathogènes. Les premières arborent une structure appelée aiguille, constituée de nombreuses copies d'une protéine de la famille YscF, d'une longueur définie entre 40 et 80 nm selon les espèces (Tamano *et al.*, 2000 ; Blocker *et al.*, 2001 ; Journet *et al.*, 2003). Les bactéries pathogènes de plantes possèdent une structure nommée pilus, d'une longueur variable mais beaucoup plus importante, de l'ordre d'un à deux micromètres (Roine *et al.*, 1997 ; van Gijsegem *et al.*, 2000 ; Jin & He, 2001). Cette différence est probablement expliquée par la nécessité pour les bactéries phytopathogènes de traverser la paroi des cellules végétales, un obstacle absent des cellules animales (Brown *et al.*, 2001). La sous-unité de la famille YscF de l'aiguille présente une certaine homologie avec celle du filament flagellaire. En revanche, aucune homologie n'est détectée avec la sous-unité du pilus (HrpA chez *P. syringae*). De manière intéressante, bien que HrpA et ses homologues présentent des structures secondaires similaires avec une grande richesse en hélices α , ces protéines font partie des éléments du SST3 dont les séquences sont les plus variables (Weber & Koebnik, 2005). Elles sont par ailleurs soumises à de fortes pressions de sélection positive, contrairement à la majorité des

protéines du SST3 (Weber & Koebnik, 2006 ; Lu *et al.*, 2008). Ceci suggère que le pilus évolue rapidement pour éviter sa reconnaissance par le système immunitaire de la plante.

II.2.2. Le translocon et les harpines

Les ET3s sécrétés *via* le pilus doivent franchir la membrane plasmique eucaryote avant de pouvoir atteindre le cytoplasme de la cellule hôte. Cette étape est assurée par une structure oligomérique appelée translocon, qui forme un pore dans la membrane eucaryote. Chez les bactéries pathogènes d'animaux, le translocon est constitué de trois protéines : les membres des familles de protéines hydrophobes YopB et YopD s'associent pour former le pore en lui-même, alors que les protéines hydrophiles de la famille LcrV forment une structure en anneau qui jouerait le rôle de plateforme d'assemblage du translocon et de connecteur à l'aiguille (Mueller *et al.*, 2008). Ces protéines ne sont pas conservées chez les bactéries phytopathogènes et la plateforme d'assemblage y est absente. Selon les espèces, une à deux protéines ont été identifiées comme constituants probables du translocon. Elles présentent des niveaux d'homologie variables (Büttner & He, 2009).

Chez certaines espèces de bactéries phytopathogènes, les protéines du translocon ne s'avèrent pas requises pour la virulence, suggérant l'existence d'une certaine redondance fonctionnelle avec d'autres protéines appelées harpines (Kvitko *et al.*, 2007 ; Bocsanczy *et al.*, 2008). Ces protéines, dont le rôle spécifique dans la translocation des ET3s a été démontré, présentent la particularité d'être riches en glycine, stables à haute température et d'éliciter une HR lorsqu'elles sont infiltrées dans l'apoplaste des feuilles. Leur fonction exacte est encore inconnue. Des études ont mis en évidence la capacité pour certaines harpines à interagir avec la paroi végétale ou à former des pores dans les membranes végétales (Charkowski *et al.*, 1998 ; Engelhardt *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010 ; Haapalainen *et al.*, 2011).

III. Adressage des ET3s au SST3 et contrôle de la sécrétion

Les données accumulées jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments nécessaires à la sécrétion des substrats du SST3. D'une part, l'adressage des ET3s au SST3 exige généralement la présence d'un signal de sécrétion propre à la protéine sécrétée. D'autre part, différents types de protéines agissent comme des assistants qui promeuvent la sécrétion de certains substrats du SST3.

III.1. Le signal de sécrétion

De manière générale, les ET3s voués à être sécrétés par le SST3 possèdent un signal de sécrétion localisé au niveau des 50 premiers acides aminés de la région N-terminale de la protéine. Cependant un niveau maximal de sécrétion pourrait exiger la présence des 100 premiers acides aminés (Casper-Lindley *et al.*, 2002 ; Schechter *et al.*, 2004). Cette région N-terminale n'est pas conservée parmi les ET3s, mais dénote certaines caractéristiques partagées. Elle révèle souvent un biais de composition en acides aminés avec un enrichissement en sérine et une faible proportion d'aspartate (Guttman *et al.*, 2002). De plus, il semble que le signal de sécrétion implique généralement la présence d'acides aminés exposés aux solvants en tout début de chaîne et le caractère amphipathique des 50 premiers acides aminés (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Finalement, cette région paraît désordonnée, c'est-à-dire sans structure tertiaire définie, entraînant probablement une flexibilité structurale qui pourrait jouer un rôle dans la capacité des ET3s à interagir avec différentes protéines liées au SST3 (Buchko *et al.*, 2010). Notons que la présence d'un signal de sécrétion dans les ARNm d'ET3s chez *Yersinia* spp. a également été proposée, suggérant une traduction et une sécrétion concomitantes (Anderson & Schneewind, 1999).

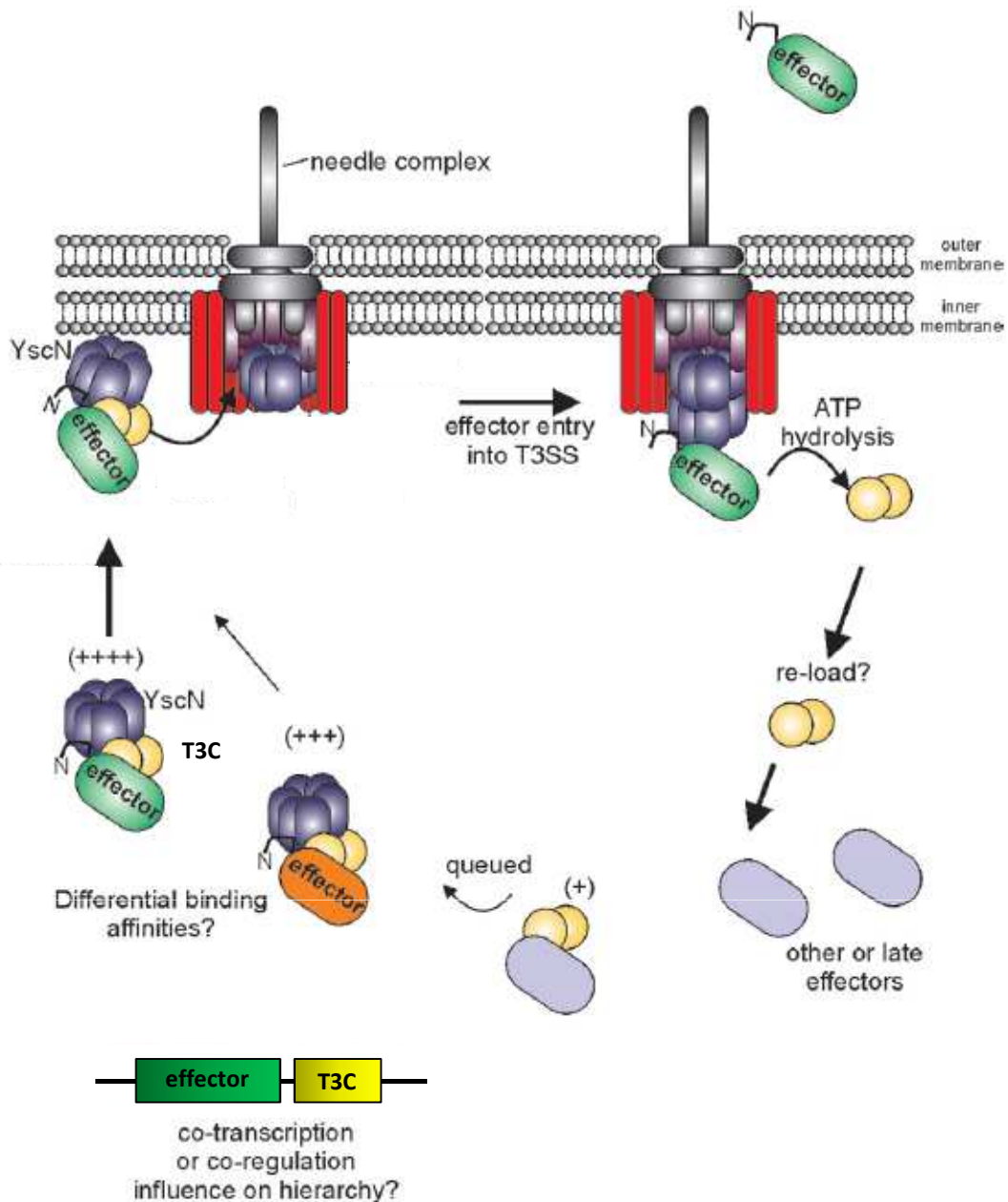
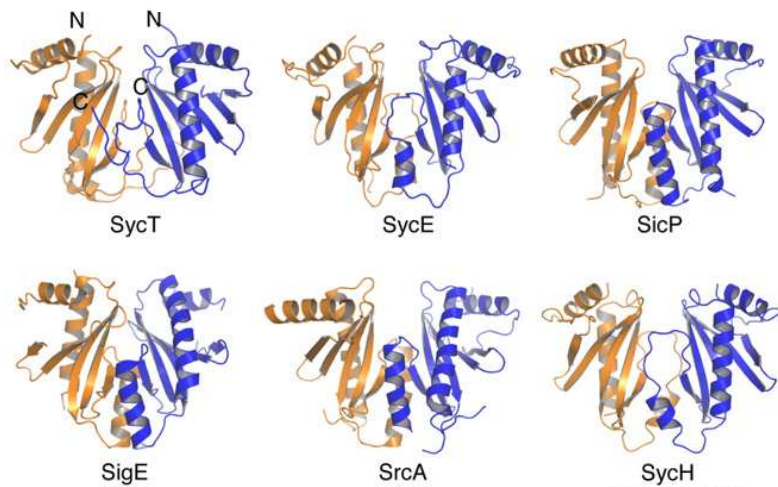
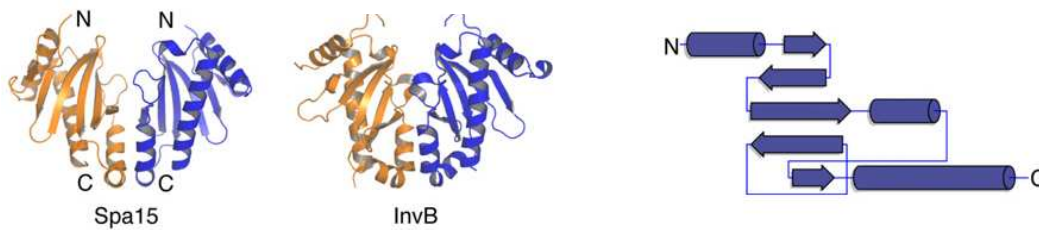


Figure 20. Modèle de l'implication des chaperonnes de type III (CT3s) dans l'adressage des effecteurs de type III (ET3s) au système de sécrétion de type III. Le modèle rassemble les différentes fonctions des CT3s telles que décrites dans la littérature. Une hypothétique hiérarchie de sécrétion est illustrée par la sécrétion prioritaire d'un ET3 (vert) par rapport à celle d'un autre ET3 (orange). Cette hiérarchie pourrait être la conséquence d'une co-régulation d'un couple ET3-CT3 ou de différentes affinités entre une CT3 et plusieurs ET3s (symbolisées par les signes +). Les ET3s sont stabilisés en interagissant avec des CT3s dimériques (jaunes) et l'ATPase hexamérique (violet) puis sont adressés vers le SST3. L'enchaînement séquentiel de ces interactions n'est pas connu. L'ATPase permet la dissociation du complexe ET3-CT3 et l'entrée de l'ET3 dans le SST3. Les CT3s libres pourraient prendre en charge d'autres ET3s (D'après Thomas *et al.*, 2012).
T3SS : type III secretion system ; T3C : type III chaperone.

CT3s de classe IA



CT3s de classe IB



CT3s de classe II

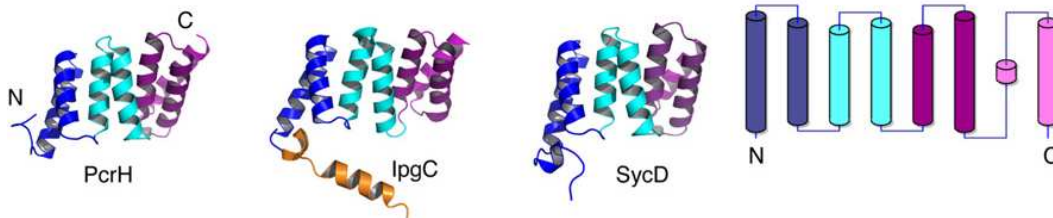


Figure 21. Structures de chaperonnes de type III (CT3s) appartenant aux classes IA, IB et II. Les CT3s forment généralement des homodimères en interagissant *via* une interface en hélice alpha, selon une symétrie d'ordre 2. Les CT3s de classe I, qui présentent des structures en hélices α et feuilletts β , sont représentées sous forme d'homodimères (une couleur par monomère). Les CT3s de classe II présentent des conformations de type TPR (tetratricopeptide repeat) caractérisées par trois paires d'hélices antiparallèles. Les CT3s présentées appartiennent aux genres *Yersinia*, *Shigella* et *Salmonella* et sont décrites dans le tableau 3 (d'après Izoré *et al.*, 2011).

Tableau 3. Liste des chaperonnes de type III identifiées chez des bactéries pathogènes d'animaux et de leurs partenaires d'interaction

Organismes et CT3s	Partenaires d'interaction	Caractéristiques
<i>Yersinia spp.</i>		
SycD (LcrH)	YopB (T), YopD (T), YscY (C), YscM1 (R), YscM2 (R)	Dimérise ; contient 3 motifs TPR ; stabilise YopB et YopD ; fonction de régulation
SycE	YopE (E), YscM1 (R), YscM2 (R)	Dimérise ; promeut un changement de conformation de YopE
SycH	YopH (E), YscM1 (R), YscM2 (R)	Dimérise ; fonction de régulation
SycN, YscB	YopN (R/E)	SycN et YscB s'associent en hétérodimères et stabilisent YopN
SycO	YopO (E), YscM1 (R)	Dimérise ; masque le domaine de localisation membranaire de YopO ; une surexpression inhibe la sécrétion des Yops
SycT	YopT (E)	Dimérise
YscE, YscG	YscF (A)	YscE et YscG s'associent en hétérodimères ; YscG contient des motifs TPR
YscY	YscX (EC)	Fonction de régulation
SycP	YspP (E)	Dimérise ; stabilise YscP
SycB	YspB (T), YspC (T)	Dimérise ; stabilise YspB ; régule l'expression des gènes <i>ysa</i>
<i>Shigella spp.</i>		
IpgA	IcsB (E)	Stabilise IcsB ; cotraduction avec IcsB
IpgC	IpaB (T), IpaC (T), MxiE (R)	Dimérise ; contient des motifs TPR ; stabilise IpaB et IpaC ; probable co-activateur du régulateur transcriptionnel MxiE
IpgE	IpgD (E)	Stabilise IpgD
Spa15	IpaA (E), IpgB1 (E), OspC3 (E), OspB (E), OspD1 (R)	Dimérise ; est sécrétée ; stabilise IpgB ; co-anti-activateur de l'anti-activateur OspD1
IpaD	IpaD (T)	activité d'autochaperonage
<i>Salmonella spp.</i>		
InvB	SipA (E), SopA (E), SopE (E), SopE2 (E)	Dimérise ; stabilise SopE2 et SipA
SicA	SipB (T), SipC (T), InvF (R)	Interagit de manière homotypique ; stabilise SipB et SipC ; co-activateur du régulateur transcriptionnel InvF
SicP	SptP (E)	Dimérise ; stabilise SptP ; cotraduction avec SptP
SigE	SopB (E)	Dimérise ; stabilise SopB
SrcA	SseL (E), PipB2 (E)	Dimérise
SscB	SseF (E)	Stabilise SseF
SseA	SseB (T), SseD (T)	Stabilise SseB
SsaE	SseB (T)	Contribue aussi à la sécrétion de PipB (E)
SsaQ _S	SsaQ _L	
<i>E. coli</i>		
CesA2	EspA (F)	Stabilise EspA et inhibe sa polymérisation
CesAB	EspA (F), EspB (T)	Dimérise ; stabilise EspA
CesD	EspD (T)	Contribue aussi à la sécrétion de EspB (T)
CesD2	EspD (T)	Stabilise EspD
CesF	EspF (E)	
CesL	SepL (E)	
CesT	Tir (E), Map (E), NleA (E), EspFU (E), EspG (E), EspZ (E), NleG (E), NleH (E), NleH2 (E)	Dimérise ; stabilise Map ; contribue aussi à la sécrétion de NleI (E)

CT3s : chaperonnes de type III. Les noms des protéines qui interagissent avec les CT3s sont catégorisés en effecteurs de type III (E), protéines du translocon (T), protéines du filament (F), régulateurs (R), protéines de l'aiguille (A), CT3s (C) et protéines extracellulaires du système de sécrétion de type III (EC). (D'après Büttner, 2012)

III.2. Les acteurs du contrôle de la sécrétion

III.2.1. Généralités

L'adressage des protéines sécrétées au SST3 peut aussi dépendre, outre de la présence d'un signal de sécrétion, de protéines appelées chaperonnes de type III (CT3s). Celles-ci sont majoritairement cytoplasmiques et se complexent souvent sous forme d'homo ou d'hétérodimères. Ces dimères interagissent avec leurs substrats et promeuvent leur sécrétion en agissant de plusieurs manières (Figure 20). Il est probable que les CT3s guident leurs substrats vers la base du SST3 et qu'elles permettent de les stabiliser, notamment en les protégeant d'une dégradation par des protéases.

Les CT3s interagissant avec des ET3s sont divisées en deux classes : celles de classe IA sont spécifiques à un unique ET3 alors que les chaperonnes de classe IB interagissent avec plusieurs ET3s (Parsot *et al.*, 2003 ; Thomas *et al.*, 2012) (Figure 21). Chez les bactéries pathogènes d'animaux, d'autres CT3s, dites de classe II, ont été caractérisées comme interagissant avec les protéines du translocon (Lunelli *et al.*, 2009 ; Job *et al.*, 2010 ; Schreiner & Niemann, 2012). Ces chaperonnes possèdent généralement des motifs répétés de type tétratricopeptide connus pour être impliqués dans des interactions protéine-protéine (Bröms *et al.*, 2006 ; Job *et al.*, 2010). Les CT3s identifiées chez les principales bactéries pathogènes d'animaux étudiées sont décrites dans le Tableau 3.

L'adressage des ET3s au SST3 par les chaperonnes paraît aussi impliquer l'ATPase cytoplasmique associée à l'appareil d'export de la membrane interne. Plusieurs interactions entre l'ATPase et des chaperonnes ou des ET3s ont été mises en évidence (Gauthier & Finlay, 2003 ; Thomas *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2005 ; Sorg *et al.*, 2006 ; Lorenz & Büttner, 2009). L'ATPase pourrait intervenir dans la dissociation des complexes CT3-ET3 et dans le maintien d'une conformation dépliée des ET3s (Akeda & Galan, 2005). Une telle conformation s'avère probablement nécessaire au passage des protéines sécrétées dans le canal du SST3, qui présente un diamètre interne de deux à trois nanomètres seulement (Akeda & Galan, 2005 ; Blocker *et al.*, 2001 ; Wilharm *et al.*, 2004).

Par ailleurs, avec l'accumulation de données relatives à la structure et à l'assemblage du SST3 est apparu le concept d'une hiérarchie de sécrétion des différents substrats du SST3. Ainsi la sous-unité du pilus, probablement la première protéine sécrétée, est-elle qualifiée de substrat précoce. Les protéines du translocon et les ET3s sont pour leurs parts identifiés comme des substrats intermédiaires et tardifs, respectivement. De plus, il semble qu'une hiérarchie de sécrétion puisse exister aussi au sein des différents ET3s transloqués. Dans leur ensemble, ces mécanismes de hiérarchie de sécrétion font intervenir plusieurs protagonistes parmi lesquelles se trouvent de nouveau les CT3s, mais également les protéines de type T3S4 (type III secretion substrate specificity switch) ou les protéines de la famille YopN.

Les sections qui suivent traitent des protéines impliquées dans l'adressage des ET3s au SST3 et dans la hiérarchie de sécrétion. Ces aspects seront abordés en premier lieu chez les bactéries phytopathogènes, puis chez les bactéries pathogènes d'animaux, pour lesquelles la littérature sur les acteurs de la hiérarchie de sécrétion est plus abondante.

III.2.2. Focus sur les bactéries phytopathogènes

L'état de l'art concernant les différentes protéines impliquées dans le contrôle de la sécrétion de type III chez les bactéries phytopathogènes a fait l'objet d'une mini-revue publiée dans la revue « *Frontiers in Plant Science* » et reproduite ci-après.



Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery

David Lohou^{1,2}, Fabien Lonjon^{1,2}, Stéphane Genin^{1,2} and Fabienne Vaillau^{1,2,3} *

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR441, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Castanet-Tolosan, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, UMR2594, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Castanet-Tolosan, France

³ Institut National Polytechnique, École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

Edited by:

Carmen R. Beuzón, University of Málaga, Spain

Reviewed by:

Brad Day, Michigan State University, USA

Chang-Sik Oh, Kyung Hee University, Korea (South)

*Correspondence:

Fabienne Vaillau, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR441, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, CS 52627, 24 Chemin de Borde Rouge-Auzeville, Castanet-Tolosan cedex 31326, France
e-mail: fabienne.vaillau@toulouse.inra.fr

Gram-negative plant pathogenic bacteria possess a type III secretion system (T3SS) to inject bacterial proteins, called type III effectors (T3Es), into host cells through a specialized syringe structure. T3Es are virulence factors that can suppress plant immunity but they can also conversely be recognized by the plant and trigger specific resistance mechanisms. The T3SS and injected T3Es play a central role in determining the outcome of a host-pathogen interaction. Still little is known in plant pathogens on the assembly of the T3SS and the regulatory mechanisms involved in the temporal control of its biosynthesis and T3E translocation. However, recent insights point out the role of several proteins as prime candidates in the role of regulators of the type III secretion (T3S) process. In this review we report on the most recent advances on the regulation of the T3S by focusing on protein players involved in secretion/translocation regulations, including type III chaperones (T3Cs), type III secretion substrate specificity switch (T3S4) proteins and other T3S orchestrators.

Keywords: bacterial plant pathogens, type III secretion system (T3SS), type III chaperones (T3Cs), type III secretion substrate specificity switch (T3S4), secretion of type III effectors (T3Es), control of secretion/translocation

INTRODUCTION

The type III secretion system (T3SS) is a major determinant of pathogenicity characterized in numerous Gram-negative animal and plant pathogenic bacteria (Cornelis and van Gijsegem, 2000; He et al., 2004; Tampakaki et al., 2010). It allows type III effector (T3E) delivery into the host cells thanks to a complex and ordered type III secretion (T3S) process (Büttner, 2012). T3Es are virulence factors that can suppress plant immunity or they can also conversely be recognized by the plant and trigger the so called effector-triggered immunity (Jones and Dangl, 2006; Feng and Zhou, 2012). This review is devoted to proteins that affect regulation of the secretion/translocation of T3Es in the two main groups of T3SS in plant pathogens, *i.e.*, Hrp1- (Hrp for hypersensitive response and pathogenicity) and Hrp2-T3SS phytopathogenic bacteria (see Tampakaki et al., 2010, and Büttner, 2012; for reviews on the genomic organization and architecture of T3SS). We give here an overview of the specialized type III chaperones (T3Cs) and of other T3S control proteins characterized in Hrp1 T3SS bacteria (*Pseudomonas syringae* and *Erwinia amylovora*), and in Hrp2 T3SS bacteria (*Xanthomonas* spp. and *Ralstonia solanacearum*).

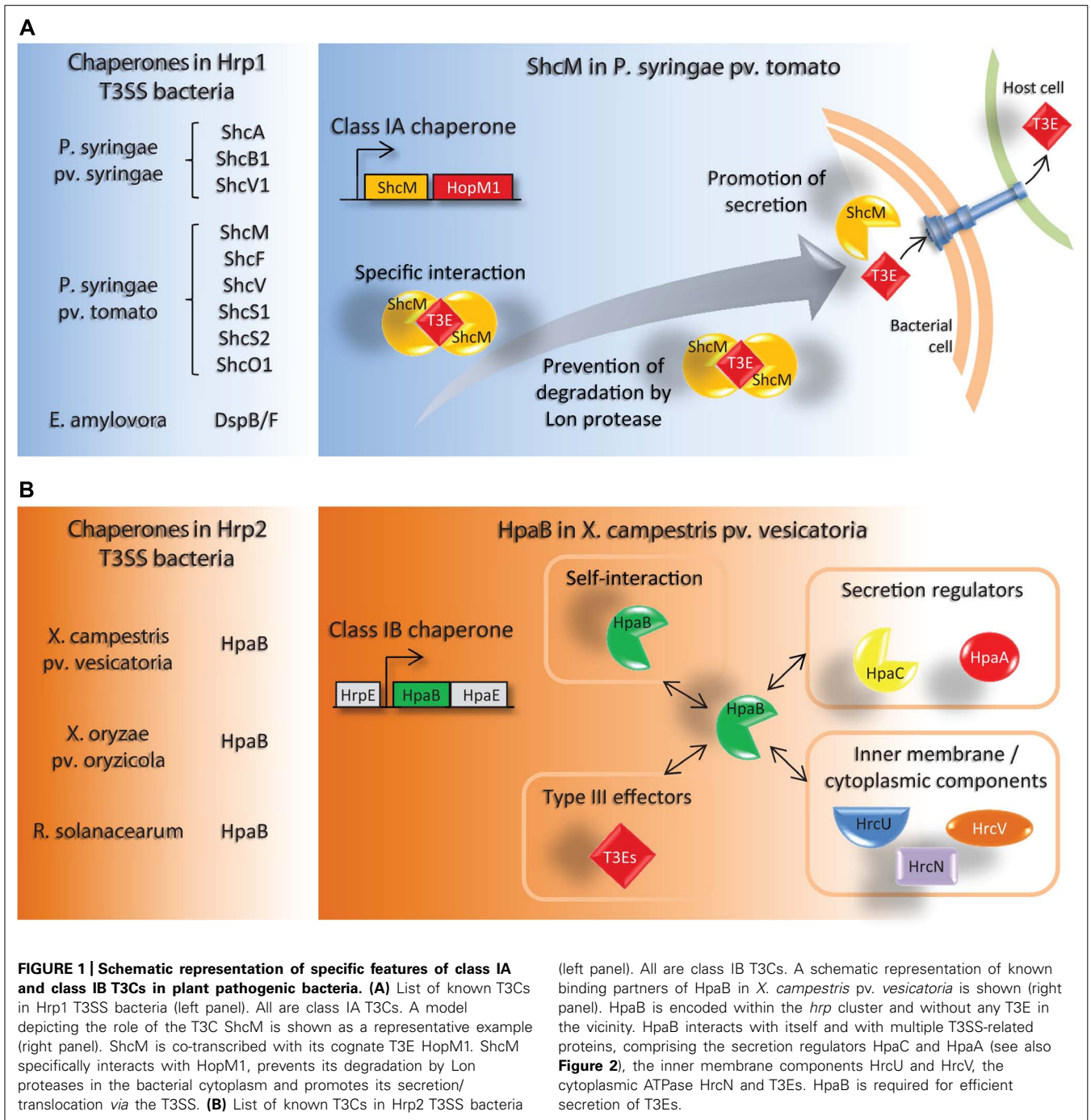
TYPE III CHAPERONES

Type III chaperones can be defined as helper proteins, mainly acting through direct interactions with T3Es, required for the delivery of effectors into the host cell. T3Cs are small (15–20 kDa), acidic, cytoplasmic proteins, and harbor a predicted α -helical secondary structure in their C-terminal part (Feldman and Cornelis, 2003; Parsot et al., 2003). T3Cs can be strictly or partially required to prevent cytoplasmic proteolysis and premature aggregation of T3Es, and/or maintain T3Es in a secretion competent

status (Feldman and Cornelis, 2003; Parsot et al., 2003). T3Cs do not share amino acid sequence similarity, nevertheless, a classification has been proposed dividing them into three classes according to their cognate substrates. Class I is subdivided into classes IA and IB, corresponding to chaperones binding to one or several T3Es, respectively (Cornelis and van Gijsegem, 2000; Parsot et al., 2003). Class II chaperones that are specialized translocator-chaperones and class III chaperones, flagellar-associated T3SS chaperones, are up to now only described in animal pathogenic bacteria (see Büttner, 2012, as a review). We will focus on class I T3Cs as it is the main class described in phytopathogenic bacteria (Figure 1).

CLASS IA T3C ARE MOSTLY INVOLVED IN THE SECRETION OF A SPECIFIC T3E

Class IA T3Cs were described in *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* and *E. amylovora*, all three pathogens harboring a Hrp1 T3SS (Figure 1A). The corresponding genes are located next to the cognate effector genes in the bacterial genome. These T3Cs were named Shc for Specific hop chaperones in *Pseudomonas* species as they help secretion of T3Es named Hops (*hrp*-dependent outer proteins), and to Dsp for disease specific protein, *i.e.*, chaperone or effector in *E. amylovora*. For all class IA T3Cs studied, a direct interaction T3C-cognate T3E has been demonstrated. To date, three Shc proteins have been characterized in *P. syringae* pv. *syringae*, including ShcA, which controls the secretion and translocation of HopA1 (van Dijk et al., 2002), and ShcB1 and ShcV1 that have been demonstrated to stabilize their cognate T3Es HopB1 and HopV1, respectively (Charity et al., 2003; Losada and Hutcheson, 2005). They prevent the T3E degradation mediated by the Lon



protease, which exerts a negative regulatory effect on the T3S in *P. syringae* (Bretz et al., 2002). Three typical class IA T3Cs have been identified in *P. syringae* pv. *tomato*. ShcM plays several roles to promote efficient HopM1 translocation: it is required for the secretion and the translocation of HopM1 (Badel et al., 2003), but also protects HopM1 from Lon degradation, interacting with the effector through a chaperone binding domain (CBD) which is different from the Lon-targeting domain (Losada and Hutcheson, 2005; **Figure 1A**). ShcF is required for HopF stabilization but was shown dispensable for HopF secretion (Shan et al., 2004), whereas ShcV

is required for HopV1 secretion (Wehling et al., 2004). Three other chaperones, SchS1, SchO1 and SchS2, harbor the typical features of T3Cs, but have atypical properties for class IA T3Cs as they could facilitate translocation of homologous T3Es (Kabisch et al., 2005). In another study, it was shown that SchS1, SchO1 and SchS2 were additionally able to bind to each other and to other's cognate effectors (Guo et al., 2005). These three chaperones facilitate the secretion/translocation of their cognate T3E (HopS1, HopO1-1 and HopS2, respectively), and SchS1 and SchS2 can substitute ShcO1 to help HopO1-1 type III delivery (Guo et al., 2005). Other

putative chaperones have been identified, located upstream a putative T3E target, but even if they show the physical properties of class IA T3Cs, their role still needs to be demonstrated. This is the case for the T3C-T3E pairs ShcN-HopN1 (Lopez-Solanilla et al., 2004) and ORF2-AvrE1 (Badel et al., 2006).

In *E. amylovora*, a putative T3C-T3E pair was characterized, the couple DspB/F-DspA/E (Gaudriault et al., 1997). DspB/F interacts with, stabilizes, and is important for DspA/E secretion (Gaudriault et al., 2002). Two studies identified the DspB/F binding sites in the N-terminal part of DspA/E, however with some differences in the regions of interactions (Triplett et al., 2009; Oh et al., 2010). This may indicate the presence of multiple CBD to help T3E translocation.

Class IA chaperones from phytopathogenic bacteria share common structural and functional features with class IA chaperones in animal pathogenic bacteria (He et al., 2004). The binding of both T3E and T3C partners is described in more details in the latter systems, notably through structural analysis of the T3C-T3E complex (Büttner et al., 2005; Lillington et al., 2011; Vujanac and Stebbins, 2013). Recently, co-crystal structure of the complex ShcA-HopA1 from *P. syringae* has also been obtained, both proteins sharing a fold and interacting through a conserved structural motif (called the β -motif) where HopA1 shows an extended non-globular conformation critical for the stability of the complex (Janjusevic et al., 2013). This β -motif is strongly conserved from animal to plant pathogens and was also described with the DspB/F chaperone of *E. amylovora* (Triplett et al., 2010), suggesting that it may be widely implicated in T3C-T3E complexes.

Another particular case of class IA chaperone is the HrpG protein which was described to act as a suppressor of a negative regulator of the T3SS (Wei et al., 2005). HrpG was characterized in *P. syringae* pv. *syringae* as a chaperone-like protein, as HrpG is structurally close to SicP, a class IA chaperone of *Salmonella typhimurium*, and harbors the characteristics of T3Cs (Wei et al., 2005). Wei et al. (2005) identified HrpG as an interactor of HrpV, a conserved component of the *P. syringae* T3SS, previously demonstrated to down-regulate the expression of the *hrp* gene cluster (Preston et al., 1998). Hence, the assembly of the HrpG-HrpV protein complex leads to the suppression of the *hrpV*-dependent negative regulation of the *hrp* gene cluster. More recently, Ortiz-Martin et al. (2010) studied HrpG in *P. syringae* pv. *phaseolicola* and highlighted for HrpG an additional HrpV-independent role in virulence.

CLASS IB T3Cs ARE INVOLVED IN THE SECRETION OF SEVERAL T3Es

Genes which encode for class IB chaperones, binding several T3Es, are typically located within the *hrp* cluster. Class IB T3Cs were identified in several Hrp2 T3SS phytopathogenic bacteria, with one conserved protein named HpaB (for *hrp*-associated; **Figure 1B**). HpaB has been particularly well characterized in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, as a T3C with a wide specificity of substrates. It was shown that HpaB could self-interact (Büttner et al., 2006) as well as with the inner membrane proteins HrcU and HrcV (Lorenz and Büttner, 2011; Hartmann and Büttner, 2013), with the ATPase HrcN (Lorenz and Büttner, 2009), with T3Es (AvrBs1 and AvrBs3; Büttner et al., 2004), and with other proteins involved in the T3S control (HpaC and HpaA;

Büttner et al., 2004; Lorenz et al., 2008a; **Figure 1B**). HpaB promotes the secretion of many *Xanthomonas* T3Es (XopC, XopJ, AvrBst, AvrBs1, AvrBs3, and XopF1; Büttner et al., 2004, 2006). Like typical chaperones, HpaB is a small acidic protein, with *Yersinia*, *Shigella flexneri* or *Salmonella enterica* T3Cs predicted similarities (Büttner et al., 2006), and with a rich content in leucine amino acids (Büttner et al., 2004), which may contribute to its ability to interact with various proteins. A HpaB homolog identified in *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Zou et al., 2006) was demonstrated to be involved in efficient translocation of 15 T3Es out of the 16 T3Es identified in this strain (Furutani et al., 2009). In *R. solanacearum*, HpaB was demonstrated to be required for efficient translocation of more than 66 T3Es (Mukaihara et al., 2004, 2010) but no data concerning putative interactions with T3Es is available. However, HpaB was shown to be dispensable for the translocation of harpin, pilin, and translocon proteins (Mukaihara et al., 2010). All these data support the view of a broader involvement of HpaB in T3S control rather than just a T3E escort function. This hypothesis is comforted by the *hrp*⁻ phenotype (no disease, no hypersensitive response, HR) of *hpaB* mutants, despite evidence for functional pili production in *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Weber et al., 2005) or in *R. solanacearum* (Mukaihara et al., 2004). It also suggests that chaperone-mediated control for T3E delivery may be different according to the microorganism. The fact that specialized class II chaperones, which are responsible for the secretion of the translocon proteins in animal pathogenic bacteria, were not identified in phytopathogenic bacteria shows a noticeable difference compared to T3S regulators from phytopathogenic bacteria. Therefore, how secretion of translocon proteins is promoted in absence of class II T3Cs in plant pathogenic bacteria remains to be addressed.

T3S4 PROTEINS

Based on the current knowledge of T3SS assembly, it is presumed that secretion of the Hrp pilus subunits must proceed before secretion of translocon proteins and effectors. This hierarchical process led to the classification of secreted proteins as “early” and “late” T3SS substrates. The involvement of proteins controlling T3S export process were first described as early as 1995 with the identification of the InvJ protein from *S. typhimurium* (Collazo et al., 1995). However, the link between functionally related proteins and the presence of a conserved T3S4 (type III secretion substrate specificity switch) domain was first described by Agrain et al. (2005a), with the characterization of the YscP protein from *Yersinia* species. Members of the YscP family have little or no homology at the amino acid level, but are all proline-rich and harbor the so-called T3S4 domain in their C-terminal part. This structurally conserved domain is globular and composed of seven hydrophobic clusters of amino acids that define predicted β -strands and α -helices (Agrain et al., 2005a). *Yersinia* YscP protein has been particularly well characterized, highlighting a dual function: YscP is required to switch secretion from early to late substrates, including Yop (*Yersinia* outer proteins) T3Es (Edqvist et al., 2003; Agrain et al., 2005a) and controls the needle length, the nice molecular ruler model describing an attachment of the C-terminal part of YscP to the base of the secretion apparatus while the N-terminal part travels the inner channel of the growing

needle. The needle is completed when its size corresponds to a fully stretched YscP protein (Journet et al., 2003; Agrain et al., 2005b). Since then, T3S4 proteins have been also intensively studied in other animal pathogenic bacteria, mainly in *Salmonella* (Kubori et al., 2000; Marlovits et al., 2006) and *Shigella* (Magdalena et al., 2002; Botteaux et al., 2008) species.

In plant pathogenic bacteria, the most studied T3S4 proteins are HpaC from *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Büttner et al., 2006; Lorenz et al., 2008b) and HrpP from *P. syringae* (Morello and Collmer, 2009). Both proteins are important factors for bacterial pathogenicity. A *hpaC* mutant was shown to trigger reduced disease symptoms and reduced HR on susceptible and resistant pepper, respectively (Büttner et al., 2006). HrpP was found to be required for virulence on tomato and HR elicitation on *Nicotiana tabacum* (Morello and Collmer, 2009). Studies on HpaC and HrpP revealed that both proteins are involved at different levels in the regulation of T3S. In *X. campestris*, while the secretion of the Hrp pilin is not affected in a *hpaC* mutant, secretion of the translocon proteins (HrpF and XopA) and several T3Es (AvrBs3, XopC, XopJ and XopF1) is abolished (Büttner et al., 2006). On the other hand, in *P. syringae*, a *hrpP* mutant is severely impaired for pilin secretion but also for translocation of several T3Es such as AvrPto and therefore appears to behave almost like a T3SS-defective mutant (Ramos et al., 2007; Morello and Collmer, 2009). Quite surprisingly, HrpP itself is translocated into plant cells; however it was shown that the translocation of AvrPto is not dependent on the translocation of HrpP (Morello and Collmer, 2009).

To date, our understanding of T3S4 proteins is mostly based on the analysis of HpaC, a putative secretion switch factor regulating early (HrpB2 and HrpE pilin) and late (XopA translocator and T3Es) substrate secretion (Figure 2). HpaC appears to be a crossroad control protein with several interactors associated to different steps in the T3S process. Indeed, HpaC is able to self-interact and direct interactions with HpaC were identified with multiple partners including the inner membrane proteins HrcU and HrcV (Lorenz et al., 2008b; Hartmann and Büttner, 2013), the class IB chaperone HpaB (Büttner et al., 2006), the regulator HpaA (Lorenz et al., 2008a), the translocator XopA (Büttner et al., 2006), the ATPase HrcN (Lorenz and Büttner, 2009), and with T3Es (AvrBs3 and XopF1; Büttner et al., 2006; Lorenz et al., 2008b). HpaC was also shown to interact with HrpB2, an early T3S substrate required both for pilin subunit and translocators HrpF and XopA secretion (Rossier et al., 2000; Lorenz et al., 2008b; Hartmann et al., 2012). HrpB2 is part of the inner rod of the T3SS (Hartmann et al., 2012) and an interaction with the T3SS core component HrcU is necessary for its secretion (Lorenz and Büttner, 2011). HrpB2 is over-secreted in a *hpaC* mutant and in the same time, secretion of translocon proteins and T3Es is reduced (Büttner et al., 2006; Lorenz et al., 2008b). The HpaC-dependent substrate specificity switch requires the interaction between HpaC and the C-terminal domain of HrcU (HrcU; Schulz and Büttner, 2011), that presumably induces a conformational change altering substrate specificity of the T3SS (Lorenz and Büttner, 2011). This change of conformation might be due to an autocatalytic cleavage of HrcU at a NPTH motif conserved between HrcU homologs in pathogenic bacteria. Mutations in the NPTH amino-acid motif of HrcU alter its

interactions with both HpaC and HrpB2, suggesting that they may share the same binding site on HrcU (Lorenz and Büttner, 2011). Thus HpaC and HrpB2 could compete for their interaction with HrcU. It has been therefore proposed that HpaC could prevent efficient interaction between HrpB2 and HrcU and allow the access of the docking site of HrcU for secretion of translocon proteins and T3Es. But no interaction has been uncovered to date between HrcU and the T3SS substrates tested (XopA and XopF1; Lorenz et al., 2008b). However, it is noteworthy that the class IB HpaB was found to interact with HrcU (Lorenz and Büttner, 2011) and HrcV (Büttner et al., 2006; Hartmann and Büttner, 2013). It is conceivable that the docking of T3Es to HrcU and HrcV could be mediated by HpaB (Figure 2).

In *R. solanacearum*, the putative T3S4 domain protein HpaP is known to play a role in pathogenicity, since the corresponding mutant was reduced both for HR elicitation on tobacco and disease symptom production on tomato (van Gijsegem et al., 2002). In addition, HpaP was also required for an efficient secretion of the T3E PopA. Recent work characterized HpaP as a putative non-secreted T3S4 protein involved in the modulation of the secretion of early and late type III substrates, HrpY pilin and AvrA and PopP1 T3Es, respectively (Lohou et al., unpublished manuscript). As for HpaP homologs (Morello and Collmer, 2009; Schulz and Büttner, 2011), the T3S4 domain of *R. solanacearum* was demonstrated to be essential for HpaP's role in virulence on tomato and *Arabidopsis thaliana* (Lohou et al., unpublished). Two other candidate T3S4 proteins studied in *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*, both named HpaP, were shown to be important for pathogenicity on rice and for HR (Cho et al., 2008; Guo et al., 2012). In *X. oryzae* pv. *oryzae*, 16 T3Es have been found out to be T3SS substrates and all of them but one are dependent on HpaP for efficient translocation into tomato leaves (Furutani et al., 2009).

ADDITIONAL T3S-ASSOCIATED REGULATORS: HELPERS, EFFECTORS OR BOTH?

Finally, there are reports in the literature of T3SS-associated proteins with an apparent dual role, being involved both in the control of the export process, being crucial for T3E secretion, but also being themselves translocated into the plant cell and described as virulence factors. The first example is *X. campestris* pv. *vesicatoria* HpaA, originally described as a *hrp*-associated protein, since the corresponding mutant was not able to trigger disease symptoms on susceptible pepper and tomato, but retained the ability to elicit a reduced HR on several resistant pepper and tomato lines (Huguet et al., 1998). Lorenz et al. (2008a) characterized HpaA as important for the secretion of different T3SS substrates (the pilin HrpE, the translocon proteins HrpF and XopA, and the T3Es AvrBs3, XopJ and XopC), as well as for the translocation of these T3Es. Two nuclear localization signals (NLS) were identified in HpaA, which was demonstrated to be secreted and translocated to the plant nucleus in a T3SS-dependent manner (Huguet et al., 1998; Lorenz et al., 2008a). Translocation of HpaA is HpaB-dependent, in agreement with the identified interaction between the two proteins (Alegria et al., 2004; Lorenz et al., 2008a).

The second example is HrpJ, a *hrp*-associated protein found in *P. syringae* pathovars and *E. amylovora*. HrpJ was described

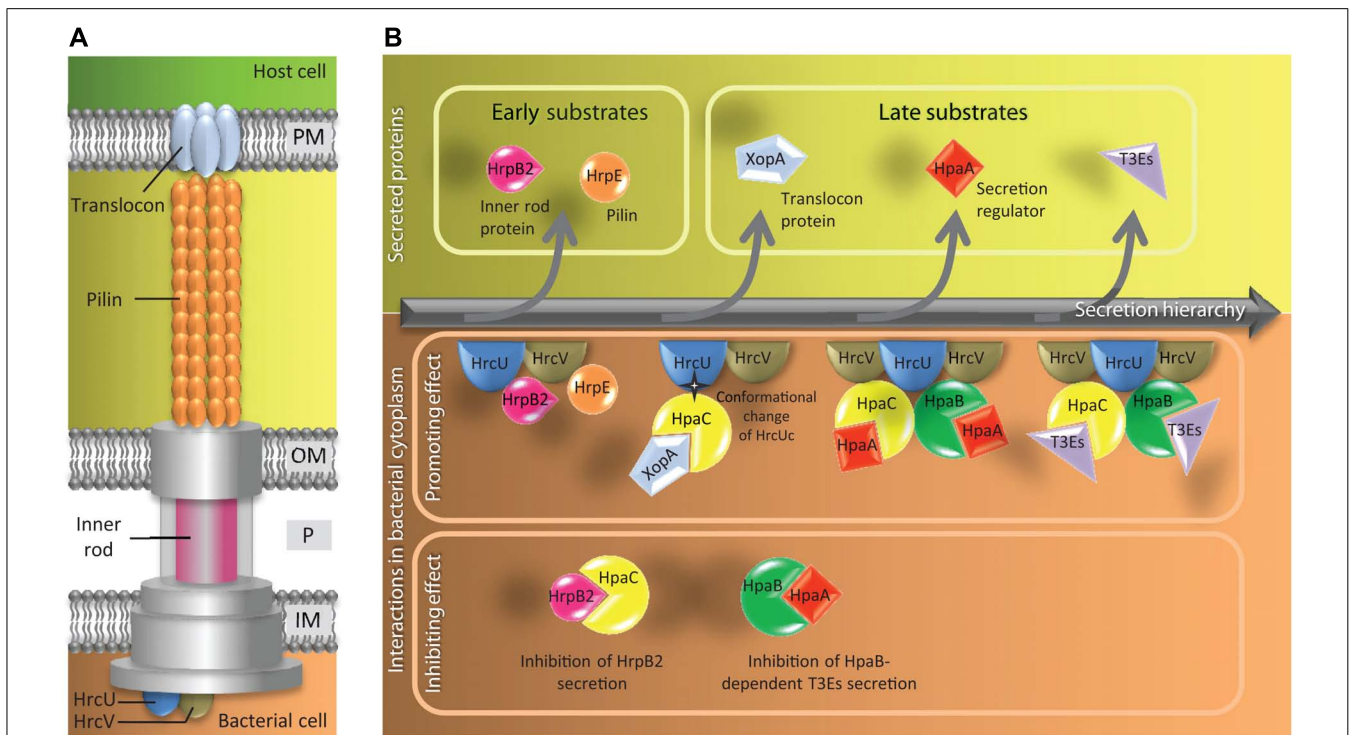


FIGURE 2 | Model of the control of type III secretion hierarchy in *X. campestris pv. vesicatoria*. (A) Schematic representation of the T3SS highlighting components mentioned in (B). The basal body of the T3SS spans the inner membrane (IM), the periplasm (P) and the outer membrane (OM) of the bacterium. The extracellular part of the T3SS comprises pilin subunits that form the pilus and translocon proteins that form a pore in the host plasma membrane (PM). The outer membrane/periplasmic inner rod is presumably the intracellular prolongation of the pilus. HrcU and HrcV are inner membrane components with a cytoplasmic C-terminal part. (B) Schematic view of the secreted proteins (upper part) and the protein interactions involved (lower

part) during the hierarchical secretion process. HrcU and HrcV probably act as a docking platform for secretion. The first substrates that travel through the T3SS are the pilin HrpE and the inner rod protein HrpB2. Secretion of HrpB2 is required for secretion of HrpE. The switch of substrate specificity between early and late substrates (translocon proteins and T3Es) depends on a HpaC-mediated conformational change of the HrcU C-terminal domain (HrcUc). HpaC is a T3S4 protein that interacts with HrpB2 and the late substrates. The switch between secretion of translocon proteins and T3Es requires the regulator HpaA. Secretion of HpaA releases the class IB chaperone HpaB. HpaB can bind to T3Es to promote their secretion.

as a T3S regulator required for *E. amylovora* pathogenicity as a *hrpJ* mutant displayed a reduced HR phenotype on *N. tabacum* and produced no disease symptoms on pear fruit (Nissinen et al., 2007). Bocsanczy et al. (2008) identified a direct interaction between HrpJ and the two harpins HrpN and HrpW. HrpJ was proposed to act as a chaperone to allow HrpN secretion, and both proteins are also required for DspA/E translocation, suggesting that HrpJ acts indirectly on the translocation of DspA/E by facilitating the secretion of HrpN (Nissinen et al., 2007; Bocsanczy et al., 2008). In *P. syringae pv. tomato*, the *hrpJ* mutant triggers a reduced HR in non-host tobacco plants and is also unable to provoke disease symptoms on *A. thaliana* (Fu et al., 2006). HrpJ was found to be required for the translocation of several T3Es (AvrB1, AvrRpt2, AvrPto1, AvrPtoB and HopB1; Fu et al., 2006). The secretion of the three harpins HrpZ1, HrpW1 and HopAK1, and of the translocon protein HrpK1 is HrpJ dependent (Fu et al., 2006; Crabill et al., 2012), whereas the pilus subunit HrpA1 is over-secreted in a *hrpJ* mutant (Crabill et al., 2012). These observations suggest that HrpJ controls the switch from secretion of the pilin to secretion of the harpins and of translocon proteins that are subsequently both involved in the interaction with the plant cell membrane. A *P. syringae* T3SS-deficient strain is able to grow

better when inoculated on transgenic *A. thaliana* expressing HrpJ than on wild-type plants, and triggers two-fold less callose deposition (Crabill et al., 2012). This result suggested a role *in planta* for HrpJ as a T3E plant innate immunity suppressor (Crabill et al., 2012; Wei and Collmer, 2012) distinct from its known regulatory role during the biogenesis of the T3SS. The fact that HpaA is addressed to plant cell nucleus during infection could also be an indication that such proteins may have dual roles, being both involved in the control of the translocation process in the bacterium and in a more specific function as a T3E once inside the plant cell.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The current knowledge on T3Cs in plant pathogenic bacteria makes apparent a major difference between T3SS export control in Hrp groups 1 and 2: control of T3E export mainly proceeds in group 1 through class IA chaperones whereas group 2 seems to require class IB chaperones (Figure 1). It remains to be determined if this dichotomy reflects fundamental differences in T3SS export control mechanisms or just results from evolutionary divergence. T3S4 domain proteins appear as key players in the control of the secretion process. Future progress on the mechanistic T3S control

will rely on more systematic identification of hetero-oligomeric protein complexes between the various T3SS control proteins identified, and on the evaluation of the different affinities between the interacting partners.

It is more than likely that T3S in bacterial plant pathogens is an ordered and sequential process, as demonstrated for T3SS of animal and human pathogens (Kubori and Nagai, 2011; Hicks and Galán, 2013). To date, observations supporting this view only relate on the assembly of the T3SS based on the discrimination between early and late T3SS substrates. However, there is still no direct evidence of a secretion hierarchy among T3Es in plant pathogens. This question of whether T3Es act in a coordinated spatial and temporal manner during host infection is particularly relevant for bacterial plant pathogens considering that they harbor large repertoires of translocated T3Es (Cunnac et al., 2009; Poueymiro and Genin, 2009). Future studies addressing this point should have important implications on T3E action inside host cells, as already demonstrated in other pathogens (Kubori and Galán, 2003). The recent development of microscopy-based assays opens exciting perspectives to provide a comprehensive description of dynamics of effector translocation and translocation temporal order (Mills et al., 2013).

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Nemo Peeters for critical reading of the manuscript. David Lohou was funded by a grant from the French Ministry of National Education and Research. Fabienne Vailleau work was supported by a French Agence Nationale de la Recherche grant (ANR-2010-JCJC-1710-01). Our work is performed at the LIPM that is part of the Laboratoire d'Excellence (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

REFERENCES

- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L. J., et al. (2005a). Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 56, 54–67. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04534.x
- Agrain, C., Sorg, I., Paroz, C., and Cornelis G. R. (2005b). Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol. Microbiol.* 57, 1415–1427. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04758.x
- Alegria, M. C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C., and Farah, C. S. (2004). New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. *J. Bacteriol.* 186, 6186–6197. doi: 10.1128/JB.186.18.6186-6197.2004
- Badel, J. L., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Shimizu, R., Collmer, A., and He, S. Y. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Mol. Microbiol.* 49, 1239–1251. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03647.x
- Badel, J. L., Shimizu, R., Oh, H. S., and Collmer, A. (2006). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 99–111. doi: 10.1094/MPMI-19-0099
- 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. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00471.x
- Botteaux, A., Sani, M., Kayath, C. A., Boekema, E. J., and Allaoui, A. (2008). Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism. *Mol. Microbiol.* 70, 1515–1528. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06499.x
- Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K., and Hutcheson, S. W. (2002). Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 45, 397–409. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03008.x
- Büttner, C. R., Cornelis, G. R., Heinz, D. W., and Niemann, H. H. (2005). Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci.* 14, 1993–2002. doi: 10.1110/ps.051474605
- Büttner, 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. doi: 10.1128/MMBR.05017-11
- Büttner, D., Gurlebeck, D., Noel, L. D., and Bonas, U. (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* 54, 755–768. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x
- Büttner, 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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04924.x
- Charity, J. C., Pak, K., Delwiche, C. F., and Hutcheson, S. W. (2003). Novel exchangeable effector loci associated with the *Pseudomonas syringae* hrp pathogenicity island: evidence for integron-like assembly from transposed gene cassettes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 495–507. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.6.495
- Cho, H. J., Park, Y. J., Noh, T. H., Kim, Y. T., Kim, J. G., Song, E. S., et al. (2008). Molecular analysis of the hrp gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microb. Pathog.* 44, 473–483. doi: 10.1016/j.micpath.2007.12.002
- Collazo, C. M., Zierler, M. K., and Galan, J. E. (1995). Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invL* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.* 15, 25–38. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02218.x
- Cornelis, G. R., and van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 735–774. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.735
- Crabill, E., Karpisek, A., and Alfano, J. R. (2012). The *Pseudomonas syringae* HrpJ protein controls the secretion of type III translocator proteins and has a virulence role inside plant cells. *Mol. Microbiol.* 85, 225–238. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08097.x
- Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 53–60. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.003
- Edqvist, P. J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., et al. (2003). YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J. Bacteriol.* 185, 2259–2266. doi: 10.1128/JB.185.7.2259-2266.2003
- Feldman, M. F., and Cornelis, G. R. (2003). The multitaleented type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 151–158. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00042-9
- Feng, F., and Zhou, J. M. (2012). Plant-bacterail pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 469–476. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.004
- Fu, Z. Q., Guo, M., and Alfano, J. R. (2006). *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 Harpin. *J. Bacteriol.* 188, 6060–6069. doi: 10.1128/JB.00718-06
- Furutani, A., Takaoka, M., Sanada, H., Noguchi, Y., Oku, T., Tsuno, K., et al. (2009). Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 96–106. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0096
- Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J. P., and Barny, M. A. (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. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.6442015.x
- Gaudriault, S., Paulin, J. P., and Barny, M. A. (2002). The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Mol. Plant Pathol.* 3, 313–320. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00124.x

- Guo, M., Chancey, S. T., Tian, F., Ge, Z., Jamir, Y., and Alfano, J. R. (2005). *Pseudomonas syringae* type III chaperones ShcO1, ShcS1, and ShcS2 facilitate translocation of their cognate effectors and can substitute for each other in the secretion of HopO1-1. *J. Bacteriol.* 187, 4257–4269. doi: 10.1128/JB.187.12.4257-4269.2005
- Guo, W., Cai, L. L., Zou, H. S., Ma, W. X., Liu, X. L., Zou, L. F., et al. (2012). Ketoglutarate transport protein KgtP is secreted through the type III secretion system and contributes to virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5672–5681. doi: 10.1128/AEM.07997-11
- Hartmann, N., and Büttner, D. (2013). The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* is involved in substrate docking during type III secretion. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 1176–1189. doi: 10.1094/MPMI-01-13-0019-R
- Hartmann, N., Schulz, S., Lorenz, C., Fraas, S., Hause, G., and Büttner, D. (2012). Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* 158, 1334–1349. doi: 10.1099/mic.0.057604-0
- He, S. Y., Nomura, K., and Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 181–206. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.03.011
- Hicks, S. W., and Galán, J. E. (2013). Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 316–326. doi: 10.1038/nrmicro3009
- 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. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01019.x
- Janjusevic, R., Quezada, C. M., Small, J., and Stebbins, C. E. (2013). Structure of the HopA1(21-102)-ShcA chaperone-effector complex of *Pseudomonas syringae* reveals conservation of a virulence factor binding motif from animal to plant pathogens. *J. Bacteriol.* 195, 658–664. doi: 10.1128/JB.01621-12
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G. R. (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302, 1757–1760. doi: 10.1126/science.1091422
- Kabisch, U., Landgraf, A., Krause, J., Bonas, U., and Boch, J. (2005). Type III secretion chaperones ShcS1 and ShcO1 from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 bind more than one effector. *Microbiology* 151, 269–280. doi: 10.1099/mic.0.27491-0
- Kubori, T., and Galán, J. E. (2003). Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* 115, 333–342. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00849-3
- Kubori, T., and Nagai, H. (2011). Bacterial effector-involved temporal and spatial regulation by hijack of the host ubiquitin pathway. *Front. Microbiol.* 2:145. doi: 10.3389/fmicb.2011.00145
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., and Galan, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10225–10230. doi: 10.1073/pnas.170128997
- Lillington, J. E., Lovett, J. E., Johnson, S., Roversi, P., Timmel, C. R., and Lea, S. M. (2011). *Shigella flexneri* Spa15 crystal structure verified in solution by double electron electron resonance. *J. Mol. Biol.* 405, 427–435. doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.053
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R., and Collmer, A. (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol. Microbiol.* 54, 353–365. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04285.x
- Lorenz, C., and Büttner, D. (2009). Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 191, 1414–1428. doi: 10.1128/JB.01446-08
- Lorenz, C., and Büttner, D. (2011). Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol. Microbiol.* 79, 447–467. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07461.x
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U., and Büttner, D. (2008a). HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol. Microbiol.* 69, 344–360. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06280.x
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U., and Büttner, D. (2008b). HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog.* 4:e1000094. doi: 10.1371/journal.ppat.1000094
- Losada, L. C., and Hutcheson, S. W. (2005). Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol. Microbiol.* 55, 941–953. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04438.x
- Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M., Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A., et al. (2002). Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J. Bacteriol.* 184, 3433–3441. doi: 10.1128/JB.184.13.3433-3441.2002
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M., and Galan, J. E. (2006). Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* 441, 637–640. doi: 10.1038/nature04822
- Mills, E., Baruch, K., Aviv, G., Nitzan, M., and Rosenshine, I. (2013). Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *MBio* 4, 4. doi: 10.1128/mBio.00303-13
- Morello, J. E., and Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* HrpP is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate-switching protein. *J. Bacteriol.* 191, 3120–3131. doi: 10.1128/JB.01623-08
- Mukaihara, T., Tamura, N., and Iwabuchi, M. (2010). Genome-wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new functional screen. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 251–262. doi: 10.1094/MPMI-23-3-0251
- Mukaihara, T., Tamura, N., Murata, Y., and Iwabuchi, M. (2004). Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 54, 863–875. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04328.x
- Nissinen, R. M., Ytterberg, A. J., Bogdanove, A. J., van Wijk, K. J., and Beer, S. V. (2007). Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol. Plant Pathol.* 8, 55–67. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00370.x
- Oh, C. S., Carpenter, S. C., Hayes, M. L., and Beer, S. V. (2010). Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 156, 1211–1220. doi: 10.1099/mic.0.027144-0
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Mansfield, J. W., and Beuzon, C. R. (2010). Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 682–701. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0682
- Parsot, C., Hamiaux, C., and Page, A. L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 7–14. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00002-4
- Poueymiro, M., and Genin, S. (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 44–52. doi: 10.1016/j.mib.2008.11.008
- Preston, G., Deng, W. L., Huang, H. C., and Collmer, A. (1998). Negative regulation of hrp genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J. Bacteriol.* 180, 4532–4537.
- Ramos, A. R., Morello, J. E., Ravindran, S., Deng, W. L., Huang, H. C., and Collmer, A. (2007). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J. Bacteriol.* 189, 5773–5778. doi: 10.1128/JB.00435-07
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* 38, 828–838. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02173.x
- Schulz, S., and Büttner, D. (2011). Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Infect. Immun.* 79, 2998–3011. doi: 10.1128/IAI.00180-11
- Shan, L., Oh, H. S., Chen, J., Guo, M., Zhou, J., Alfano, J. R., et al. (2004). The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 447–455. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.5.447
- Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Bastaki, M. N., Sarris, P. F., Charova, S. N., et al. (2010). Playing the “Harp”: evolution of our understanding of hrp/hrc genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 347–370. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114407

- Triplett, L. R., Melotto, M., and Sundin, G. W. (2009). Functional analysis of the N terminus of the *Erwinia amylovora* secreted effector DspA/E reveals features required for secretion, translocation, and binding to the chaperone DspB/F. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1282–1292. doi: 10.1094/MPMI-22-10-1282
- Triplett, L. R., Wedemeyer, W. J., and Sundin, G. W. (2010). Homology-based modeling of the *Erwinia amylovora* type III secretion chaperone DspF used to identify amino acids required for virulence and interaction with the effector DspE. *Res. Microbiol.* 161, 613–618. doi: 10.1016/j.resmic.2010.05.015
- van Dijk, K., Tam, V. C., Records, A. R., Petnicki-Ocwieja, T., and Alfano, J. R. (2002). The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 44, 1469–1481. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02979.x
- van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P., and Boucher, C. (2002). Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* 44, 935–946. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02936.x
- Vujanac, M., and Stebbins, C. E. (2013). Context-dependent protein folding of a virulence peptide in the bacterial and host environments: structure of an SycH-YopH chaperone-effector complex. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 546–554. doi: 10.1107/S0907444912051086
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Hugué, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T. K., et al. (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. doi: 10.1128/JB.187.7.2458-2468.2005
- Wehling, M. D., Guo, M., Fu, Z. Q., and Alfano, J. R. (2004). The *Pseudomonas syringae* HopPtoV protein is secreted in culture and translocated into plant cells via the type III protein secretion system in a manner dependent on the ShcV type III chaperone. *J. Bacteriol.* 186, 3621–3630. doi: 10.1128/JB.186.11.3621-3630.2004
- Wei, C. F., Deng, W. L., and Huang, H. C. (2005). A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 57, 520–536. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04704.x
- Wei, H. L., and Collmer, A. (2012). Multiple lessons from the multiple functions of a regulator of type III secretion system assembly in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 85, 195–200. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08119.x
- Zou, L. F., Wang, X. P., Xiang, Y., Zhang, B., Li, Y. R., Xiao, Y. L. et al., (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. doi: 10.1128/AEM.00511-06

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 August 2013; accepted: 12 October 2013; published online: 22 November 2013.

Citation: Lohou D, Lonjon F, Genin S and Vaillau F (2013) Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Front. Plant Sci.* 4:435. doi: 10.3389/fpls.2013.00435

This article was submitted to *Plant-Microbe Interaction*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2013 Lohou, Lonjon, Genin and Vaillau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III.2.3. Focus sur les bactéries pathogènes d'animaux

Chez les bactéries pathogènes d'animaux, la longueur de l'aiguille est définie au sein d'une espèce, suggérant un contrôle strict : autour de 45 nm pour *Shigella* spp. (Blocker *et al.*, 2001), 60 nm pour *Yersinia* spp. (Journet *et al.*, 2003) et 80 nm pour *Salmonella* spp. (Kubori *et al.*, 1998). D'autre part, si on considère que l'aiguille doit être assemblée avant la mise en place du translocon et la translocation des ET3s, alors un changement de spécificité de substrat du SST3 doit être effectué, permettant une transition entre sécrétion de la sous-unité de l'aiguille (substrat précoce) et sécrétion des protéines du translocon et des ET3s (substrats intermédiaires). De la même manière, la translocation des ET3s dans le cytoplasme de la cellule hôte requiert la mise en place préalable du translocon. Il est donc probable qu'une hiérarchie ait lieu, permettant la sécrétion des ET3s (substrats tardifs) après celle des protéines du translocon (substrats intermédiaires). Enfin, il semble qu'une hiérarchie de sécrétion existe également au sein du répertoire d'ET3s, reflétant vraisemblablement les différentes fonctions qu'exercent les ET3s au cours du processus infectieux.

III.2.3.1. Hiérarchie parmi les ET3s : encore les chaperonnes

Outre le rôle des CT3s abordé précédemment, comme actrices de la reconnaissance par le SST3 des protéines vouées à être sécrétées, certaines études suggèrent une implication de ces chaperonnes dans l'établissement d'une hiérarchie de sécrétion au sein du pool d'ET3s. Chez *Yersinia* spp., l'ET3 YopE est chaperonné par SycE. La délétion du domaine d'interaction de YopE avec sa chaperonne abolit la translocation de l'ET3 chez la souche sauvage mais pas chez un mutant multiple d'ET3s (Boyd *et al.*, 2000). Cette observation suggère qu'il existe une compétition dans l'accès des ET3s au SST3, à laquelle les CT3s participent en conférant des avantages aux ET3s cibles.

Chez *E. coli*, la chaperonne CesT contrôle la sécrétion d'un groupe d'ET3s dont la protéine Tir. La sécrétion de Tir précède et est nécessaire à la sécrétion des autres ET3s (Thomas *et al.*, 2007 ; Mills *et al.*, 2008 ; Vingadassalom *et al.*, 2010). Il

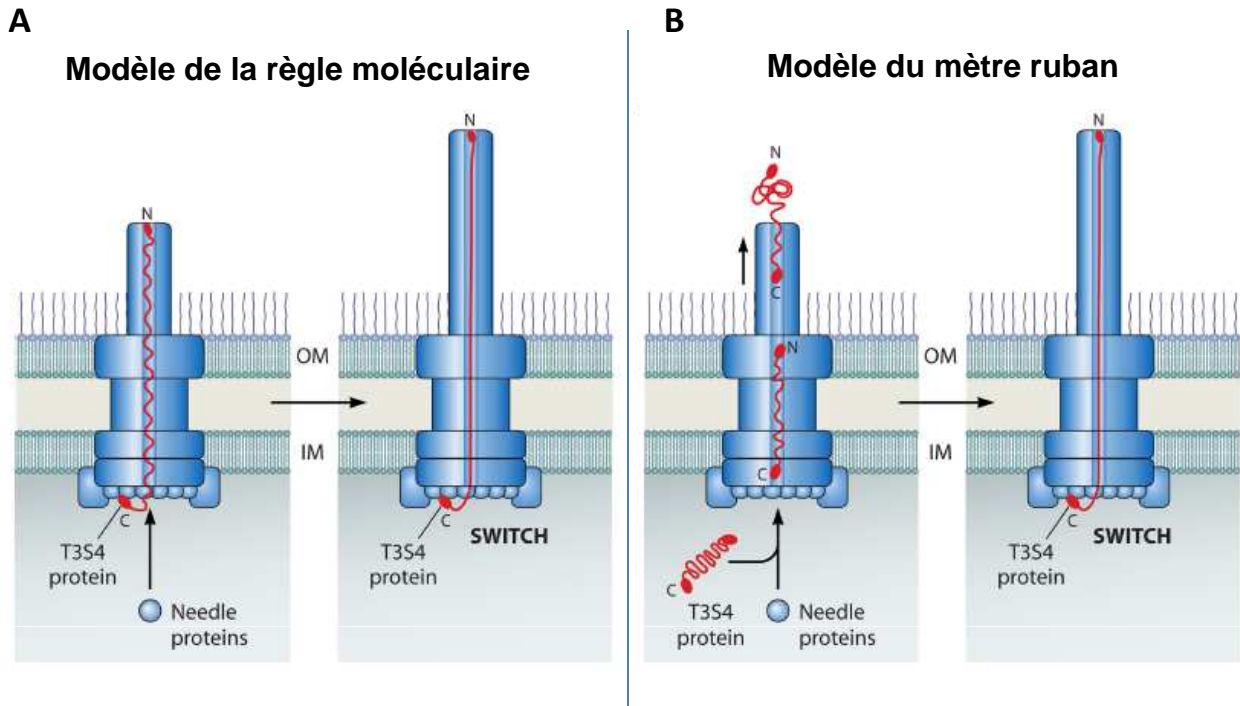


Figure 22. Modèles proposés pour le mode d'action des protéines à domaine T3S4 (type III secretion substrate specificity switch) dans la transition de spécificité de substrat chez les bactéries pathogènes d'animaux. A) Chez *Yersinia* spp. a été proposé un modèle selon lequel YscP agit comme une règle moléculaire déterminant la longueur de l'aiguille. Les domaines C-terminal et N-terminal d'une seule copie de la protéine T3S4 interagiraient respectivement avec YscU à la base du SST3 et avec l'extrémité distale de l'aiguille en cours d'assemblage. Lorsque la longueur de l'aiguille correspond à celle de la protéine YscP complètement étirée, un signal est envoyé vers la base du SST3, probablement *via* l'interaction entre YscP et YscU, aboutissant à la transition de spécificité de substrat. B) Le modèle dit du mètre ruban est une variante, proposée pour *Shigella*, du modèle de la règle moléculaire. Il a été proposé que Spa32 soit sécrété continuellement pendant la croissance de l'aiguille et qu'une interaction avec la base du SST3 ne se produise que lorsque la longueur de l'aiguille est atteinte, induisant la transition de spécificité de substrat (Büttner, 2012). OM : outer membrane ; IM : inner membrane.

a été proposé que l'interaction de Tir avec CesT empêche l'inhibition de la sécrétion par une accumulation de CesT à l'entrée du SST3, et que la libération et la sécrétion de Tir permette dans un deuxième temps la prise en charge des autres ET3s par CesT. Le fait que CesT et Tir sont cotranscrits pourrait expliquer une interaction préférentielle de la chaperonne avec cet ET3 (Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001).

III.2.3.2. Les protéines de type T3S4

Plusieurs études ont montré que le contrôle de la longueur de l'aiguille et de la transition de spécificité de substrat implique les protéines de type T3S4 (type III secretion substrate specificity switch) caractérisées chez plusieurs espèces pathogènes d'animaux : YscP chez *Yersinia* spp., Spa32 chez *Shigella* spp. et InvJ chez *Salmonella* spp. Ces protéines ne partagent qu'une faible homologie de séquence mais possèdent un domaine structural conservé dans la région C terminale, appelé domaine T3S4 (Agrain *et al.*, 2005). Les protéines T3S4 semblent interagir avec les protéines de la famille YscU, composants de l'appareil d'export du SST3. Cette interaction induirait un changement conformationnel de la région C-terminale de YscU et de ses homologues, aboutissant à la transition de spécificité de substrat (Edqvist *et al.*, 2003 ; Zarivach *et al.*, 2008).

A ce jour, les données disponibles ont permis d'aboutir à différents modèles d'action des protéines T3S4 selon l'espèce bactérienne considérée (Figure 22).

Modèle de la règle moléculaire :

Chez *Yersinia* spp. a été proposé un modèle selon lequel YscP agit comme une règle moléculaire déterminant la longueur de l'aiguille. Les domaines C-terminal et N-terminal d'une seule copie de la protéine T3S4 interagiraient respectivement avec YscU à la base du SST3 et avec l'extrémité distale de l'aiguille en cours d'assemblage (Wagner *et al.*, 2010) (Figure 22 A). Lorsque la longueur de l'aiguille correspond à celle de la protéine YscP complètement étirée, un signal est envoyé vers la base du SST3, probablement *via* l'interaction entre YscP et YscU, aboutissant à la transition de spécificité de substrat. Cette hypothèse est notamment soutenue par l'observation que des délétions et insertions plus ou moins importantes de YscP induisent des aiguilles de longueurs proportionnelles (Journet *et al.*, 2003).

Modèle du mètre ruban :

Le modèle dit du mètre ruban est une variante, proposée pour *Shigella* spp., du modèle de la règle moléculaire. A l'instar de ce dernier, la protéine T3S4 Spa32 interagirait *via* ses domaines C-terminal et N-terminal à Spa40 (homologue de YscU) et à l'extrémité distale de l'aiguille en croissance, respectivement (Botteaux *et al.*, 2008). De manière intéressante, Spa32 est fonctionnellement interchangeable avec YscP. Cependant, des délétions dans Spa32 n'induisent pas de réduction de la longueur de l'aiguille, suggérant un mécanisme différent de celui proposé dans le cadre du modèle de la règle moléculaire (Botteaux *et al.*, 2008). Il a ainsi été proposé que la protéine Spa32 soit sécrétée continuellement pendant la croissance de l'aiguille et qu'une interaction avec la base du SST3 ne se produise que lorsque la longueur de l'aiguille est atteinte, induisant la transition de spécificité de substrat (Figure 22 B). Ce modèle rejoint le modèle du mètre ruban proposé pour le contrôle de la longueur du crochet flagellaire (Moriya *et al.*, 2006).

Modèle centré sur l'assemblage de la tige interne :

D'autres observations chez *Yersinia* spp. et *Salmonella* spp. ont conduit à émettre l'hypothèse que la transition de spécificité de substrat pourrait être contrôlée par l'assemblage de la tige interne périplasmique (composée de YscI et PrgJ, respectivement), lui-même contrôlé par les protéines T3S4. Ce modèle repose sur le fait qu'en l'absence de protéine T3S4, YscI est sur-sécrété et la quantité de PrgJ liée à l'aiguille est diminuée par rapport à la souche sauvage (Sukhan *et al.*, 2003 ; Wood *et al.*, 2008). D'autre part, des mutations dans YscU suppriment la dérégulation de l'aiguille chez un mutant *yscP* et restaurent également un niveau de sécrétion normal de YscI (Wood *et al.*, 2008).

III.2.3.3. Les protéines de la famille YopN

Plusieurs travaux suggèrent l'existence d'une hiérarchie de sécrétion entre les protéines du translocon et les ET3s, bien que les mécanismes d'un tel contrôle restent encore mal compris. Chez la plupart des bactéries pathogènes d'animaux a été mise en avant l'implication de protéines assimilées à des gardiennes de l'entrée du SST3, appartenant à la famille YopN. Chez *P. aeruginosa*, la sécrétion des ET3s nécessite la sécrétion de PopN, l'homologue de YopN (Sundin *et al.*, 2004 ; Yang *et*

al., 2007). En revanche, la non-sécrétion de PopN n'inhibe pas la sécrétion des protéines du translocon, suggérant un rôle négatif opéré spécifiquement sur la sécrétion des ET3s (Cisz *et al.*, 2008). Chez *Salmonella* spp., *Shigella* spp. et *E. coli*, les mutants d'homologues de YopN exhibent une diminution de la sécrétion des protéines du translocon, en plus d'une augmentation de celle des ET3s (Kubori & Galan, 2002 ; Deng *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2008 ; Martinez-Argudo & Blocker, 2010 ; Yu *et al.*, 2010). Ceci suggère que les protéines gardiennes jouent un double rôle, positif et négatif, sur la sécrétion des protéines du translocon et celle des ET3s, respectivement.

PROJET DE THESE

Contrairement à la régulation transcriptionnelle, très peu de données existent quant aux protéines impliquées dans l'orchestration du processus de sécrétion de type III chez *R. solanacearum*. De telles informations revêtent pourtant un intérêt certain dans l'objectif de mieux comprendre la dynamique de sécrétion des substrats de type III, et notamment des ET3s, au cours de l'infection. C'est particulièrement vrai concernant *R. solanacearum* qui présente un répertoire d'ET3s singulièrement important et dont les fonctions individuelles sont largement inconnues. L'objectif de cette thèse a ainsi été de contribuer à la caractérisation de protéines impliquées dans le contrôle de la sécrétion de type III chez la souche de référence GMI1000 de *R. solanacearum*.

Le premier volet des travaux, objet du chapitre I des Résultats de ce manuscrit, a consisté à débiter la caractérisation de CT3s putatives chez la souche GMI1000. A ce jour, aucune CT3 de *R. solanacearum* n'a fait l'objet d'une étude, hormis la protéine HpaB. Outre son homologie avec la CT3 du même nom caractérisée chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, la protéine HpaB a été étudiée chez la souche RS1000 de *R. solanacearum*. Le mutant *hpaB* n'élicite ni symptômes de HR sur Tabac, ni symptômes de maladie après inoculation foliaire ou directement dans la tige de plantes d'Aubergine (Mukaihara *et al.*, 2004). En revanche, le mutant *hpaB* semble capable de produire des pili de type III à l'image de la souche sauvage, suggérant que HpaB ne soit pas un composant structural du SST3. Par ailleurs, HpaB est requis pour la translocation de 66 ET3s sur les 72 identifiés dans cette souche (Mukaihara *et al.*, 2010). Il est donc vraisemblable que HpaB agisse comme une CT3 qui contrôle la translocation d'un large panel d'ET3s. Les travaux présentés dans le chapitre I de la partie Résultats portent sur la caractérisation de la protéine HpaB chez la souche GMI1000, et de deux autres CT3s putatives : RSp0848 et RSc2897, renommées respectivement HpaD et FlIT-like. Le rôle de ces protéines a été étudié à travers leur implication dans des interactions protéine-protéine et dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Le deuxième volet du travail de thèse a été consacré à un membre d'une autre famille de régulateurs du processus de sécrétion que sont les protéines de type T3S4. Au cours de la dernière décennie, un nombre croissant d'études ont été consacrées à la compréhension du rôle de cette famille de protéines chez les bactéries pathogènes d'animaux. Bien qu'un rôle général commun dans la transition

de spécificité de substrat du SST3 leur soit attribué, différents modèles mécanistiques sont aujourd'hui proposés en fonction de l'espèce étudiée. Les connaissances sur ces protéines T3S4 sont en revanche bien moins avancées concernant les bactéries phytopathogènes. Chez *R. solanacearum*, Agrain *et al.* (2005) et Lorenz *et al.* (2008) ont identifié une faible homologie de séquence peptidique entre la protéine HpaP et les protéines T3S4 de *Yersinia pestis* (YscP) et *X. campestris* pv. *vesicatoria* (HpaC). La présence de structures secondaires conservées, définissant le domaine T3S4, a également été mise en évidence chez HpaP (Agrain *et al.*, 2005). Les seules données expérimentales publiées à ce jour suggèrent qu'un mutant *hpaP* est réduit dans sa capacité à induire la HR sur Tabac et les symptômes de maladie sur Tomate (van Gijsegem *et al.*, 2002). D'autres travaux plus récents sur le pathosystème *M. truncatula* / *R. solanacearum* (Vaillau *et al.*, 2007), avec le criblage de mutants d'ET3s et de gènes associés au SST3, ont mené à l'identification de HpaP comme facteur de virulence strictement requis pour la virulence de *R. solanacearum* sur *M. truncatula* (F. Vaillau, données non publiées).

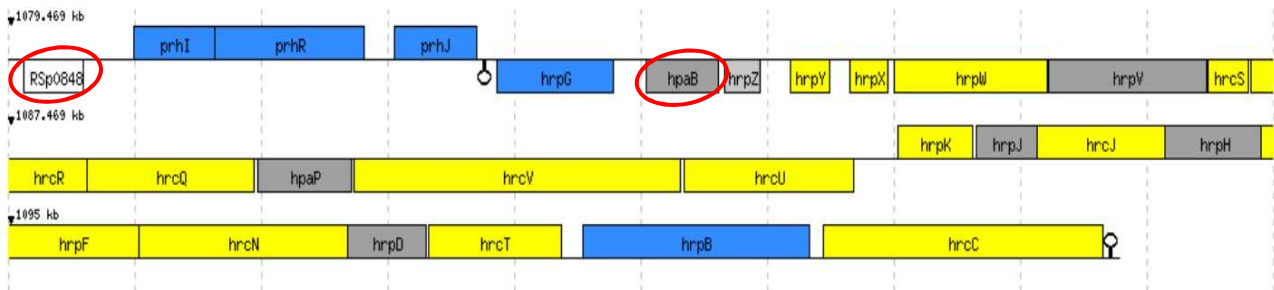
Le deuxième volet de ces travaux de thèse, présentés en chapitre II des Résultats, a donc été consacré à la caractérisation de la protéine T3S4 putative HpaP. L'objectif a consisté à fournir des éléments de compréhension de la fonction de cette protéine, en validant ou non sa potentielle implication dans le contrôle de la sécrétion de type III. Pour ce faire, des études d'interaction protéine-protéine, de sécrétion, de translocation et de pouvoir pathogène ont été réalisées avec le mutant *hpaP*. Des versions de délétion d'acides aminés conservés du domaine T3S4 C-terminal ont également été générées pour analyser plus précisément la fonction de ce domaine protéique.

RESULTATS

A

	kDa	pI	Homologue (% identité)
HpaB (RSp0853)	16,8	4,4	HpaB _{Xcv} (49,7)
HpaD (RSp0848)	13,9	4,2	-
FliT-like (RSc2897)	13,6	9,2	FliT _{Rs} (49,2)
RSc1474	17,1	4,5	-

B



C

```

FliT-like (RSc2897) MSRTLATPRTPOGNDSLFASYEAIASLSTEMVEAAEAGDWAGVSALERECALYMERLGRT
FliT                MFRNLPI----KDSESLFICYEAIARLTAEMVAAADVGNWEVSTLERESATYVEMLRRS
                   * * . * .      : . . : * * * . * * * * * * * : * : * * * * * * * * * * * * * :
FliT-like (RSc2897) PSRPVLSEAELEARRKRDLMRLANDARVRALVCPRQDQLLRPMDAARRSIGARQAYAAVSYY
FliT                EPHPLSHADLERKRALLVRILEDDARVRVVHPRLDRLQKRI DTARRASNASLAYGSMARF
                   . : * * * . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :
  
```

Figure 23. Les CT3s putatives de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.

A) Caractéristiques des quatre CT3s putatives HpaB, HpaD, FliT-like et RSc1474. kDa : kilo Daltons ; pI : point isoélectrique ; Xcv : *X. campestris* pv. *vesicatoria* souche 85-10. Rs : *R. solanacearum* souche GMI1000. B) Représentation schématique du contexte génomique des CT3s putatives HpaD (RSp0848) et HpaB (cercles rouges). Les gènes affichés définissent le cluster *hrp*. En jaune : constituants du SST3 ; en bleu : régulateurs transcriptionnels ; en gris : fonction inconnue. Les lignes verticales en pointillés délimitent 1000 pb (accessible via <https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cg>). C) Alignement des séquences peptidiques de FliT-like et de la chaperonne flagellaire FliT de *R. solanacearum* GMI1000, à l'aide du programme MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Les degrés de conservation sont représentés par des astérisques (conservation), double points (substitution conservative) et points (substitution semi-conservative).

CHAPITRE I

CARACTERISATION DE CHAPERONNES DE TYPE III PUTATIVES CHEZ *R. SOLANACEARUM*

I. Les chaperonnes de type III putatives chez la souche GMI1000

Chez la souche modèle GMI1000 de *R. solanacearum*, quelques CT3s putatives ont été identifiées. Ces candidats regroupent HpaB (RSp0853), HpaD (RSp0848), FliT-like (RSc2897) et RSc1474 (Figure 23 A). HpaB n'est autre que l'homologue d'une protéine du même nom chez *Xanthomonas* spp., d'ores et déjà caractérisée fonctionnellement comme une CT3 de classe IB (Büttner *et al.*, 2004 ; Büttner *et al.*, 2006). Chez *R. solanacearum* GMI1000, à l'instar de HpaB, les trois autres CT3s candidates sont régulées positivement par le régulateur transcriptionnel HrpB, qui centralise le contrôle de l'expression des protéines liées au SST3 (Cunnac *et al.*, 2004b ; Occhialini *et al.*, 2005). De manière cohérente, la présence d'une boîte *hrpII* a été mise en évidence au niveau des régions promotrices des gènes codant pour ces quatre CT3s putatives (Cunnac *et al.*, 2004a). Plusieurs autres éléments viennent soutenir l'hypothèse d'un rôle de CT3 pour ces protéines. Dans l'ensemble, leurs caractéristiques physico-chimiques correspondent à celles décrites pour les CT3s (Parsot *et al.*, 2003 ; Thomas *et al.*, 2012) : une taille relativement petite, comprise entre 15 et 20 kDa, et un caractère acide avec un point isoélectrique (pI) compris entre 4 et 5 (Figure 23 A). RSc2897 fait figure d'exception, avec un pI de 9,2. Cette protéine présente en revanche une forte homologie avec Fli-T (49,2 % d'identité), une chaperonne du système flagellaire, ce qui en fait tout de même un candidat comme CT3. D'autre part, un crible à l'échelle du génome de *R. solanacearum*, visant à identifier les protéines transloquées dans la cellule

Tableau 4. Liste des protéines de fusion générées pour les tests d'interaction en double-hybride chez la levure.

Code	Nom	Fusion AD	Fusion BD	Caractéristiques
RSc0041	RipI	x		
RSc0245	RipB	x		inosine-uridine nucléoside N-ribohydrolase
RSc0824	RipAG	x	x	
RSc0826	RipP1 (PopP1)	x	x	famille YopJ/AvrRxv ; putative acétyltransférase
RSc0868	RipP2 (PopP2)	x	x	famille YopJ/AvrRxv ; acétyltransférase
RSc1349	RipV1	x		famille Ssph1 ; domaine ubiquitine ligase
RSc1356	RipG6 (GALA6)	x	x	domaines F-box et LRR
RSc1357	RipG7 (GALA7)	x	x	domaines F-box et LRR
RSc1386	RipH1 (HLK1)	x		
RSc1800	RipG4 (GALA4)	x	x	domaines F-box et LRR
RSc1801	RipG5 (GALA5)	x	x	domaines F-box et LRR
RSc1815	RipTAL	x		famille TAL
RSc2101	RipAJ	x	x	
RSc2139	RipA1 (AWR1)	x		
RSc2359	RipAK	x	x	
RSc2775	RipW (PopW)	x	x	harpine
RSc3272	RipAM	x		
RSp0028	RipG3 (GALA3)	x	x	domaines F-box et LRR
RSp0099	RipA2 (AWR2)	x		
RSp0160	RipH3 (HLK3)	x		
RSp0215	RipH2 (HLK2)	x		
RSp0216		x		ET3 candidat ; domaine sérine/thréonine kinase
RSp0218		x		
RSp0323	RipO1	x	x	
RSp0731	RipTPS	x		tréhalose-phosphate synthase
RSp0732	RipAV	x	x	
RSp0822	RipAF1	x	x	famille AvrPphF ; putative ADP-ribosyltransférase
RSp0845	RipAN	x		
RSp0847	RipA4 (AWR4)	x		
RSp0846	RipA3 (AWR3)	x		
RSp0882		x		
RSp0914	RipG1 (GALA1)	x	x	domaines F-box et LRR
RSp1022	RipAY	x		
RSp1024	RipA5 (AWR5)	x		
RSp1031	RipZ	x		
RSp1212	RipU	x		
RSp1277	RipQ	x		
RSp1281	RipR	x		
RSp1475	RipAW	x	x	domaine ubiquitine ligase
RSp1582	RipAZ1	x	x	
RSp1601	RipAD	x	x	

AD et BD : domaines d'activation et de liaison à l'ADN de Gal4, respectivement.

végétale par le SST3, n'a pas révélé HpaB, HpaD, FliT-like ou RSc1474, suggérant que ces protéines ne sont pas des ET3s (Mukaihara *et al.*, 2010).

HpaB, HpaD, FliT-like et RSc1474 semblent donc être de bons candidats pour occuper des fonctions de CT3s. Le gène codant pour RSc1474 présente la particularité d'être localisé juste à côté du gène codant pour l'ET3 RipM (RSc1475) et est probablement co-transcrit avec ce dernier (Occhialini *et al.*, 2005). Cette caractéristique est typique des CT3s de classe IA, spécifiques d'un seul ET3. Le rôle de RSc1474 est ainsi très probablement restreint à la sécrétion du seul ET3 RipM, dont l'absence n'apparaît pas impacter le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* (S. Genin, données personnelles). Lors de ces travaux de thèse, le choix a été fait de se concentrer sur des CT3s putatives qui puissent être plus largement impliquées dans le contrôle de la sécrétion des ET3s. La protéine RSc1474 a donc été écartée de cette étude. Nos travaux se sont portés sur les protéines HpaB, HpaD (renommée ainsi car le gène *RSp0848* est situé en bordure du cluster *hrp* codant pour le SST3 ; Figure 23 B) et FliT-like (renommée ainsi car la protéine RSc2897 partage une certaine homologie de séquence avec la protéine FliT ; Figure 23 C).

II. HpaB et HpaD interagissent spécifiquement avec certains ET3s

Nous nous sommes concentrés sur un premier crible avec les protéines HpaB et HpaD, localisées au niveau du cluster *hrp*, afin d'identifier des ET3s pouvant interagir avec ces CT3s putatives. Une approche sans *a priori* en double-hybride chez la levure a été menée, permettant de tester un nombre important d'ET3s en un temps relativement court. Parmi les 74 ET3s identifiés chez la souche GMI1000, 41 étaient clonés et disponibles dans l'équipe. Ces 41 ET3s, ainsi que HpaB et HpaD, ont été sous-clonés dans des vecteurs d'expression chez la levure permettant l'expression des protéines fusionnées au domaine d'activation (AD pour activation domain) du facteur de transcription GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Tableau 4). En revanche, en raison de problèmes techniques, seuls HpaB, HpaD et 18 ET3s ont pu être fusionnés au domaine de liaison à l'ADN (BD pour binding domain) de Gal4, ne permettant donc pas de tester toutes les interactions dans les deux sens. Un premier crible a été réalisé sans l'utilisation de témoins négatifs d'interaction et a

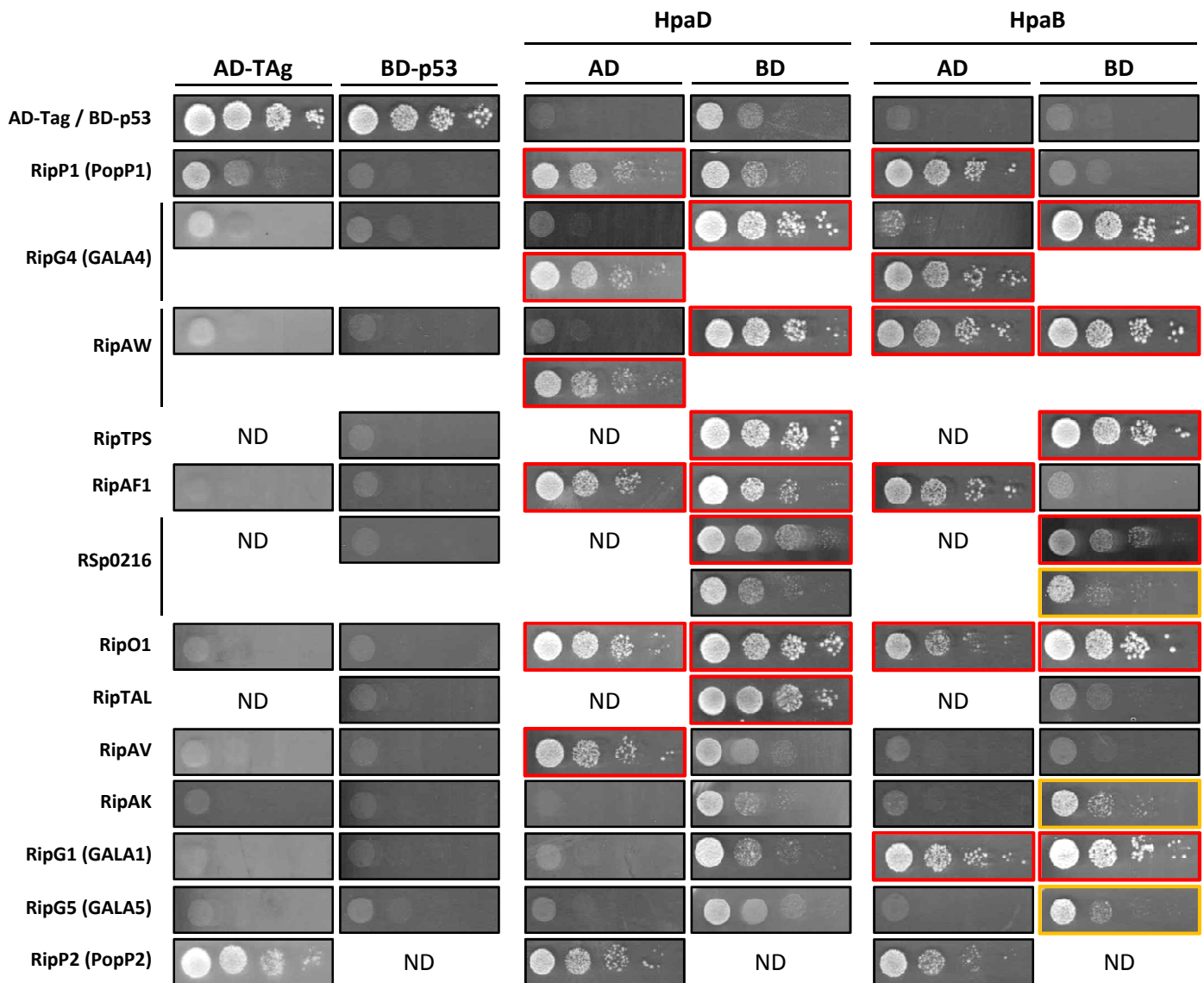


Figure 24. Les CT3s putatives HpaD et HpaB interagissent avec plusieurs ET3s. Les interactions entre les chaperonnes et les ET3s ont été testées par double-hybride chez la levure dans un ou les deux sens d'interaction, en fonction du matériel généré. Par soucis de place, seules les croissances des levures sur le milieu sélectif sans histidine (révélant l'interaction) sont représentées. Lorsque les deux répétitions biologiques ont donné des résultats différents, ceux-ci sont présentés l'un sous l'autre. Les résultats sont encadrés en rouge et orange selon qu'ils suggèrent fortement ou faiblement une interaction, respectivement. Les protéines de fusion AD-TAg (antigène T) et BD-p53 sont utilisées comme témoins. AD : domaine d'activation ; BD : domaine de liaison à l'ADN.

permis de réduire le nombre d'ET3s potentiellement ciblés par HpaB et/ou HpaD à 14 candidats. Un second crible, incluant les témoins négatifs, a abouti à l'observation d'une croissance cellulaire sur milieu sélectif pour 19 couples CT3-ET3, impliquant 12 ET3s différents : sept d'entre eux (PopP1, Gala4, RipAW, RipTPS, RipAF1, RSp0216 et RipO1) semblent interagir avec les deux CT3s putatives à la fois, alors que respectivement 2 ET3s (RipTAL et RipAV) et trois ET3s (Gala1, Gala5 et RipAK) paraissent interagir spécifiquement avec HpaD et HpaB (Figure 24). Lors de ces tests d'interaction, tous les contrôles négatifs d'interaction ont été validés, indiquant que les interactions positives révélées sont spécifiques, hormis pour l'ET3 PopP2. En effet, la croissance sur milieu sélectif observée pour les levures contrôle exprimant l'appât BD-PopP2 et la proie AD-TAg (Antigène T viral) suggère une forte capacité de BD-PopP2 à auto-activer l'expression du gène rapporteur, ne permettant pas de conclure quant à une éventuelle interaction entre PopP2 et HpaB ou HpaD (Figure 24). Globalement, ces résultats suggèrent que les CT3s putatives HpaB et HpaD sont capables d'interagir avec de nombreux ET3s. De plus, certains couples CT3-ET3 paraissent spécifiques, alors qu'un nombre plus important d'ET3s testés semblent interagir à la fois avec HpaB et HpaD. La figure 25 dresse le bilan des interactions positives mises en évidence.

III. Les CT3s putatives s'associent de manière homo et/ou hétéromérique

Les CT3s interagissent classiquement sous forme d'homodimères avec leur ET3s cibles. Pour tester la capacité de HpaB, HpaD et FliT-like à interagir avec elles-mêmes, des tests d'interaction en double-hybride chez la levure ont été réalisés. Les résultats révèlent que HpaD et FliT-like sont capable d'interagir avec elles-mêmes (Figure 26). A l'inverse, aucune interaction n'a été détectée pour HpaB.

Les résultats précédents ont révélé que les CT3s putatives HpaB et HpaD interagissent avec un groupe commun d'ET3s. Ceci pourrait suggérer que les deux protéines soient impliquées conjointement dans la sécrétion de ces ET3s. Si tel est le cas, il est envisageable que ces CT3s putatives puissent interagir également entre elles. Leur aptitude à former de tels complexes protéiques a été testée par double-hybride chez la levure, dans les deux sens d'interaction. Aucune interaction entre

ET3s	AD-HpaD	BD-HpaD	AD-HpaB	BD-HpaB
RipP1 (PopP1)				
RipG4 (Gala4)				
RipAW				
RipTPS	ND		ND	
RipAF1				
RSp0216	ND		ND	
RipO1				
RipTAL	ND		ND	
RipAV				
RipAK				
RipG1 (Gala1)				
RipG5 (Gala5)				

Figure 25. Schéma récapitulatif des interactions identifiées entre les ET3s et les CT3s putatives HpaD et HpaB. Les ET3s sont colorés selon qu'ils interagissent avec HpaD et HpaB (vert) ou spécifiquement avec HpaD (rouge) ou HpaB (bleu). Lorsque les deux répétitions biologiques ont donné des résultats différents, ceux-ci sont représentés côte à côte. En gris foncé : interaction nette ; en gris clair : interaction possible ; en blanc : pas d'interaction identifiée ; ND : non déterminé. AD : domaine d'activation ; BD : domaine de liaison à l'ADN.

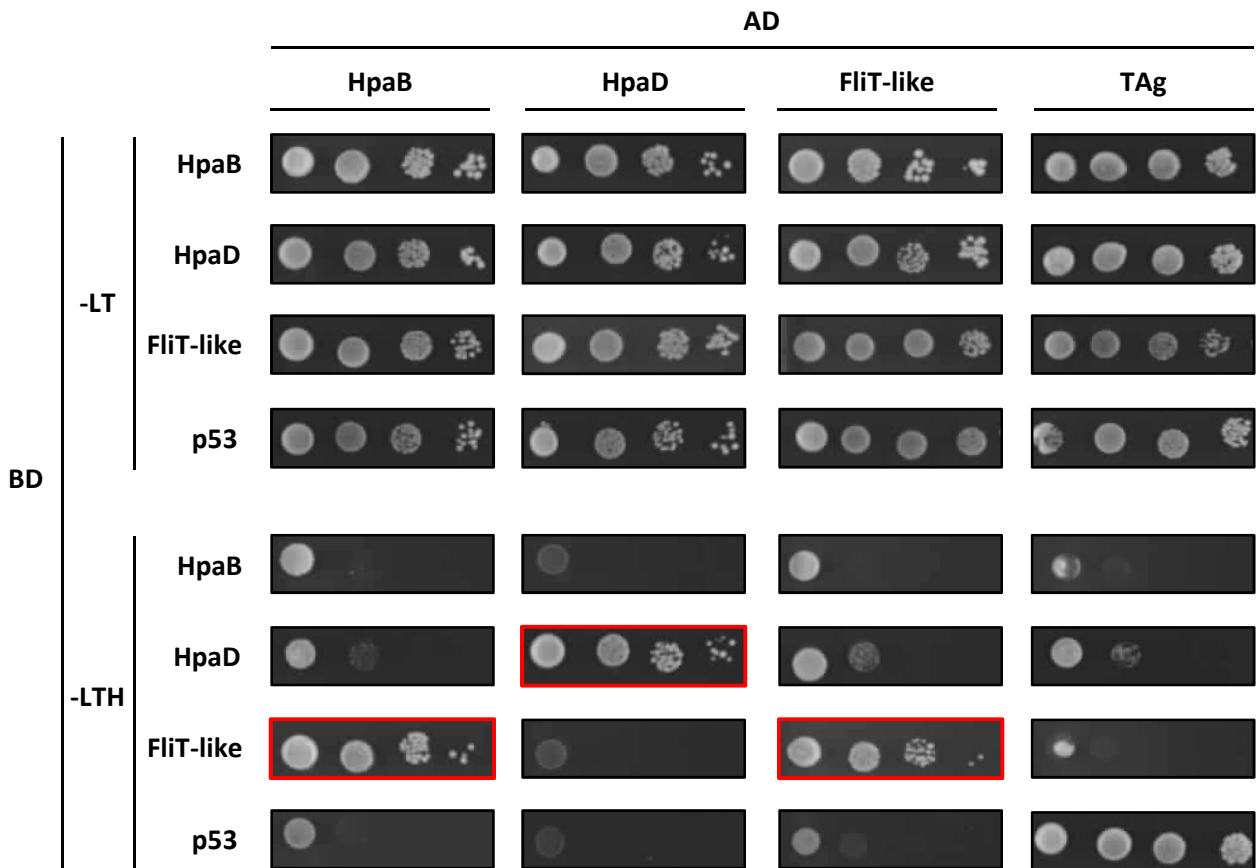


Figure 26. Les CT3s putatives sont capables de s'associer en homo et/ou hétéro-oligomères. Les interactions entre HpaB, HpaD et FliT-like ont été testées par double-hybride chez la levure dans les deux sens d'interaction. Les croissances des levures sur les milieux sélectifs -LT (sans leucine ni tryptophane ; témoin de co-transformation) et -LTH (-LT sans histidine ; témoin d'interaction) sont représentés. Les résultats positifs sont encadrés en rouge. Les protéines de fusion AD-TAg (antigène T) et et BD-p53 sont utilisées comme témoins. AD : domaine d'activation ; BD : domaine de liaison à l'ADN. Deux répétitions biologiques ont été réalisées en donnant des résultats similaires.

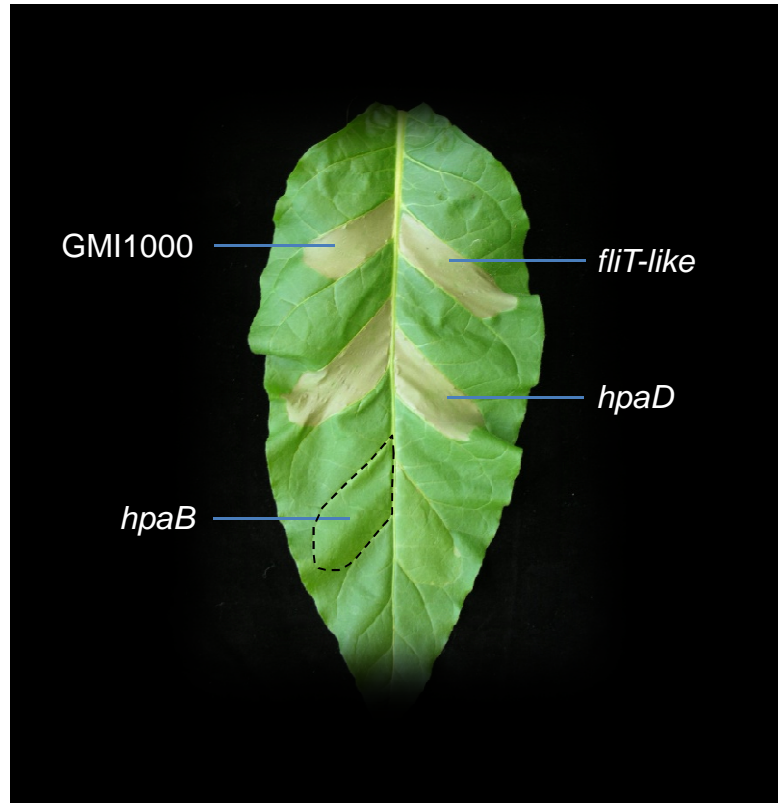


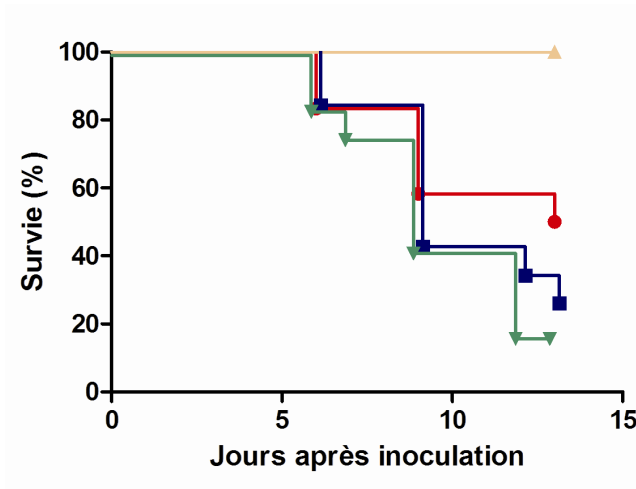
Figure 27. Importance des CT3s putatives dans l'élicitation des symptômes de la HR par *R. solanacearum*. La souche sauvage GMI1000 et les mutants *hpaB*, *hpaD* et *fliT-like* ont été inoculés par infiltration dans des feuilles de *Nicotiana tabacum* à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. La photo présente les symptômes de HR, dépendants de la translocation des ET3s AvrA et PopP1, observés 24 h après inoculation. En absence de symptômes, la zone inoculée est cerclée en pointillés. Trois répétitions biologiques comprenant six infiltrations par souche ont été réalisées en donnant des résultats similaires.

HpaB et HpaD n'a pu être mise en évidence (Figure 26). En revanche, les résultats indiquent qu'une interaction semble avoir lieu entre HpaB et FliT-like.

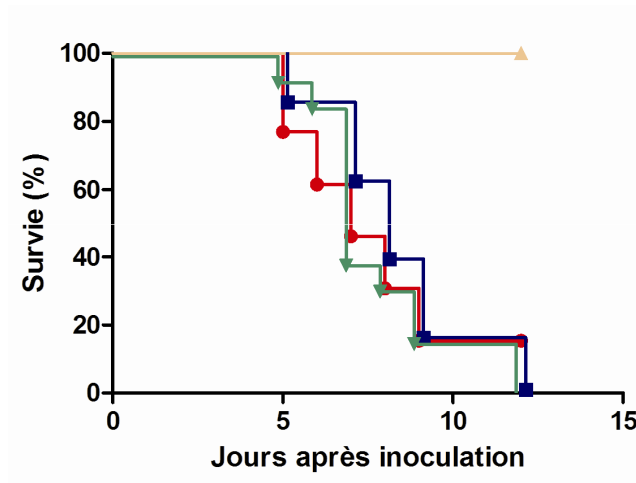
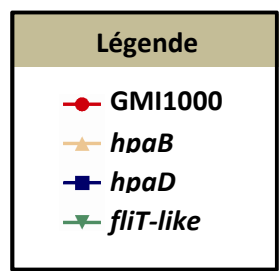
En conclusion, nous avons identifié que les CT3s putatives HpaD et FliT-like semblent capables d'interagir avec elles-mêmes, et que HpaB et FliT-like paraissent interagir de manière hétéromérique.

IV. HpaB, contrairement à HpaD et FliT-like, est requis pour la translocation *in planta* des ET3s PopP1 et AvrA

Toujours dans l'objectif de valider le rôle de HpaB, HpaD et FliT-like comme CT3s, l'importance de ces protéines dans la translocation des ET3s a été testée. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur les ET3s PopP1 et AvrA. Ces deux ET3s ont été caractérisés comme des protéines d'avirulence directement responsables de l'élicitation d'une HR sur *N. tabacum* par *R. solanacearum* GMI1000, AvrA étant le principal déterminant. Seule la double mutation de *popP1* et *avrA* abolit l'apparition des symptômes de la HR (Poueymiro *et al.*, 2009). L'apparition des symptômes de HR a ainsi été utilisée comme témoin de la translocation *in planta* des ET3s PopP1 et AvrA. Des souches mutées pour chacune des CT3s putatives ont été infiltrées dans des feuilles de *N. tabacum* à une concentration de 10^8 ufc/mL. Les mutants *hpaD* et *fliT-like* élicitent une HR similaire à celle déclenchée par la souche sauvage GMI1000, 24 h après inoculation (Figure 27). En revanche, le mutant *hpaB* n'induit pas de HR, hormis quelques point nécrotiques qui apparaissent de manière occasionnelle et seulement au bout de 48 h après inoculation. Ces résultats suggèrent que HpaB, contrairement à HpaD et FliT-like, serait requis pour la translocation des ET3s PopP1 et AvrA *in planta*.



	<i>hpaB</i>	<i>hpaD</i>	<i>fliT-like</i>
GMI1000	0,0059	0,3639	0,2096



	<i>hpaB</i>	<i>hpaD</i>	<i>fliT-like</i>
GMI1000	< 0,0001	0,5161	0,7145

Figure 28. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur Aubergine. Courbes de survie de plantes d'Aubergines inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et les mutants *hpaB* (beige), *hpaD* (bleu) et *fliT-like* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 12 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les deux répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.

V. Les CT3s putatives exhibent différents niveaux d'importance pour le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*

Afin de déterminer plus globalement si les CT3s putatives de *R. solanacearum* seraient impliquées dans le contrôle de la sécrétion de certains ET3s, des mutants correspondants à ces trois CT3s putatives ont été inoculés sur différentes plantes hôtes (Aubergine, *M. truncatula*, *A. thaliana* et Tomate) et les symptômes ont été suivis régulièrement. Afin de retranscrire le plus fidèlement possible le niveau de variabilité des résultats d'une répétition à l'autre, le choix a été fait de présenter l'ensemble des expériences effectuées. Les symptômes de maladie ont été enregistrés selon une échelle de notation de 0 à 4 : 0 correspondant à une absence de symptômes et 4 à un flétrissement total de la plante. Le développement des symptômes de maladie est représenté par des courbes de survie selon l'analyse de Kaplan-Meier, et pour lesquelles une note supérieure à 2 a été associée à un événement de mort de la plante. Ces courbes permettent de comparer les cinétiques de flétrissement des souches deux à deux, à l'aide du test non-paramétrique de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Une p-value inférieure à 0,01 a été considérée comme significative.

Ainsi, sur Aubergine, les résultats mettent clairement en évidence la perte de virulence du mutant *hpaB*, alors que les mutants *hpaD* et *fliT-like* ne paraissent pas être affectés dans leur pouvoir pathogène, comparé à la souche GMI1000 (p-values comprises entre 0,210 et 0,715) (Figure 28). De la même manière, sur *M. truncatula*, le mutant *hpaB* se révèle non virulent et le mutant *fliT-like* se comporte comme la souche sauvage (p-values supérieures à 0,052) (Figure 29). En revanche, pour une des deux répétitions biologiques, la cinétique de maladie du mutant *hpaD* est significativement retardée par rapport à la souche GMI1000, (p-value = 0,001). Des expériences complémentaires seront requises pour conclure quant au phénotype du mutant *hpaD* sur *M. truncatula*. Sur Tomate, une certaine variabilité apparaît également concernant les mutants *hpaD* et *fliT-like* : le pouvoir pathogène de ces mutants se révèle ainsi diminué comparé à la souche GMI1000 lors d'une seule des différentes répétitions biologiques (p-values < 0,0001) (Figure 30). Notons toutefois

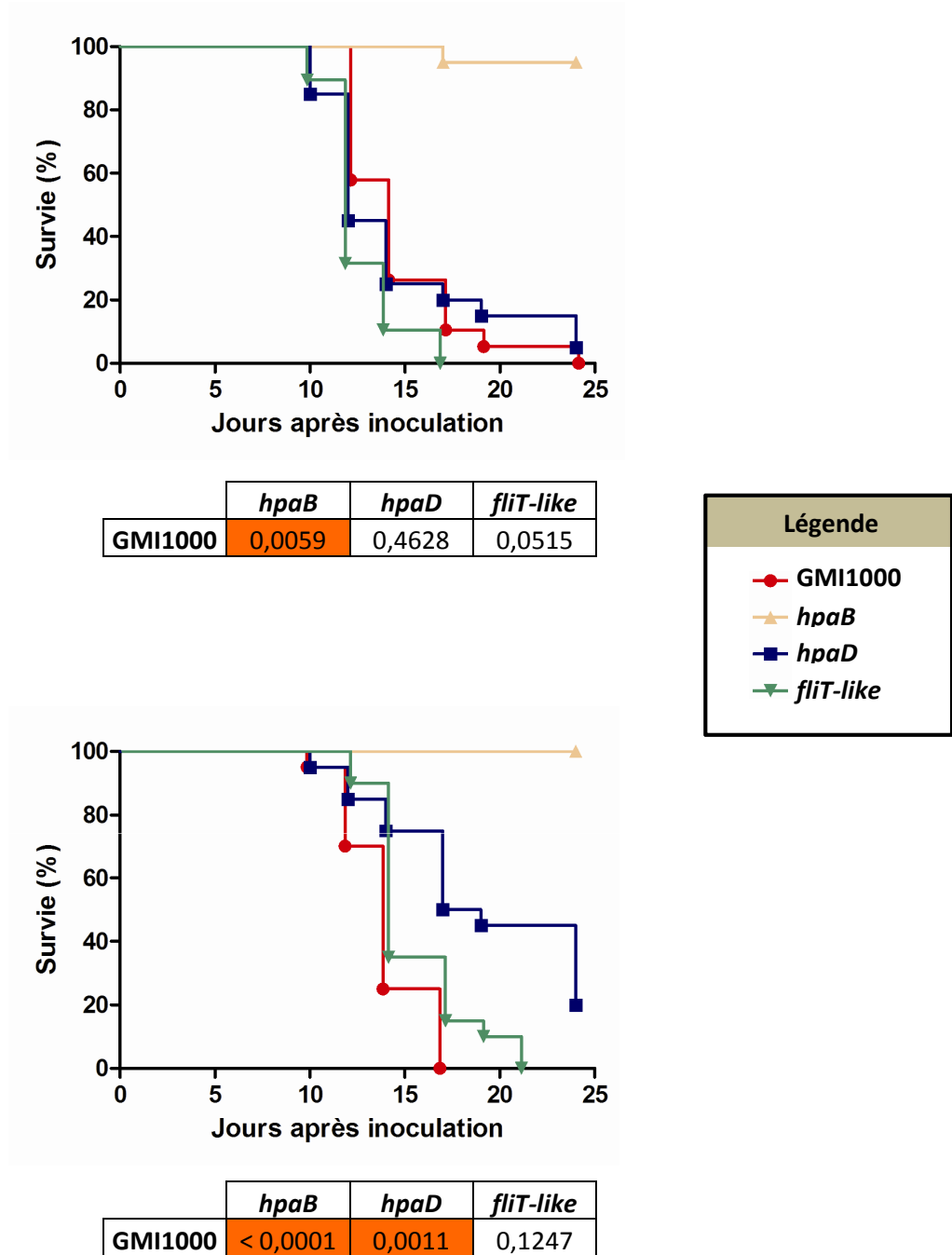
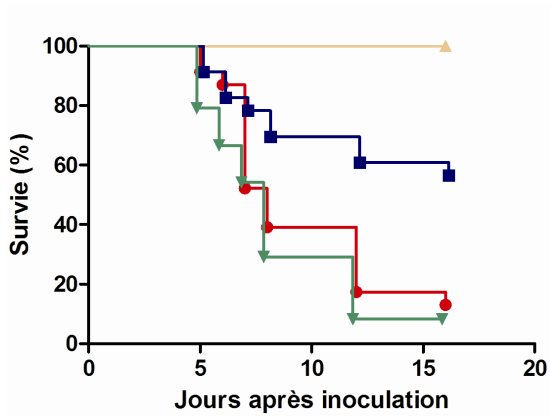
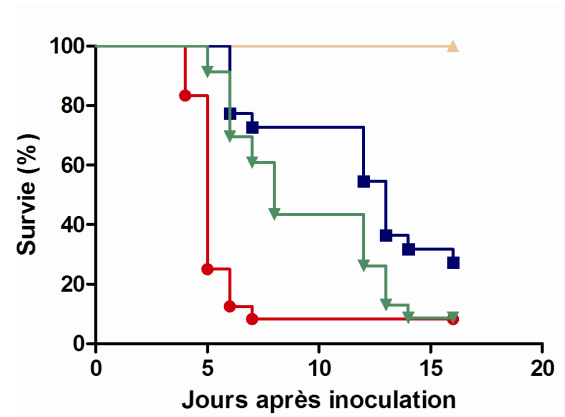


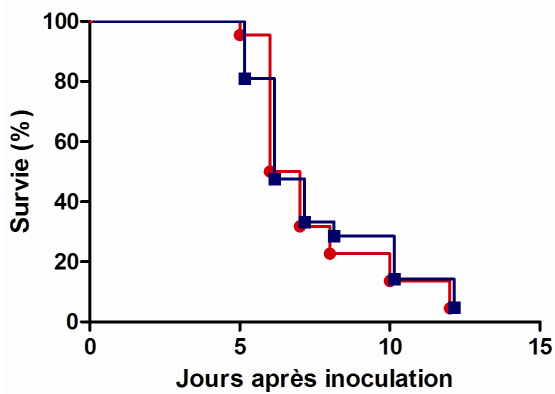
Figure 29. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur *Medicago truncatula*. Courbes de survie de plantes de *M. truncatula* inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et les mutants *hpaB* (beige), *hpaD* (bleu) et *fliT-like* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 20 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les deux répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.



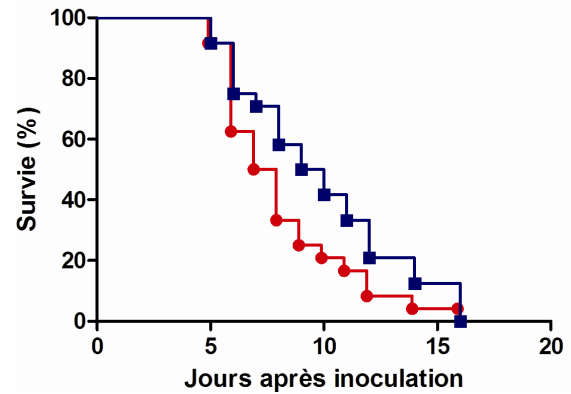
	<i>hpaB</i>	<i>hpaD</i>	<i>fliT-like</i>
GMI1000	0,0059	0,0154	0,3983



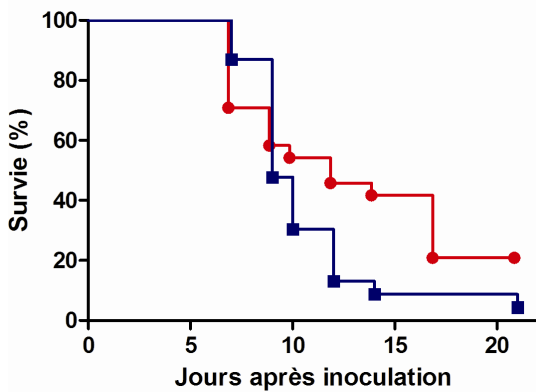
	<i>hpaB</i>	<i>hpaD</i>	<i>fliT-like</i>
GMI1000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001



	<i>hpaD</i>
GMI1000	0,6776



	<i>hpaD</i>
GMI1000	0,1149



	<i>hpaD</i>
GMI1000	0,3276

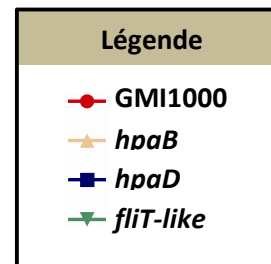


Figure 30. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur Tomate. Courbes de survie de plantes de Tomate inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et les mutants *hpaB* (beige), *hpaD* (bleu) et *fliT-like* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 24 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les cinq répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.

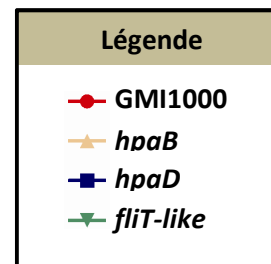
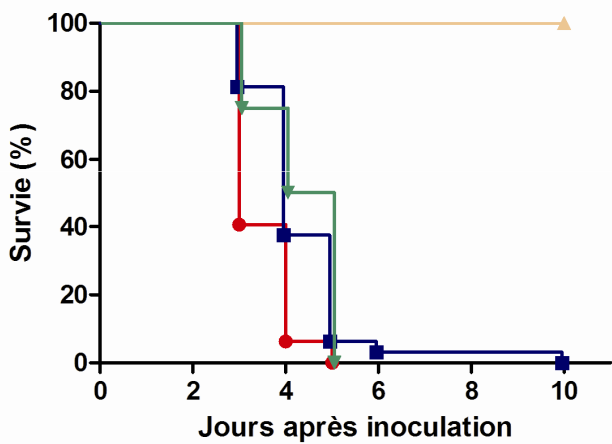
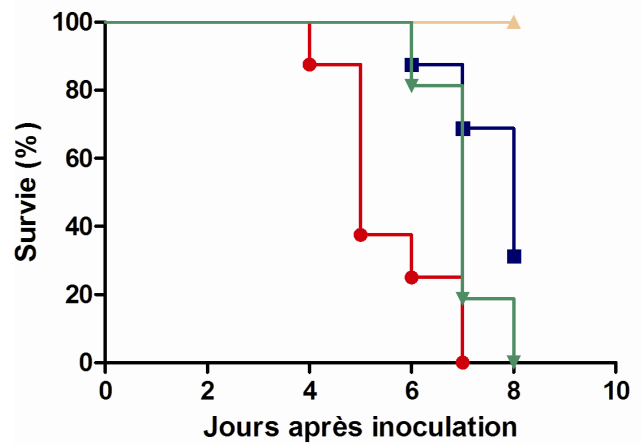
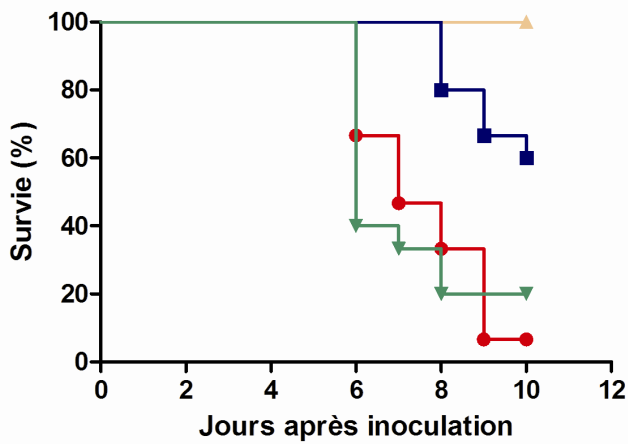


Figure 31. Implication des CT3s putatives dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur *Arabidopsis thaliana*. Courbes de survie de plantes d'*A. thaliana* inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et les mutants *hpaB* (beige), *hpaD* (bleu) et *fliT-like* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 16 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les trois répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.

que la souche sauvage exhibe une agressivité particulièrement forte dans le cas de cette expérience, en comparaison aux autres répétitions biologiques. Quant à la protéine HpaB, elle semble également strictement requise pour la virulence de *R. solanacearum* sur Tomate (Figure 30). Enfin, sur *A. thaliana*, le mutant *hpaB* exhibe de nouveau une perte de virulence totale (Figure 31). Sur cet hôte, HpaD et FliT-like paraissent impliquées dans le pouvoir pathogène : la pathogénie des mutants correspondants est significativement diminuée pour le mutant *hpaD* (p-values inférieures à 0,0003) et, lors de deux répétitions biologiques sur trois, pour le mutant *fliT-like* (p-values inférieures à 0,0002).

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les CT3s putatives présentent des niveaux d'implication différents dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*, qui peuvent s'avérer hôte-dépendants. Ils soulignent l'importance capitale de HpaB pour la virulence de *R. solanacearum* sur toutes les plantes hôtes testées. Bien qu'une variabilité existe entre les différentes répétitions biologiques quant aux rôles de HpaD et FliT-like, les résultats suggèrent que ces protéines puissent être impliquées dans le pouvoir pathogène sur *M. truncatula*, Tomate et *A. thaliana*. HpaD et FliT-like ne paraissent en revanche pas indispensables à l'établissement de la maladie sur Aubergine.

CHAPITRE II

CARACTERISATION DE HPAP, PROTEINE DE TYPE T3S4 PUTATIVE CHEZ *R. SOLANACEARUM*

Les protéines de type T3S4 ont particulièrement été étudiées chez les bactéries pathogènes d'animaux, chez lesquels elles ont été identifiées comme des acteurs majeurs du contrôle du processus de sécrétion de type III. Ces protéines seraient impliquées dans le contrôle de la longueur de l'aiguille du SST3 et dans des mécanismes de transition de sécrétion entre substrats précoces et tardifs du SST3. Chez *R. solanacearum*, la protéine HpaP présente une faible homologie avec des protéines de type T3S4 de bactéries pathogènes d'animaux ou de plantes, essentiellement au niveau de la région C-terminale renfermant le domaine T3S4 putatif, suggérant que cette protéine pourrait également exercer un rôle dans le contrôle de la sécrétion des substrats du SST3. La caractérisation de la protéine HpaP a donc été entreprise avec comme objectif principal d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse. La majeure partie des résultats obtenus a fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue « Molecular Plant Pathology » et reproduite dans la section I. Les résultats complémentaires à ces travaux publiés font quant à eux l'objet des sections II à VI.

I. HpaP module la sécrétion d'effecteurs de type III et renferme un domaine T3S4 (Type III Secretion Substrate Specificity Switch) essentiel au pouvoir pathogène de *R. solanacearum*.

Une partie des résultats obtenus quant à la caractérisation de HpaP ont été publiés dans l'article reproduit ci-après. Brièvement, nous avons montré que HpaP est une protéine nécessaire au pouvoir pathogène de *R. solanacearum* qui n'est ni sécrétée ni transloquée *in planta* par le SST3. D'autre part, HpaP semble moduler la sécrétion et/ou la translocation de différents types de substrats du SST3. Les mécanismes de contrôle impliqués pourraient mettre en jeu des interactions physiques avec les protéines sécrétées. Finalement, nous avons mis en exergue l'importance pour la fonction de la protéine HpaP de deux régions conservées dans le domaine T3S4, alors que ces régions ne paraissent pas impliquées dans les interactions protéine-protéine identifiées.

1 **HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and**
2 **harbors a substrate specificity switch domain essential for virulence**

3
4 David Lohou^{1,2#}, Marie Turner^{1,2#}, Fabien Lonjon^{1,2}, Anne Claire Cazalé^{1,2}, Nemo
5 Peeters^{1,2}, Stéphane Genin^{1,2} and Fabienne Vaillau^{1,2,3,*}

6 ¹INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, F-
7 31326 Castanet-Tolosan, France.

8 ²CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-
9 31326 Castanet-Tolosan, France.

10 ³Université de Toulouse ; INP ; ENSAT ; 18 chemin de Borde Rouge, 31326
11 Castanet Tolosan, France.

12

13 * Author for correspondence: *Fabienne Vaillau*. Tel: +33 (0)5 61 28 55 92, Email:
14 fabienne.vaillau@toulouse.inra.fr.

15 #These authors contributed equally to this work.

16

17 Total word count for the main body of the text: 7169

18 Word count for Summary: 247

19 Word count for Introduction: 956

20 Word count for Results: 1994

21 Word count for Discussion: 1287

22 Word count for Experimental Procedures: 1430

23 Word count for Acknowledgements: 137

24 Word count for Table and Figure Legends (but not content): 1118

25 Number of Figures: 8

26 Number of Tables: 2

27 Supporting information: Supplementary Figures S1, S2, S3, S4 and Table S1

28

29 **Running title:**

30 Role of HpaP in type III secretion and virulence

31

32 **up to 10 keywords listed in order of importance:**

33 HpaP

34 T3S4 (Type III Secretion Substrate Specificity Switch)

35 *Ralstonia solanacearum*
36 Bacterial wilt
37 T3SS (Type III Secretion System)
38 T3Es (Type III Effectors)
39 Secretion/Translocation
40 Pathogenicity

41

42 **SUMMARY**

43

44 Many pathogenic bacteria have evolved a type III secretion system (T3SS) to
45 successfully invade their host. This extracellular apparatus allows the translocation of
46 proteins, called type III effectors (T3Es), directly into the host cells. T3Es are
47 virulence factors that have been shown to interfere with the host's immunity or to
48 provide nutrients from the host to the bacteria. The Gram-negative bacterium
49 *Ralstonia solanacearum* is a worldwide major crop pest whose virulence strongly
50 relies on the T3SS. In *R. solanacearum*, transcriptional regulation has been
51 extensively studied. However very few data are available concerning the role played
52 by type III associated-regulators such as type III chaperones and T3SS control
53 proteins. Here, we characterized HpaP, a putative type III secretion substrate
54 specificity switch (T3S4) protein of *R. solanacearum* that is not secreted by the
55 bacterium, nor translocated in the plant cells. HpaP self-interacts and interacts with
56 PopP1 T3E. HpaP modulates the secretion of early (HrpY pilin) and late (AvrA and
57 PopP1 T3Es) type III substrates. HpaP is dispensable for the translocation of T3Es
58 into the host cells. Finally, we identified two regions of five amino acids in the T3S4
59 domain that are essential for efficient PopP1 secretion and for HpaP's role in
60 virulence on tomato and *Arabidopsis thaliana*, but not required for HpaP-HpaP and
61 HpaP-PopP1 interactions. Taken together, our results indicate that HpaP is a putative
62 *R. solanacearum* T3S4 protein important for full pathogenicity on several hosts,
63 acting as a helper for PopP1 secretion, and repressing AvrA and HrpY secretion.

64

65 **INTRODUCTION**

66

67 The translocation of pathogenicity factors into host cells is a paradigm of parasite-
68 host interactions (He *et al.*, 2004; Hueck, 1998). As documented for numerous

69 bacterial pathogens, pathogenicity proteins, also called type III effectors (T3Es), are
70 delivered from the bacterial cytoplasm into host cells *via* a molecular syringe called
71 the type III secretion system (T3SS). In plant pathogens, the T3SS proteins are
72 encoded by 23 to 29 genes, named the *hrp* gene cluster, required for the
73 hypersensitive response and the pathogenicity of the bacteria (He *et al.*, 2004).
74 Among these genes, four subgroups can be distinguished: (i) core component genes
75 with six to ten non-conserved genes and nine *hrc* genes conserved among animal
76 and plant pathogenic bacteria (*hrc*, for *hrp* conserved), (ii) two to four transcriptional
77 regulators, (iii) genes encoding for extracellular proteins (pilin, translocators and
78 harpins), and (iv) two to four genes encoding for secretion regulators (Tampakaki *et*
79 *al.*, 2010).

80 In the recent years, many efforts have been made on elucidating T3E functions of
81 plant pathogenic bacteria (Block *et al.*, 2008; Canonne and Rivas, 2012; McCann
82 and Guttman, 2008), whereas only limited information on T3SS post-translational
83 regulations is available. Recent reviews focus more specifically on the involvement of
84 type III secretion chaperones or on type III-associated proteins (Büttner, 2012;
85 Büttner and Bonas, 2009; Büttner and He, 2009). Type III chaperones were first
86 characterized as being involved in transcription or secretion of T3Es in animal
87 pathogenic bacterium (Feldman and Cornelis, 2003; Parsot *et al.*, 2003). Indeed,
88 T3Es are produced into the cytoplasm, where they need to be stabilized and
89 unfolded into a competent state to facilitate their secretion/translocation into the host
90 (Parsot *et al.*, 2003). Type III chaperones are small, acidic leucine-rich proteins. They
91 can interact with T3Es (class IA, or IB chaperones), or with proteins that allow the
92 insertion of the *hrp* pilus into the cell membrane, *i.e.* the translocators (class II
93 chaperones) (Parsot *et al.*, 2003). Secretion of T3Es is also controlled by proteins of
94 the YscP/FliK family, containing a T3S4 (Type 3 secretion substrate specificity
95 switch) domain (Büttner, 2012; Tampakaki *et al.*, 2010). These T3S4 proteins are key
96 players in orchestrating the translocation of T3Es. They are related to the YscP/FliK
97 family as the concept of substrate specificity switching by T3SS emerged after the
98 characterization of the FliK protein in the flagellar T3S system (Patterson-Delafield *et*
99 *al.*, 1973) and of the YscP protein in *Yersinia* species (Agrain *et al.*, 2005; Edqvist *et*
100 *al.*, 2003; Journet *et al.*, 2003). A major role of FliK and YscP proteins is to control
101 flagellar hook and needle lengths, respectively, and to regulate secretion of late
102 substrates (Journet *et al.*, 2003; Minamino *et al.*, 1999). In plant pathogenic bacteria,

103 the YscP/FliK family members characterized so far are HpaC from *Xanthomonas*
104 *campestris* pv. *vesicatoria* (Büttner *et al.*, 2006) (called HpaC_{Xcv} thereafter), and HrpP
105 from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Morello and Collmer, 2009) (called HrpP_{Pst}
106 thereafter). HpaC_{Xcv} is not secreted and is demonstrated to be important for the
107 secretion of T3Es and translocon proteins (Lorenz *et al.*, 2008). HrpP_{Pst} is a T3SS
108 substrate translocated into plant cells and is essential for the function of the T3SS
109 (Morello and Collmer, 2009). The differences observed in their functions could be due
110 to the fact that these two plant pathogenic bacteria have a different type of T3SS
111 (Tampakaki *et al.*, 2010). *R. solanacearum* has a similar (Hrp2) T3SS to
112 *Xanthomonas* spp. (Büttner, 2012; Tampakaki *et al.*, 2010) but up to now, the role of
113 putative T3S4 proteins in *R. solanacearum* has not been described. Lorenz *et al.*,
114 (2008) reported that HpaP (for *hrp*-associated P) in *R. solanacearum* is 27% identical
115 to HpaC_{Xcc}, and Agrain *et al.* (2005) defined 18% sequence identity over 90 amino
116 acids between HpaP and YscP from *Y. pestis*. *R. solanacearum*, the causal agent of
117 bacterial wilt, is a root pathogen that affects more than 200 plant species (Genin and
118 Denny, 2012; Hayward, 2000). As for many Gram-negative bacteria, the major role in
119 *R. solanacearum* pathogenicity is attributed to the T3SS because corresponding
120 mutants cannot provoke the hypersensitive response (HR), a rapid cell death of the
121 plant cells directly at the inoculation site, on resistant plants nor symptoms on
122 susceptible host plants (*hrp*- phenotype). *R. solanacearum* has one of the largest
123 T3E repertoire (74 in GM1000 strain) among other Gram-negative plant pathogenic
124 bacteria (Poueymiro and Genin, 2009). In this large repertoire, several T3Es have
125 been shown to trigger plant immune responses (or effector-triggered immunity, or
126 ETI). This is the case for PopP1 and PopP2, two members of the YopJ/Avrxv family,
127 on *Petunia hybrida* ecotype St-40 (Arlat *et al.*, 1994; Lavie *et al.*, 2002) and on
128 *Nicotiana* species (Poueymiro *et al.*, 2009) for PopP1 and on *Arabidopsis thaliana*
129 ecotype Nd-1, for PopP2 (Deslandes *et al.*, 1998). AvrA, another T3E is also required
130 for the ETI on *Nicotiana* species (Poueymiro *et al.*, 2009). Despite a huge number of
131 candidate virulence factors, to date, only few T3Es have been identified as being
132 required for pathogenicity of *R. solanacearum* (Angot *et al.*, 2006; Cunnac *et al.*,
133 2004; Remigi *et al.*, 2011; Sole *et al.*, 2012).

134 The present work constitutes the first functional study of HpaP, a putative T3S4
135 protein in *R. solanacearum*. The *hpaP* mutant was shown to be impaired both in
136 inducing HR on tobacco plants and disease symptoms on tomato plants (van

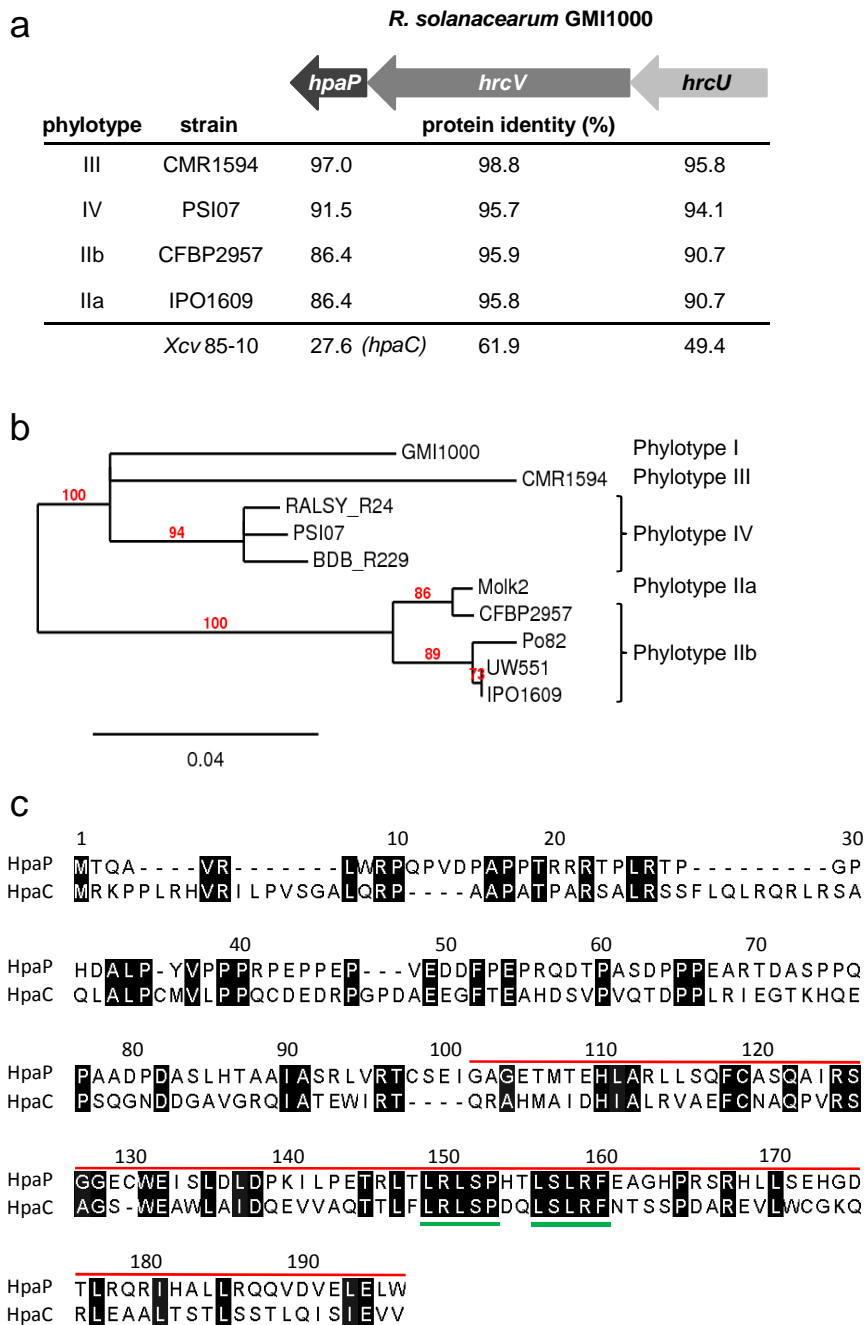


Fig. 1 HpaP is a putative T3S4 protein conserved in *Ralstonia solanacearum* species complex. (a) Protein identity between HpaP, HrcV and HrcU from *R. solanacearum* GMI1000 and homologs from strains representative of the *R. solanacearum* species complex diversity or from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) 85-10. Sequences were compared using SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Arrows represent the *hrcU-hrcV-hpaP*-operon. (b) Unrooted phylogenetic tree of *hpaP* based on sequence similarities using the maximum likelihood principle. Ten sequenced strains belonging to the four phylotypes of *R. solanacearum* species complex were included. Branch support values were calculated using the approximate Likelihood-Ratio Test (aLRT) and are shown only if >70%. Branch lengths indicate sequence divergence. (c) Amino acid sequence alignment of HpaP from *R. solanacearum* GMI1000 (GenBank accession: CAB58249) and its homolog HpaC_{*Xcv*} 85-10 (GenBank accession: CAJ22055). Sequences were aligned using MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Conserved residues are shaded in black. Numbers refer to HpaP sequence. The red line indicates the localization of the T3S4 domain as described for HpaC_{*Xcv*}. Green lines underline the two deletions made in this study, corresponding to *hpaP*::*hpaP* $\Delta_{149-153}$ and *hpaP*::*hpaP* $\Delta_{156-160}$ mutants.

137 Gijsegem *et al.*, 2002). Here, we characterize the involvement of HpaP in the control
138 of the secretion/translocation of T3Es. Our data suggest that this regulation involves
139 direct protein-protein interactions. Finally, we show that HpaP is important for *R.*
140 *solanacearum* full pathogenicity on several host plants, and that two conserved
141 sequences of five amino acids in the T3S4 domain of HpaP are required for the
142 establishment of the disease.

143

144 **RESULTS**

145

146 **HpaP is a putative T3S4 protein conserved in the *R. solanacearum* species** 147 **complex**

148 The *hpaP* gene from *R. solanacearum* GMI1000 (NP_522423.1) is part of the
149 conserved *hrp* gene cluster, and is localized in an operon together with *hrcV* and
150 *hrcU* (Fig. 1a). HpaP is conserved among all the sequenced strains of *R.*
151 *solanacearum* although the overall protein similarity among strains appears lower
152 compared to HrcV and HrcU (Fig. 1a). Phylogenetic analysis of *hpaP* genes reveals
153 that *hpaP* phylogeny matches perfectly with the species phylogeny separating the
154 four phylotypes in three distinctive clades (Peeters *et al.*, 2013) (Fig. 1b). This
155 indicates that *hpaP* was probably acquired early before the diversification that led to
156 the actual organization of the *R. solanacearum* species complex into four phylotypes.
157 We looked for the amino acid conservation between HpaP and other proteins of the
158 YscP/FliK family, which have a T3S4 domain in their C terminus part. No significant
159 identity could be uncovered between HpaP protein of GMI1000 and homologs from
160 Hrp1 T3SS plant-pathogenic bacteria such as HrpP_{Pst} (Morello and Collmer, 2009) or
161 known T3S4 proteins from animal-pathogenic bacteria (*i.e.* *Yersinia enterocolitica*
162 YscP) (Edqvist *et al.*, 2003; Journet *et al.*, 2003). Significant protein identity was
163 identified only for homologs in *Xanthomonas* species, *i.e.* 31.0% for *X. oryzae* pv.
164 *oryzae* MAFF311018 and 29.8% for *X. axonopodis* pv. *citri* 306. HpaP from *R.*
165 *solanacearum* GMI1000 shares also low identity (27.6%) with the characterized T3S4
166 protein HpaC_{Xcv} 85-10 (Lorenz *et al.*, 2008; Schulz and Büttner, 2011) (Fig. 1a). A
167 comparative genomic analysis shows that the organization of loci containing the
168 *hpaP/hpaC_{Xcv}* genes is colinear. An alignment between HpaP and HpaC_{Xcv} using the
169 MAFFT program (Kato *et al.*, 2002) highlighted that homology between these two

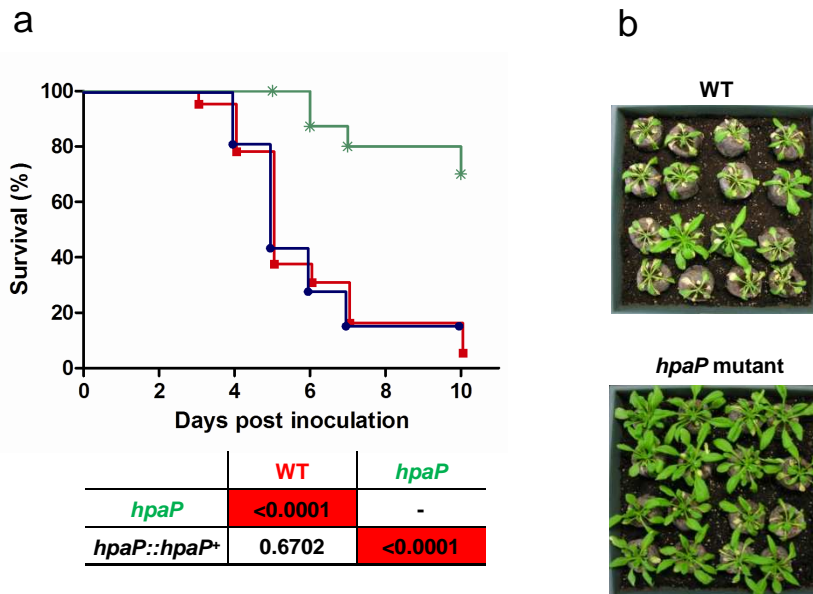


Fig. 2 The *hpaP* mutant is strongly reduced in virulence on *Arabidopsis thaliana*. (a) Kaplan-Meier survival analysis of *A. thaliana* plants inoculated with *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (red squares), *hpaP* mutant (green stars) and the complemented strain *hpaP::hpaP+* (dark circles). Each strain was root inoculated on at least 16 *A. thaliana* plants. *P*-values from Gehan-Breslow-Wilcoxon tests are shown below the graph. Red boxes indicate *P*-values <0.01. Data were pooled from three independent experiments. (b) Representative pictures taken 6 days post inoculation.

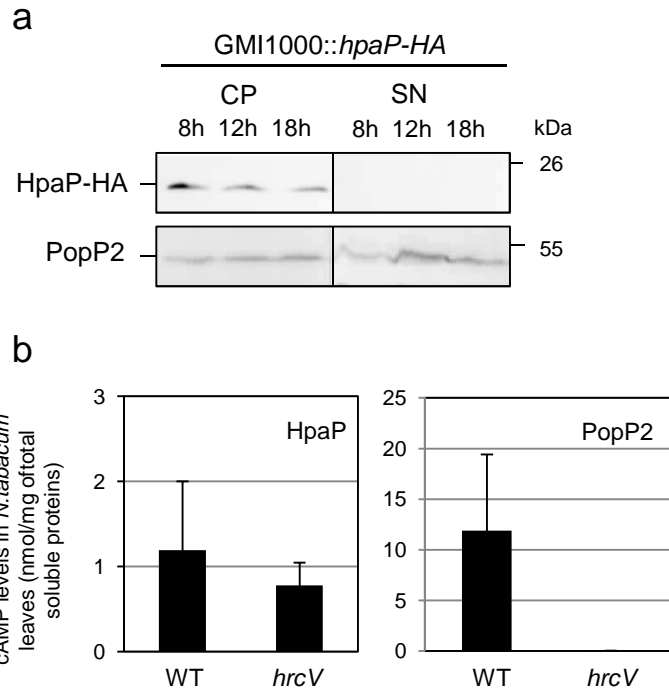
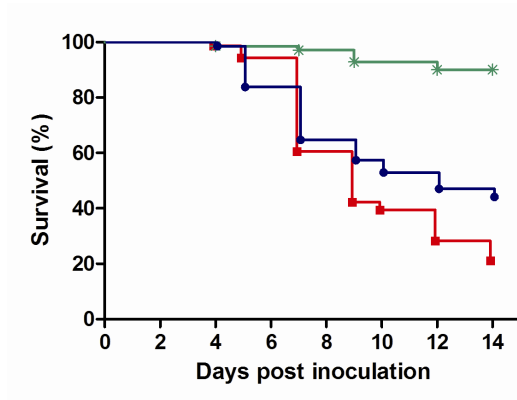


Fig. 3 HpaP is not secreted *in vitro*, nor translocated *in planta*. (a) After 8, 12 and 18 hours of culture in secretion medium, *Ralstonia solanacearum* wild-type strain cell pellet (CP) and culture supernatant (SN) were analyzed by immunoblotting. HpaP protein (22 kDa) was detected using anti-HA antibody. PopP2 was used as a positive control of the functional secretion of the strain used. This western blot is representative of three independent replicates. (b) Translocation assay of HpaP and PopP2 proteins in *Nicotiana tabacum* leaves using HpaP-CyaA' and PopP2-CyaA' (positive control) fusion proteins. cAMP levels were detected using cAMP Biotrak competitive enzyme immunoassay. Four independent biological replicates were made.



	WT	<i>hpaP</i>
<i>hpaP</i>	<0.0001	-
<i>hpaP::hpaP+</i>	0.1671	<0.0001

Supplementary Fig. S1 The *hpaP* mutant is strongly reduced in virulence on tomato. Kaplan-Meier survival analysis of tomato plants inoculated with *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (red squares), *hpaP* mutant (green stars) and the complemented strain *hpaP::hpaP+* (black circles). Each strain was root inoculated on 24 tomato plants. *P*-value from Gehan-Breslow-Wilcoxon tests are shown below the graph. Red boxes indicate *P*-values of <0.01. Data were pooled from three independent experiments.

170 proteins is mainly located in the C-terminal region, which was described to harbor the
171 T3S4 domain (Lorenz *et al.*, 2008) (Fig. 1c).

172

173 **HpaP is a virulence factor on both *Arabidopsis thaliana* and tomato plants**

174 The *hpaP* mutation did not affect the growth of the bacterium in complete or minimal
175 media (data not shown). A mutant strain complemented by the wild-type allele was
176 generated by using a plasmid derived from a recently published construction allowing
177 stable insertion in a permissive chromosomal site (Monteiro *et al.*, 2012). We then
178 root inoculated susceptible host plants *A. thaliana* ecotype Col-0 and *Solanum*
179 *lycopersicum* cv. Marmande VR with the GMI1000 strain, the *hpaP* mutant and the
180 complemented strain and symptoms were scored daily. As shown previously (van
181 Gijsegem *et al.*, 2002) the *hpaP* mutant was hypovirulent on tomato. We validated
182 this result by showing that this reduced virulence on tomato could be complemented
183 by an ectopic copy of *hpaP* gene (Supplementary Fig. S1). We also showed that the
184 *hpaP* mutant is strongly reduced in aggressiveness on *A. thaliana* and this was also
185 confirmed by complementation (Fig. 2).

186

187 **HpaP is not secreted nor translocated via the type III secretion system and is** 188 **able to self-interact**

189 Since the T3S4 protein HrpP_{Pst} is translocated into plant cells (Morello and Collmer,
190 2009), we assayed the secretion and translocation of HpaP. First, the presence of
191 HpaP-HA was monitored after 8, 12 and 18 hours of growth using a T3SS-inducing
192 minimal medium (Guéneron *et al.*, 2000) (see Material and Methods). Immunoblotting
193 of the cell pellet and culture supernatant extracts using anti-HA antibody revealed
194 that HpaP-HA was produced in bacterial cells at all the sampling times but not
195 secreted in these conditions (Fig. 3a). PopP2 secretion was monitored as a positive
196 secretion control to check that HpaP-HA does not lead to an altered type III secretion
197 in this strain (Fig. 3a). In order to verify if HpaP could be translocated *in planta*, we
198 infiltrated *Nicotiana tabacum* leaves using the wild-type strain and a *hrcV* mutant (a
199 T3SS impaired mutant) carrying HpaP-CyaA' fusion protein, as described by Cunnac
200 *et al.* (2004). We checked that GMI1000 strain carrying HpaP-CyaA' is able to induce
201 an HR on tobacco plants to make sure that the T3SS is still functional in this strain
202 (data not shown). Plant leaf material was sampled 7 hours after infiltration of the
203 recombinant *R. solanacearum* strains and extracts were assayed for cAMP

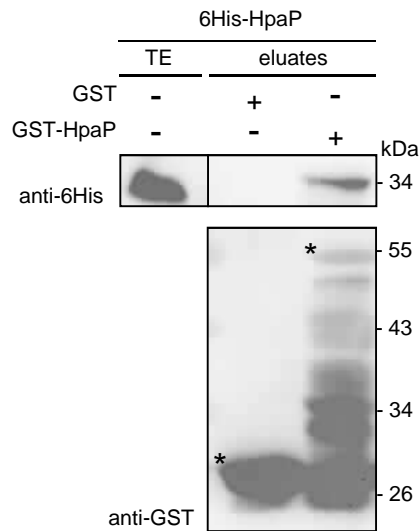


Fig. 4 HpaP is able to self-interact *in vitro*. GST and GST-HpaP were immobilized on glutathione sepharose and incubated with an *E.coli* lysate containing 6His-HpaP. Total cell lysates (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed using antibodies directed against GST and the 6His epitope. Bands corresponding to GST and GST fusion proteins are marked by asterisks, lower bands represent degradation products. The experiment was repeated three times with similar results.

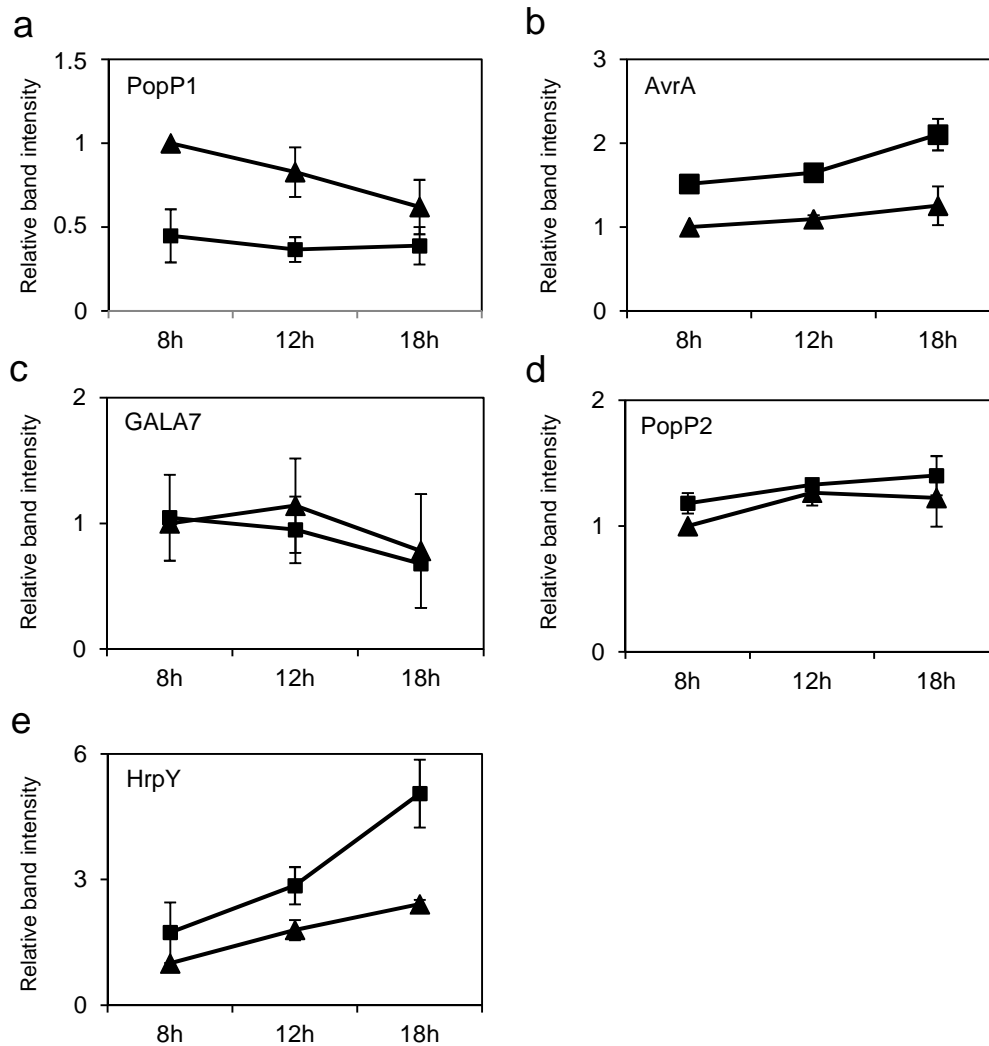
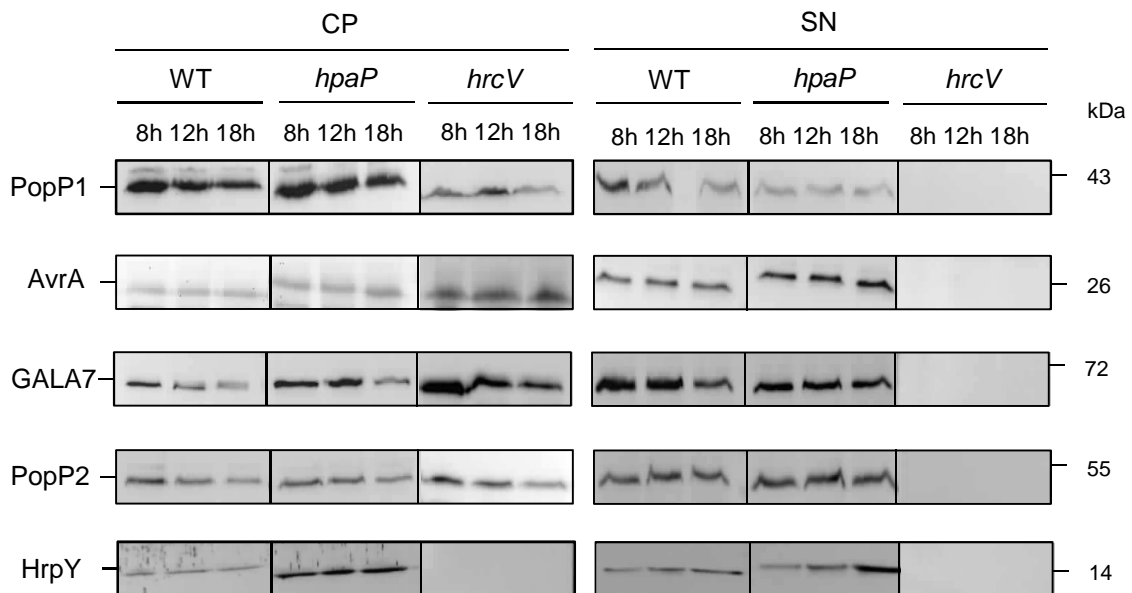


Fig. 5 HpaP modulates the secretion of AvrA, PopP1 and HrpY. *Ralstonia solanacearum* GMI1000 wild-type strain (triangles) and *hpaP* mutant (squares) were cultivated in secretion medium. Culture supernatants were harvested after 8, 12 and 18 hours of culture and analyzed by immunoblotting. PopP1 (a), AvrA (b), GALA7 (c), and PopP2 (d) type III effectors, and HrpY pilin (e), were detected using their respective antibodies for three independent biological replicates. Band intensities for all conditions were quantified using GeneTools (Syngene). For each protein, the band intensity corresponding to the wild-type strain after 8 hours of culture was used as an internal reference. For other time points of the wild-type and of the *hpaP* mutant, ratios of band intensities compared to this reference were calculated. Means and standard errors at each time point were plotted on the graphs and correspond to measurements of three independent biological replicates.



Supplementary Fig. S2 HpaP modulates the secretion of AvrA and PopP1. *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (WT), *hpaP* and *hrcV* mutants were cultivated in secretion medium, cell pellets (CP) and culture supernatants (SN) were harvested after 8, 12 and 18 hours of culture and analyzed by immunoblotting. Effector proteins PopP1 (43 kDa), AvrA (26 kDa), PopP2 (53 kDa), GALA7 (68 kDa) and type three secretion system pilin HrpY (14 kDa) were detected using their respective antibodies. T3Es and HrpY were visualized in the CP and not in the SN of *hrcV* mutant (a type three secretion system defective mutant). Three independent biological replicates were made. Western blots of one representative experiment are presented here.

204 quantification (Fig. 3b). Four independent biological replicates were made and no
205 significant difference (paired t-test, P -value = 0.13) was detected between the wild-
206 type strain and the *hrcV* mutant, showing that HpaP is not translocated *via* T3SS.
207 We then investigated the ability of HpaP to self interact, similarly to what was
208 described for HpaC_{Xcv} T3S4 protein (Büttner *et al.*, 2006). We performed *in vitro*
209 glutathione S-transferase (GST) pull-down assays using the HpaP full length protein.
210 GST-HpaP fusion protein was expressed in *E. coli* and immobilized on glutathione
211 sepharose before incubating with an *E.coli* lysate expressing 6His-HpaP. Eluates
212 containing bound proteins were then analyzed using GST and 6His-specific
213 antibodies. We were able to detect 6His-HpaP in the presence of GST-HpaP but not
214 with GST alone, indicating that HpaP is able to self-interact, under dimeric or
215 oligomeric forms (Fig. 4).

216

217 **HpaP modulates the secretion of PopP1, AvrA and HrpY, but is dispensable for** 218 **effector translocation in plant cells**

219 In order to assay the potential role of HpaP in regulating the secretion/translocation
220 of T3Es, we first analyzed the secretion of several T3Es in the wild-type and *hpaP*
221 mutant strains. The T3SS-defective mutant *hrcV* mutant was used as a control (Table
222 1; Fig. 5 and Fig. S2). Four previously well characterized *R. solanacearum* T3Es
223 were selected for the assay: PopP1 (Lavie *et al.*, 2002; Poueymiro *et al.*, 2009),
224 PopP2 (Deslandes *et al.*, 2003), AvrA (Poueymiro *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2009)
225 and GALA7 (Angot *et al.*, 2006). Strains were grown in secretion medium for 8, 12
226 and 18 hours and cell pellets and culture supernatants were harvested at each time
227 points before analyzing the protein extracts by immunoblotting using specific anti-T3E
228 antibodies (see Material and Methods). All the T3Es were detected in the cell pellet
229 extracts without significant variation along the sampling time course and among
230 bacterial strains. This indicates that HpaP doesn't seem to play a role in the
231 production of these T3Es. The four T3Es were detected in the culture supernatant of
232 the wild-type strain and of the *hpaP* mutant (but not in the *hrcV* mutant). A
233 quantification of the Western blot signal, followed by a statistical analysis (ANOVA)
234 showed no significant difference in secretion between the wild-type strain and the
235 *hpaP* mutant for GALA7 (P -value = 0.55) nor PopP2 (P -value = 0.37). However,
236 these analyses revealed that AvrA and PopP1 were respectively more (P -value =
237 0.026) and less (P -value = 0.004) secreted in the *hpaP* mutant compared to the wild-

Table 2 Translocation *in planta* is not dependent on HpaP. Translocation assay of type three effectors (T3Es) AvrA, GALA7, PopP1 and PopP2 in *Nicotiana tabacum* leaves using T3E-CyaA' fusion proteins in the wild-type strain (WT), the *hpaP* mutant and the *hrcV* mutant (a type three secretion system defective mutant). cAMP levels (nmol cAMP/mg of total soluble proteins) were measured using cAMP Biotrak competitive enzyme immunoassay in four independent biological replicates. Average ratios and standard errors of translocated protein in the wild-type compared to the *hpaP* mutant were calculated for the four replicates.

	WT	<i>hrcV</i> /WT	<i>hpaP</i> /WT
AvrA	100	0.04 ± 0.03	183 ± 149
GALA7	100	0.09 ± 0.07	126 ± 132
PopP1	100	0.03 ± 0.02	48 ± 28
PopP2	100	1 ± 1.5	104 ± 63

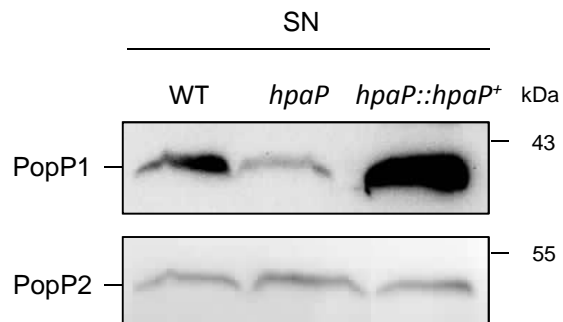
238 type strain. As a control, the diminution of PopP1 secretion was complemented in the
239 *hpaP::hpaP⁺* strain (Supplementary Fig. S3). We also quantified the secretion of the
240 *R. solanacearum* HrpY pilus protein, and observed that the HrpY signal is increased
241 in the *hpaP* mutant cell pellets (P -value = 10^{-4}) (Supplementary Fig. S2) and
242 supernatants (P -value = 0.009) compared to the wild-type strain. This enhanced
243 secretion of HrpY in the *hpaP* mutant significantly increased over time (P -value =
244 0.004) (Fig. 5 and supplementary Fig. S2) and therefore suggested that T3E
245 secretion modulation in the *hpaP* mutant was not due to a lack of type III pilin
246 assembly.

247 We then looked for the *in planta* translocation of AvrA, GALA7, PopP1 and PopP2 by
248 infiltrating *N. tabacum* leaves with the wild-type strain, the *hpaP* and *hrcV* mutants,
249 expressing each T3E-CyaA' fusion proteins (see Material and Methods). In order to
250 monitor comparative translocation assays, all T3E-CyaA' fusion proteins were
251 integrated by single homologous recombination at each T3E locus, resulting in
252 reporter fusions expressed by the cognate T3E promoters. *In planta* cAMP levels
253 were measured in four independent biological replicates (Table 2). Considering that
254 the amount of cAMP produced by T3E-CyaA' fusion proteins in the four replicates
255 could vary more than 50%, as reported previously (Schechter *et al.*, 2004), we
256 calculated the ratio of cAMP production in the two mutants *versus* the wild-type strain
257 after normalizing each cAMP quantification within each biological replicate as a
258 percentage of the wild-type cAMP production (Table 2). All four T3Es are
259 translocated *in planta* as they were detected in significantly higher level in the wild-
260 type and in the *hpaP* mutant compared to the *hrcV* mutant, indicating that their
261 translocation *in planta* was not dependent on HpaP. Ratios of translocated proteins in
262 the wild-type compared to the *hpaP* mutant were calculated. No difference was
263 detected between the wild-type and the *hpaP* mutant, except for PopP1 whose
264 translocation is reduced for all replicates, with an average translocation of 48% in the
265 *hpaP* mutant compared to the wild-type (Table 2).

266

267 **HpaP interacts specifically with PopP1**

268 We then examined whether HpaP could physically interact with the T3Es analyzed in
269 the secretion/translocation studies. Yeast two-hybrid assays using the BD and AD
270 domains of the transcription factor Gal4 were performed. In the case of an
271 interaction, cells are able to grow on a selective minimal medium lacking histidine



Supplementary Fig. S3 Complementation of *hpaP* mutation for the secretion of PopP1. *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (WT), *hpaP* mutant and complemented strain (*hpaP::hpaP⁺*) were cultivated in secretion medium for 8 hours. Culture supernatant (SN) was harvested and effector proteins PopP1 (43 kDa) and PopP2 (53 kDa) were analyzed by immunoblotting using anti-PopP1 and anti-PopP2 antibodies.

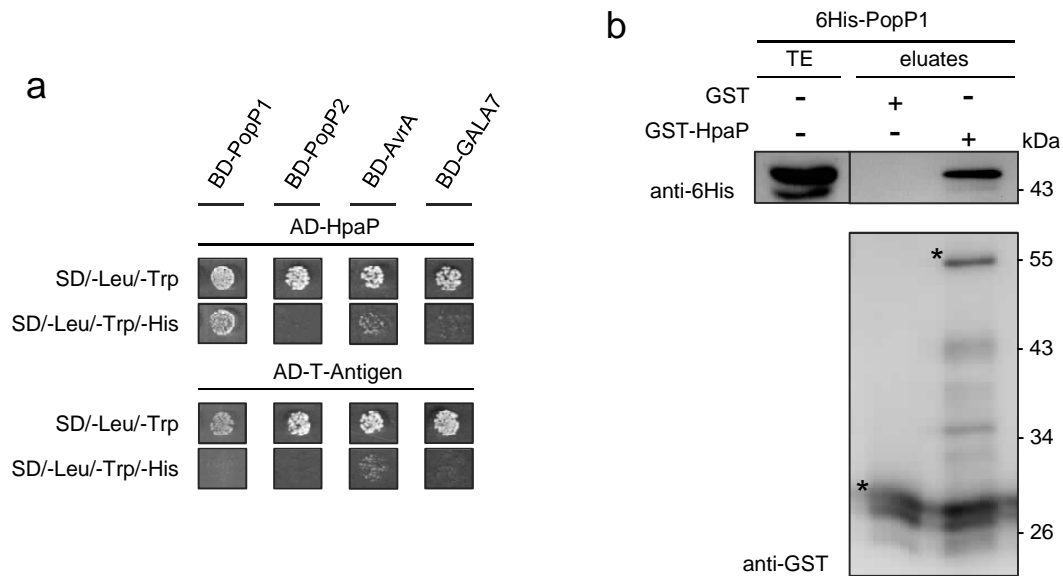


Fig. 6 HpaP interacts specifically with the type III effector (T3E) PopP1. (a) Interaction studies between HpaP and several T3Es. Yeast cells were co-transformed by AD-HpaP and either BD-PopP1, BD-PopP2, BD-AvrA or BD-GALA7. Double transformation and interaction were tested by plating yeasts on SD/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp/-His, respectively. 3-aminotriazole (3-AT) was added to suppress autoactivation when necessary. Three biological replicates were done giving the same results. (b) *In vitro* validation of the interaction between HpaP and PopP1. GST and GST-HpaP were immobilized on glutathione sepharose and incubated with an *E.coli* lysate containing 6His-PopP1. Total cell lysates (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed using antibodies directed against GST and the 6His epitope. Bands corresponding to GST and GST fusion proteins are marked by asterisks, lower bands represent degradation products. Experiments were repeated twice with similar results.

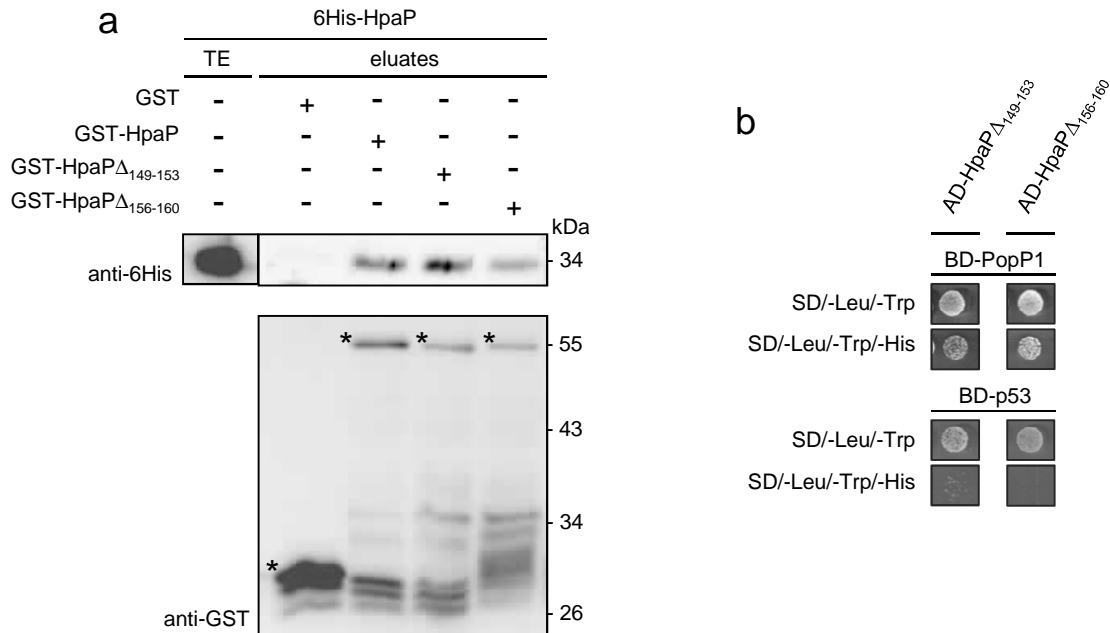


Fig. 7 Interaction studies with HpaP deletion derivatives mutated in the T3S4 domain. (a) Deletions in the T3S4 domain do not abolish self-interaction of HpaP. Immobilized GST, GST-HpaP, GST-HpaP $\Delta_{149-153}$ and GST-HpaP $\Delta_{156-160}$ were incubated with 6His-HpaP. Total cell lysates (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed using antibodies directed against GST and the 6His epitope. Bands corresponding to GST and GST fusion proteins are marked by asterisks, lower bands represent degradation products. (b) Deletions in the T3S4 domain do not abolish interaction between HpaP and the type III effector PopP1. Yeast cells were co-transformed by BD-PopP1 and either AD-HpaP $\Delta_{149-153}$ or AD-HpaP $\Delta_{156-160}$. Double transformation and interaction were tested by plating yeasts on SD/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp/-His, respectively. 3-aminotriazole (3-AT) was added to suppress autoactivation. (a) and (b) experiments were repeated twice with similar results.

272 (SD/-Leu/-Trp/-His). When required, we added to the selective medium the minimal
273 concentration of 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (see Material and Methods) required to
274 suppress the interactions between baits (BD-T3E) and the prey AD-T-antigen used
275 as a negative control. Among the four T3Es tested, HpaP was found to interact only
276 with PopP1 (Fig. 6a). To confirm this interaction, a GST-HpaP fusion protein was
277 expressed in *E. coli* and immobilized on glutathione sepharose before incubating with
278 an extract from *E. coli* expressing 6His-PopP1. Bound proteins were eluted and
279 analyzed using anti-GST and anti-6His antibodies. 6His-PopP1 was detected only in
280 the presence of GST-HpaP and not with GST alone, confirming the interaction
281 between HpaP and PopP1 (Fig. 6b).

282

283 **Two deletions of five amino acids in the T3S4 domain of HpaP do not abolish** 284 **self-interaction nor interaction with PopP1, but are essential for HpaP function**

285 In order to characterize the contribution of the T3S4 domain in HpaP function, we
286 generated two deletions of five amino acids, in the most conserved regions between
287 HpaP and HpaC_{Xcv} (Schulz and Büttner, 2011) (Fig. 1c). We analyzed the
288 involvement of these regions in the ability of HpaP to self-interact or to interact with
289 PopP1. GST pull-down assays were performed using the two HpaP derivatives
290 (GST-HpaP $\Delta_{149-153}$ and GST-HpaP $\Delta_{155-160}$) using anti-GST and anti-6His antibodies.
291 Equal amounts of 6His-HpaP were detected with either HpaP or the deleted versions
292 (Fig. 7a), indicating that these conserved amino acids in the T3S4 domain of HpaP
293 are dispensable for its self-interaction. We then examined whether the T3S4 deletion
294 derivatives of HpaP were still able to bind to PopP1 in the yeast two-hybrid assay.
295 Cells were co-transformed with BD-PopP1 and AD-HpaP $\Delta_{149-153}$ or AD-HpaP $\Delta_{155-160}$,
296 and plated on the different minimal media. AD-HpaP derivatives required 3-AT to
297 suppress the interactions with the negative control bait BD-p53. We detected an
298 interaction between PopP1 and the two HpaP deleted versions, indicating that the
299 two deletions of five amino acids did not alter the capacity of HpaP to bind PopP1
300 (Fig. 7b). We also tested whether the two deletions designed in the HpaP T3S4
301 domain had an impact on PopP1 secretion. The *hapP* mutant was complemented
302 with the two *hapP* T3S4-deletion derivatives (strains *hapP::hapP $\Delta_{149-153}$* and
303 *hapP::hapP $\Delta_{155-160}$*) using the same stable chromosomal insertion system (see
304 Material and Methods). We checked that the mutated proteins were indeed produced

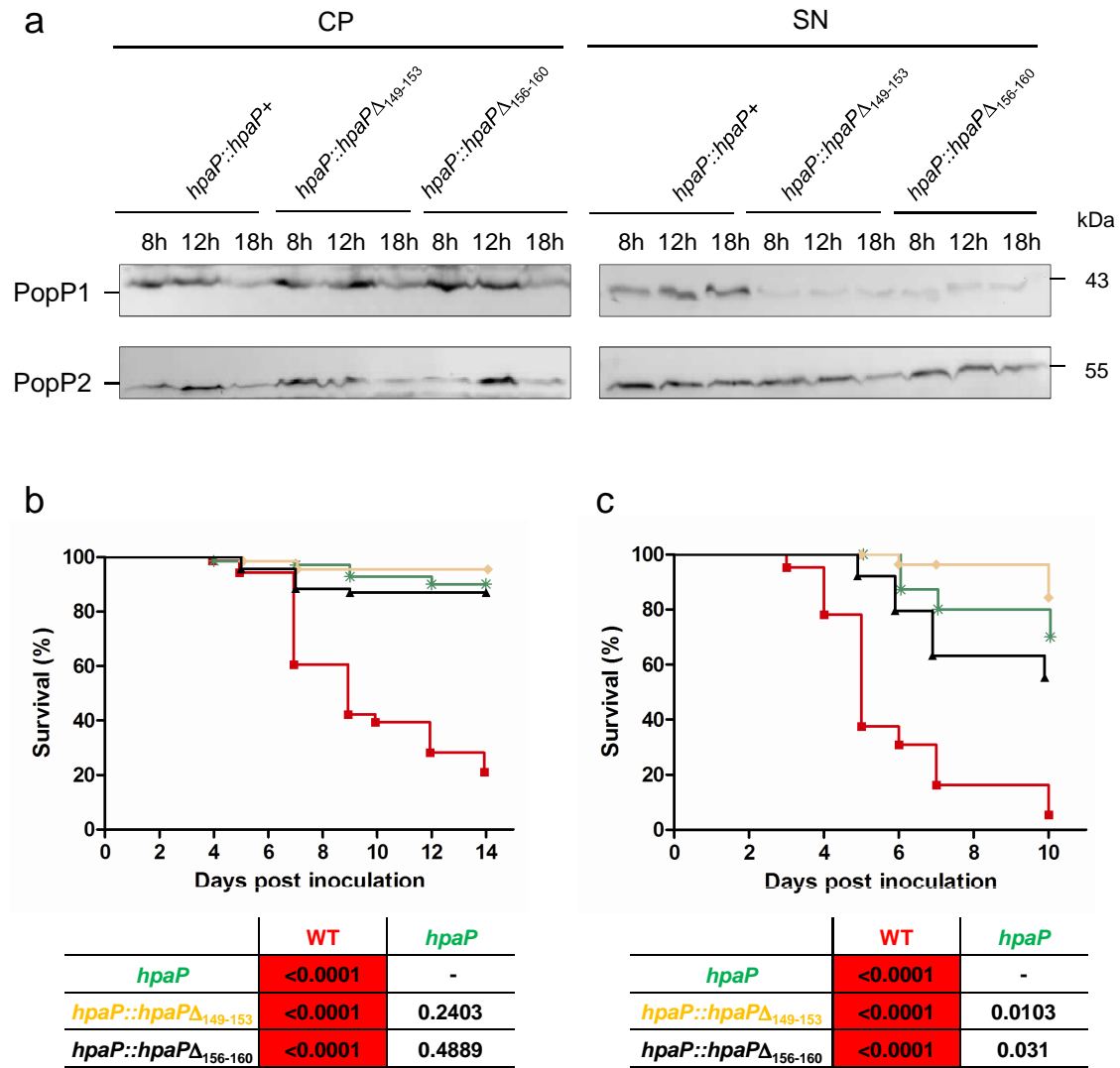


Fig. 8 *hpaPΔ₁₄₉₋₁₅₃* and *hpaPΔ₁₅₆₋₁₆₀* mutants behaved similarly to the *hpaP* mutant. (a) PopP1 is specifically less secreted in both *hpaP* deletion derivative mutants (*hpaP::hpaPΔ₁₄₉₋₁₅₃* and *hpaP::hpaPΔ₁₅₆₋₁₆₀*) compared to the wild-type version (*hpaP::hpaP+*). *Ralstonia solanacearum* strains were cultivated in secretion medium, cell pellets (CP) and culture supernatants (SN) were harvested after 8, 12 and 18 hours of culture and analyzed by immunoblotting. Effector proteins PopP1 (43 kDa) and PopP2 (53 kDa) were detected using their respective antibodies. Two independent biological replicates were made with similar results. Both *hpaP* deletion mutants are strongly reduced in virulence on tomato (b) and *Arabidopsis thaliana* (c). Kaplan-Meier survival analysis of plants inoculated with *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (WT) (red squares), *hpaP* mutant (green stars) and the deletion mutants *hpaP::hpaPΔ₁₄₉₋₁₅₃* (yellow diamonds) and *hpaP::hpaPΔ₁₅₆₋₁₆₀* (black triangles). Each strain was root inoculated on 24 tomato and at least 16 *A. thaliana* plants. *P*-values from Gehan-Breslow-Wilcoxon tests are shown below each graph. Red boxes indicate *P*-values <0.01. Data were pooled from three independent experiments.

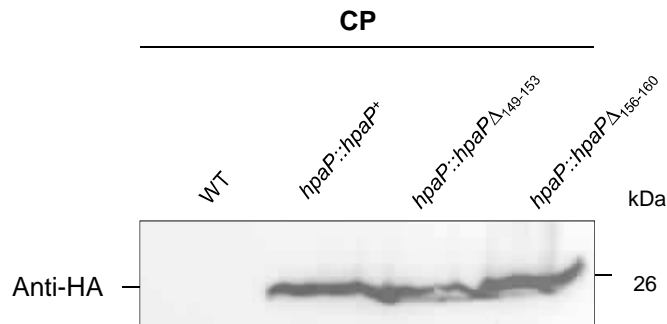
305 in the complemented strains, at the same level than the wild-type construct
306 (Supplementary Fig. S4). Interestingly, secretion of PopP1, but not PopP2, was
307 highly reduced at all the time points tested in the supernatants of both strains
308 carrying *hpaP* deletion derivatives compared to the wild-type version (Fig. 8a).
309 Finally, these two strains were assayed for their pathogenicity on tomato and *A.*
310 *thaliana*. Whatever the host, *hpaP::hpaP Δ ₁₄₉₋₁₅₃* and *hpaP::hpaP Δ ₁₅₅₋₁₆₀* strains
311 behaved similarly to the *hpaP* mutant on tomato (Fig. 8b) and on *A.thaliana* (Fig. 8c),
312 showing a dramatic decrease in their aggressiveness compared to the wild-type (*P*-
313 value <0.0001); this suggests that both regions of five amino acids in the putative C-
314 terminal T3S4 domain of HpaP are involved in PopP1 efficient secretion and are
315 required for *R. solanacearum* pathogenicity.

316

317 **DISCUSSION**

318

319 T3SS-dependent pathogenesis of *R. solanacearum* appears to be extremely
320 complex, notably due to the large repertoire of T3Es of the bacterium and to
321 functional redundancy (Remigi *et al.*, 2011; Sole *et al.*, 2012). Studying key proteins
322 putatively involved in the regulatory mechanisms linked to secretion/translocation of
323 T3Es is therefore an attractive way to identify sets of T3Es potentially required for
324 disease establishment. Few work is available on such type III regulators in *R.*
325 *solanacearum*, as only the putative class IB chaperone, HpaB, was demonstrated to
326 be required for the translocation of 66 T3Es in strain RS1000 (Mukaihara *et al.*,
327 2010), leading to a *hrp*- phenotype of the *hpaB* mutant (Mukaihara *et al.*, 2004).
328 HpaP was originally described as a *hrp*-associated protein involved in *R.*
329 *solanacearum* pathogenicity towards tomato plants (Gough *et al.*, 1993; van
330 Gijsegem *et al.*, 2002). HpaP does not have the characteristics of a chaperone *stricto*
331 *sensu* as described by Parsot *et al.* (2003). Indeed, HpaP is larger (22 kDa) than
332 most chaperones (*ca* 15 kDa), and is unusually rich in proline residues (Gough *et al.*,
333 1993). We validated in this study the strong impact of the *hpaP* mutation on the
334 aggressiveness of *R. solanacearum* on tomato plants, and also highlighted the effect
335 of the same mutant on *A. thaliana*. Since we showed that HpaP isn't itself secreted or
336 translocated into plant cells, and modulates the secretion of T3 substrates, we
337 hypothesize that HpaP has rather an indirect role in the contribution to pathogenicity
338 of *R. solanacearum* towards tomato and *A. thaliana*. We also showed that HpaP



Supplementary Fig. S4 Control of the production of the HpaP wild-type protein and of two HpaP deletion derivatives (HpaP Δ ₁₄₉₋₁₅₃ and HpaP Δ ₁₅₅₋₁₆₀). *Ralstonia solanacearum* wild-type strain (WT) and *hpaP* mutants expressing the *hpaP* wild-type version (*hpaP⁺*) or *hpaP* deletion derivatives (*hpaP Δ ₁₄₉₋₁₅₃* and *hpaP Δ ₁₅₅₋₁₆₀*) were cultivated in secretion medium for 8 hours. Cell pellet (CP) extracts were harvested and HpaP proteins (26 kDa) were detected by immunoblotting using anti-HA antibody.

339 could self-interact, as its homolog HpaC_{Xcv} (Büttner *et al.*, 2006). Interestingly,
340 Büttner *et al.* (2006) showed that HpaC_{Xcv} could interact with a *Xanthomonas*
341 chaperone, HpaB_{Xcv}, and that both proteins could form homo- and hetero- oligomeric
342 complexes promoting the secretion of the same set of T3Es. Since a *hpaB*_{Xcv}
343 ortholog exists in *R. solanacearum*, also named *hpaB*, it would be worth investigating
344 if a functional HpaP-HpaB interaction occurs also in *R. solanacearum*.

345 Production of the HrpY pilin of *R. solanacearum* was found to be more abundant in
346 the supernatant of a *hpaP* mutant. However, this variation in the pilin subunit
347 secretion does not lead to a *hrp*- phenotype, while it is the case for two YscP/FliK
348 related proteins, HrpP_{Pst} and *Yersinia* spp. YscP. The latter controls the needle
349 length of the T3SS, preventing effector secretion until the needle is completely
350 formed (Agrain *et al.*, 2005; Journet *et al.*, 2003). Thus, the *yscP* mutant produces
351 needles of indeterminate length and is unable to secrete T3Es efficiently (Edqvist *et*
352 *al.*, 2003; Journet *et al.*, 2003). The *hrpP*_{Pst} mutant is strongly affected in its
353 pathogenicity as no effectors are secreted and only a very low amount of the pilin
354 subunit is secreted (Morello and Collmer, 2009). In our study, the putative over-
355 secretion of HrpY by the *hpaP* mutant does not lead to a general over-secretion of
356 the T3 substrates. Indeed, our data show that some T3Es seem not to be
357 deregulated by the *hpaP* mutant in their secretion/translocation (PopP2 and GALA7),
358 while the secretion/translocation of other T3Es appears modulated (PopP1 and
359 AvrA). We observed that PopP1 and AvrA were less and more secreted, respectively,
360 in a *hpaP* mutant compared to the wild-type strain (Fig. 5). While the over-secretion
361 of AvrA apparently doesn't lead to an increased translocation *in planta*, the
362 quantitative lower secretion of PopP1 in the *hpaP* mutant correlates with a lower
363 translocation *in planta* (Table 2). It is tempting to speculate that this decreased
364 secretion/translocation of PopP1 results from a regulation of PopP1 delivery through
365 a direct HpaP-PopP1 interaction (Fig. 6). This regulation appears specific to PopP1,
366 since neither differential secretion/translocation nor direct interaction was identified
367 with PopP2 which belongs to the same YopJ/AvrRxv family. How direct or indirect
368 interactions of HpaP with PopP1 and AvrA, respectively, promote their differential
369 secretion remains to be addressed. To date, no link between secretion/translocation
370 control by a protein of the YscP/FliK family and a direct interaction with T3Es could
371 be inferred. Büttner *et al.* (2006) showed that secretion was abolished for four *X.*
372 *campestris* pv. *vesicatoria* T3Es (AvrBs3, XopC, XopJ and XopF1), and HpaC_{Xcv} was

373 shown to be specifically involved in XopJ and XopF1 translocation whereas AvrBs3
374 and XopC translocation was HpaC_{Xcv} independent. Direct interaction studies also
375 showed that HpaC_{Xcv} was able to bind to AvrBs3 and XopF1, two T3Es with different
376 translocation behaviours. Secretion of the HrpE_{Xcv} pilin was not affected in the
377 absence of HpaC_{Xcv} (Büttner *et al.*, 2006). Lorenz and co-workers (2008) postulated a
378 type III secretion hierarchy in *X. campestris* pv. *vesicatoria* between early (HrpB2, a
379 protein required for pilus assembly) to later T3SS substrates (translocon and T3E
380 proteins). Our findings that HrpY is significantly over-produced in the cell pellets in
381 absence of HpaP suggest a control of HpaP on HrpY production or stability. HrpY is
382 also over-secreted in the *hpaP* mutant, with a regular increase over the time. This
383 could be linked to a switch model, where HpaP would act temporally by inhibiting
384 HrpY secretion at later time points when the pilus is formed. HpaP appears therefore
385 to control secretion of at least three T3SS substrates, including early (HrpY) and late
386 substrates (AvrA and PopP1).

387 To date, we still don't know if there is an order in the delivery of *R. solanacearum*
388 T3Es, but this study show that HpaP is a key player in pathogenicity on diverse
389 hosts, potentially through quantitative regulation of T3Es delivery into the plant cells.
390 It also suggests that T3S4 homolog proteins have developed different modes of
391 action, which is also supported by their relatively low level of conserved identity at the
392 protein level compared to T3SS structural components (Fig. 1). The fact that HpaP
393 and HpaC_{Xcv} proteins are not secreted indicates they do not act as molecular ruler
394 proteins as T3S4 proteins from animal pathogenic bacteria. It is noteworthy that the
395 highest identity between both proteins is located in the C-terminal part, defined as the
396 putative T3S4 domain. This domain was initially described in animal pathogenic
397 bacteria as required to switch substrate specificity for T3Es export when T3SS
398 assembly is completed (Agrain *et al.*, 2005). This study identified two sequences of
399 five amino acids in the T3S4 domain of HpaP in *R. solanacearum* required for
400 pathogenicity. Indeed, while the HpaP deletion derivatives are still able to interact
401 with the HpaP wild-type protein or with PopP1 (Fig. 7), we demonstrated that both
402 *hpaP* deletion derivatives can't complement the *hpaP* disruption mutant phenotype
403 for efficient PopP1 secretion or for disease establishment on tomato plants or on *A.*
404 *thaliana* (Fig. 8). Büttner *et al.* (2006) showed that the *hpaC_{Xcv}* mutant was displaying
405 reduced disease symptom formation and reduced HR on susceptible and resistant
406 pepper, respectively. Moreover, Schulz and Büttner work (2011) demonstrated that

Table 1 Strains and plasmids used in this study.

Relevant characteristics^a		References
<i>Plasmids used for cloning</i>		
pENTR/SD/D-TOPO	Gateway TM entry vector, Shine-Dalgarno sequence, Km ^r	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pDONR207	Gateway TM entry vector, Gm ^r Cm ^r	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pGEX-GW	Gateway TM expression vector, N-terminal GST fusion, Ap ^r	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pTH19-GW	Gateway TM expression vector, N-terminal 6His tag, Ap ^r	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pNP78	pENTR/SD/D-TOPO containing KQGS* between AttL1 and AttL2 sites, Km ^r	This study
pGBG	Matchmaker TM pGBKT7 yeast expression vector made Gateway TM compatible, N-terminal BD fusion, Km ^r , Cm ^r	L. Deslandes (unpublished)
pGAD	Matchmaker TM pGADT7 yeast expression vector made Gateway TM compatible, N-terminal AD fusion, Ap ^r , Cm ^r	L. Deslandes (unpublished)
pLBy10	pDONR207 derivative carrying <i>hpaP</i> , Gm ^r	This study
pMP17	pDONR207 derivative carrying <i>AvrA</i> , Gm ^r	This study
pNP200	pDONR207 derivative carrying <i>GALA7</i> , Gm ^r	This study
pDL154	pLBy10 derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 149 to 153, Gm ^r	This study
pDL152	pLBy10 derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 156 to 160, Gm ^r	This study
pNP260	pRCG derivative (Monteiro <i>et al.</i> , 2012) with the <i>GALA7</i> promoter followed by a Gateway TM destination cassette and a single HA epitope tag, Gm ^r Km ^r	This study
pNP329	pRCG derivative (Monteiro <i>et al.</i> , 2012) with the <i>GALA7</i> promoter followed by a Gateway TM destination cassette and a triple HA epitope tag, Gm ^r Km ^r	This study
pSC205	pET26B(+) derivative carrying a Gateway cassette, Km ^r	This study
pMT1	pSC205 derivative carrying <i>CyaA</i> ₄₋₁₁₉₇ N-terminal part, Km ^r	This study
pCM351	Allelic exchange vector, Ap ^r , Gm ^r , Tc ^r	Marx and Lidstrom (2002)
pAM5	pLAFR3 carrying 2 kb fragment containing <i>hrpB</i> , Tc ^r	Gueneron <i>et al.</i> (2000)
<i>Final vectors introduced in R. solanacearum by natural transformation</i>		
pGG18	pCM351 carrying upstream and downstream DNA fragments of the <i>hpaP</i> gene	This study
pGGL7	pNP260 derivative carrying <i>hpaP</i> , Gm ^r Km ^r	This study
pDL185	pNP329 derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 149 to 153, Gm ^r	This study
pDL186	pNP329 derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 156 to 160, Gm ^r	This study
pMT2	pMT1 derivative carrying <i>hpaP</i> , Km ^r	This study

407 the same two sequences of five amino acids were involved in these reduced
408 responses. Thus, HpaP and HpaC_{x_{cv}} proteins significantly contribute to bacterial
409 pathogenicity on their respective hosts, and the conserved sequences in the putative
410 T3S4 domains appear to be essential in this process. This work also shows that the
411 HpaP T3S4 sequences have distinct functional roles, being dispensable for the
412 HpaP-PopP1 interaction but necessary for HpaP-dependent PopP1 secretion. We
413 haven't yet been able to connect the plant phenotypes observed with the *hpaP*
414 deleted mutants with its control over T3E translocation. Our hypothesis is that,
415 beyond PopP1, HpaP could control delivery of other T3Es, collectively resulting in the
416 strong hypoaggressive phenotype of the *hpaP* mutant. Thus, to advance further in the
417 functional characterization of HpaP, a global comparison of the secretomes of the
418 wild-type strain and of the *hpaP* mutant could help to identify the sets of T3Es whose
419 secretion/translocation is controlled in part by HpaP and for their collective
420 involvement for disease establishment.

421

422 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

423

424 **Bacterial strains, plasmids, and growth conditions**

425 Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. coli* strains
426 were grown at 37°C in Luria-Bertani medium (Ausubel *et al.*, 1989). *R. solanacearum*
427 strains were grown in complete BG or minimal medium (MM) as described by
428 Poueymiro *et al.* (2009). When needed, antibiotics were added at the following final
429 concentrations (mg. L⁻¹): kanamycin 25; gentamycin 10; ampicillin 50;
430 chloramphenicol 25 for *E. coli* ; kanamycin, 50; spectinomycin, 40; gentamycin, 10;
431 tetracyclin, 10 for *R. solanacearum*. Plasmids used in this study were constructed by
432 Gateway technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the instructions of the
433 manufacturer.

434

435 **Phylogenetic analysis**

436 Construction of the phylogenetic tree was based on sequence similarities using the
437 maximum likelihood principle (Guindon *et al.*, 2009) via the phylogeny.fr platform
438 (Dereeper *et al.*, 2008). Sequences were first aligned using the MAFFT program and
439 edited using GBlocks (Castresana, 2000). We selected ten sequenced strains that
440 belong to all phylotypes: the reference strain GM11000 (Salanoubat *et al.*, 2002) from

pMT3	pMT1 derivative carrying <i>PopP1</i> , Km ^r	This study
pMT4	pMT1 derivative carrying <i>PopP2</i> , Km ^r	This study
pMT5	pMT1 derivative carrying <i>AvrA</i> , Km ^r	This study
pMT6	pMT1 derivative carrying <i>GALA7</i> , Km ^r	This study

Final vectors used for yeast two hybrid assays

pDL49	pGAD derivative carrying <i>hpaP</i> , Ap ^r	This study
pDL158	pGAD derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 149 to 153, Ap ^r	This study
pDL159	pGAD derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 156 to 160, Ap ^r	This study
pLD1	pGBG derivative carrying <i>PopP1</i> , Km ^r	This study
pLD2	pGBG derivative carrying <i>PopP2</i> , Km ^r	This study
pDL2	pGBG derivative carrying <i>AvrA</i> , Km ^r	This study
pNP210	pGBG derivative carrying <i>GALA7</i> , Km ^r	This study

Final vectors used for pull-down assays

pDL188	pGEX-GW derivative carrying KQGS*, Ap ^r	This study
pDL189	pGEX-GW derivative carrying <i>hpaP</i> , Ap ^r	This study
pDL171	pGEX-GW derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 149 to 153, Ap ^r	This study
pDL172	pGEX-GW derivative carrying <i>hpaP</i> deletion codons 156 to 160, Ap ^r	This study
pDL190	pTH19-GW derivative carrying <i>hpaP</i> , Ap ^r	This study
pDL191	pTH19-GW derivative carrying <i>PopP1</i> , Ap ^r	This study

Yeast strain

AH109	Matchmaker TM yeast strain	BD Biosciences, Palo Alto, USA
-------	---------------------------------------	--------------------------------

E.coli strain

BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB(r_B⁻ m_B⁻)</i>	Invitrogen, Life technologies, USA
-----------	---	------------------------------------

R. solanacearum strains

GMI1000	wild-type strain	Salanoubat <i>et al.</i> (2002)
GMI1415	<i>hpaP::Tn5B20</i> mutant, Km ^r	Gough <i>et al.</i> (1993)
GMI1694	<i>hrcV::Ω</i> mutant, Sp ^r	Cunnac <i>et al.</i> (2004)
GRS747	GMI1000Δ <i>hpaP</i> mutant, Gm ^r	This study

^a Ap^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Tc^r and Sp^r stand for resistances to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, tetracycline, and spectinomycin, respectively.

441 the phylotype I, Molk2 (C. Boucher and S. Genin, unpublished) from phylotype IIa,
442 IPO1609 (Guidot *et al.*, 2009), CFBP2957 (Remenant *et al.*, 2010), UW551 (Gabriel
443 *et al.*, 2006) and Po82 (Xu *et al.*, 2011) from phylotype IIb, CMR1594 (Remenant *et*
444 *al.*, 2010) from phylotype III and PSI07 (Remenant *et al.*, 2010), Blood Disease
445 Bacterium (BDB) strain R229 and *Ralstonia syzygii* strain R24 (Remenant *et al.*,
446 2011) from phylotype IV.

447

448 **Creation of a *hpaP* deletion strain, *hpaP* and *hpaP* Δ T3S4 complementation** 449 **constructs**

450 A *hpaP* deletion mutant was generated through a double recombination event using
451 the pCM351 cre-lox vector base (Marx and Lidstrom, 2002) carrying upstream and
452 downstream DNA fragments of the *hpaP* gene and named pGG18 (primers in
453 Supplementary Table S1). This construct was used to naturally transform strain
454 GMI1000 through natural transformation as described (Gonzalez *et al.*, 2011), thus
455 resulting in the Δ *hpaP* strain GRS747.

456 The GMI1415 *hpaP* mutant was complemented either with a wild-type *hpaP* copy or
457 two independent T3S4 domain deletion variants. The *hpaP* wild-type sequence
458 contained in the GatewayTM entry vector pLBy10 was cloned into pNP260. Linearized
459 plasmid was then integrated at a defined bacterial chromosome site (Monteiro *et al.*,
460 2012) into naturally competent *hpaP* mutant as described by Gonzalez *et al.* (2011)
461 (*hpaP*::*hpaP*⁺). To generate the *hpaP* T3S4 deletion derivatives, pLBy10 was used
462 as a template for PCR amplification to generate deletions using the QuikChange II XL
463 Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
464 Independent deletions were introduced between amino acids 149 to 153 and 156 to
465 160 (primers in Supplementary Table S1). Chromosomal insertions of the *hpaP*
466 deletion derivatives cloned into pNP329 were integrated into the *hpaP* mutant
467 (*hpaP*::*hpaP* $\Delta_{149-153}$ and *hpaP*::*hpaP* $\Delta_{155-160}$) by natural transformation as described
468 above.

469

470 **Plant assays and statistical analysis**

471 Twenty-four tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cultivar Super Marmande VR)
472 were inoculated with 40 ml of a bacterial suspension containing 10⁸ bacteria/mL as
473 described by Gonzalez *et al.* (2011). For *A. thaliana* Col-0 ecotype, 16 plants were
474 inoculated with 10⁸ bacteria/mL as described by Deslandes *et al.* (1998), without

Table S1 Primers used in this study.

Primers used:	Forward primer sequence 5'->3'	Reverse primer sequence 5'->3'
to clone upstream and downstream fragments of <i>hpaP</i> on pGG18	CTGGATCGCGCCGGCCACGT ATCCGCTCACCGACGACGACG	GCTGTAGCGCGGCGGCCATG ATGTCGAACTCGAACTCTGGT
to generate pDL154 (<i>hpaP</i> $\Delta_{149-153}$)	ACCCGCCTCACGCACACGCTATCG	CGATAGCGTGTGCGTGAGGCGGGT
to generate pDL152 (<i>hpaP</i> $\Delta_{155-160}$)	TCGCCGCACACGGAGGCCGGACAC	GTGTCCGGCCTCCGTGTGCGGCCGA
to amplify <i>CyaA</i> ' (<i>CyaA</i> $_{4-1197}$)	CGGAAAGCTTGAGCAATCGCATCAG	GTGGAACGCTAGCTCGAGGTCA

475 cutting the roots. Symptom appearance was scored daily and independently for each
476 plant, using a macroscopic scale describing the observed wilting: 0 for no wilting; 1
477 for 25% of leaves wilted; 2 for 50%; 3 for 75% and 4 for complete wilting. For
478 subsequent analysis the data were transformed into a binary index: 0 for less or
479 equal to 50% leaves wilted and 1 for >50% wilted leaves. The disease developments
480 of two given strains were compared using the Kaplan-Meier survival analysis (Bland
481 and Altman, 1998) with the Gehan-Breslow-Wilcoxon method to compute the *P*-value
482 to test the null hypothesis of identical survival experience of the tested strains. A *P*-
483 value smaller than 0.01 was considered significant. Each pathogenicity test was
484 repeated three times, and statistical analyses were performed with Prism version 5.0
485 (GraphPad Software).

486

487 ***In vitro* secretion assays and immunoblot analysis**

488 GMI1000 wild-type strain, GMI1694 *hrcV* mutant and GMI1415 *hpaP* mutant, carrying
489 the pAM5 plasmid (Guéneron *et al.*, 2000) that lead to a higher transcriptional activity
490 of T3SS-regulated genes (Table 1), were first cultivated in BG medium in overnight
491 cultures, pelleted for 5 min at 4000 rpm and then resuspended in MM at
492 OD_{600nm}=0.2. MM Bacteria cultures were then harvested after 8, 12 and 18 h of
493 culture, set at the same concentration and pelleted for 10 min at 5000 rpm. Pelleted
494 cells and supernatants were then treated as described by Poueymiro *et al.* (2009). To
495 compare the secretion of T3Es and of HrpY pilin between strains, equal amounts of
496 protein were loaded onto a SDS-PAGE, followed by electrophoresis and transfer to
497 Protran BA85 nitrocellulose membranes (Whatman, Germany). Antibodies used for
498 Western blotting were AvrA (Poueymiro *et al.*, 2009), PopP1 (Lavie *et al.*, 2002),
499 PopP2 (Courtesy of L. Deslandes, INRA/CNRS, Castanet Tolosan). The GALA7
500 polyclonal rabbit antibody was generated by a classical immunization protocol
501 (GeneCust Europe, Luxembourg) with the full length GALA7 protein purified from
502 *E. coli* as a 6His tagged protein. By using *R. solanacearum* single *gala* mutants, and
503 *E. coli* overexpressing recombinant GALA6 and GALA7 it was shown that this
504 antibody is specific to GALA7 and can't recognize its closest paralog GALA6. GALA7
505 antibody was used at 1:10,000 dilution. Goat anti-rabbit antibody conjugated with
506 horseradish peroxidase was used as secondary antibody (1:50,000) (Santa Cruz
507 Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.). At least three independent biological
508 replicates were made. Same experiments were made using *hpaP::hpaP*⁺,

509 *hpaP::hpaP Δ ₁₄₉₋₁₅₃* and *hpaP::hpaP Δ ₁₅₆₋₁₆₀* carrying the pAM5 plasmid. Experiment
510 was repeated twice.

511

512 **Adenylate cyclase (CyaA) translocation assay**

513 Translocation assays were carried out mostly as described in Poueymiro *et al.*
514 (2009). In order to allow the insertion of N-terminal part of the *CyaA* gene (*CyaA'*=
515 *CyaA*₄₋₁₁₉₇) at the locus of each protein studied, *CyaA'* was amplified (primers in
516 Supplementary Table S1) and cloned into pSC205 plasmid. *hpaP* and T3Es studied
517 (*AvrA*, *GALA7*, *PopP1* and *PopP2*) were then integrated into pMT1. *HpaP-CyaA'* and
518 *T3E-CyaA'* constructs were integrated into naturally competent strains (GMI1000
519 wild-type strain, GMI1694 *hrcV* mutant and GRS747 *hpaP* mutant). Bacteria carrying
520 the protein-*CyaA'* fusion were grown overnight at 28°C in BG medium supplemented
521 with half doses of antibiotics, then pelleted for 5 minutes at 4000 rpm and
522 resuspended in sterile water at OD_{600nm}=0.1. Bacteria were infiltrated into *Nicotiana*
523 *tabacum* cv. Bottom Special leaves, tissues were harvested after 7 hours and frozen
524 in liquid nitrogen. cAMP dosage was carried out using Amersham cAMP Biotrak
525 Enzyme immunoassay (EIA) kit by GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Four
526 independent biological replicates were made for each protein translocation tested.

527

528 **Yeast two-hybrid analysis**

529 Yeast two-hybrid analysis was performed using Matchmaker GAL4 Two-Hybrid
530 System 3 (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Generation of
531 plasmids carrying BD or AD fusions were done by GatewayTM LR recombination
532 using pGBG and pGAD. *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109 was co-
533 transformed with BD and AD fusion containing vectors and plated onto low-stringency
534 minimal synthetic-dropout (SD) medium (lacking leucine and tryptophan) to select for
535 the presence of both plasmids. Double transformants were tested for interaction by
536 spotting six successive 10-fold dilutions onto minimal SD medium lacking leucine,
537 tryptophan and histidine. 3-AT was added to suppress autoactivation by the bait
538 protein when necessary (0.5, 1, 2 and 5 mM 3-AT with *GALA7*, *HpaP Δ* derivatives,
539 *PopP2* and *AvrA*, respectively). Co-transformation of these two plasmids with our
540 constructs was also performed to verify the specificity of interaction. Each interaction
541 test was performed on four different colonies. Two to three biological repetitions were
542 made for each interaction tested.

543

544 **Glutathione S-transferase (GST) pull-down assays**

545 GST and GST fusion proteins were synthesized in *E. coli* BL21(DE3). Bacterial cells
546 from 50 mL cultures were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4
547 and sonicated 10 times for 15 s at 4°C by a Analog Sonifier Cell Disruptor (Branson).
548 Insoluble cell debris were removed by centrifugation at 16.000 g for 20 min at 4°C
549 and soluble GST and GST fusion proteins were immobilized on a glutathione
550 sepharose matrix for 1h at room temperature. Unbound proteins were removed by
551 washing twice with cold PBS containing 0.1% Triton X-100. Glutathione sepharose
552 matrix was then incubated with *E. coli* lysates containing the 6His fusion proteins for
553 1h at room temperature. Unbound proteins were removed by washing four times with
554 cold PBS containing 0.1% Triton X-100 and bound proteins were eluted twice with 10
555 mM reduced glutathione for 15 min at room temperature. 2 µL of input protein lysate
556 and 20 µL of eluted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE and immunoblotting
557 using anti-GST and anti-6His horseradish peroxidase-labeled antibodies. Antibody
558 reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).
559 Experiments were repeated at least twice.

560

561 **ACKNOWLEDGMENTS**

562

563 We thank Lenaïck Belliot for pLBy10 construct, Sébastien Cunnac for pSC205
564 plasmid, Marie Poueymiro for pMP17 plasmid and Guillaume Gacon-Labat for
565 pGG18. We thank Laurent Deslandes for providing yeast two-hybrid vectors and for
566 the generous gift of PopP2 antibody. We thank Jean Luc Pariente, Serge Bosc, and
567 Claudette Icher for tomato and tobacco plant preparation. We thank Amandine
568 Gastebois and Sébastien Cunnac for advices with translocation assays, Marie
569 Françoise Jardinaud for advices with statistical analyses. We also thank Susana
570 Rivas, Mathilde Fagard and Laurent Deslandes for helpful discussions. D.L. was
571 funded by a grant from the French Ministry of National Education and Research. This
572 work was supported by a French Agence Nationale de la Recherche grant (ANR-
573 2010-JCJC-1710-01) to F.V. Our work is performed at the LIPM that is part of the
574 Laboratoire d'Excellence (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

575

576 **REFERENCES**

- 578 **Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L.J. and Cornelis,**
579 **G.R.** (2005) Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch
580 (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **56**, 54-67.
- 581 **Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailliau, F., Baud, C., Gentzbittel, L.,**
582 **Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C. and Genin, S.** (2006) *Ralstonia*
583 *solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote
584 disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14620-14625.
- 585 **Arlat, M., van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C. and Boucher, C.A.** (1994)
586 PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific
587 *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas*
588 *solanacearum*. *Embo J*, **13**, 543-553.
- 589 **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.**
590 **and Struhl, K.** (1989) Current protocols in molecular biology. *Greene Publishing*
591 *Associates & Wiley Interscience, New York, NY.*
- 592 **Bland, J.M. and Altman, D.G.** (1998) Survival probabilities (the Kaplan-Meier
593 method). *BMJ*, **317**, 1572.
- 594 **Block, A., Li, G., Fu, Z.Q. and Alfano, J.R.** (2008) Phytopathogen type III effector
595 weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 396-403.
- 596 **Büttner, D.** (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and
597 regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic
598 bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **76**, 262-310.
- 599 **Büttner, D. and Bonas, U.** (2009) Regulation and secretion of *Xanthomonas*
600 virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, **34**, 107-133.
- 601 **Büttner, D. and He, S.Y.** (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic
602 bacteria. *Plant Physiol*, **150**, 1656-1664.
- 603 **Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E. and Bonas, U.** (2006) Targeting of two effector
604 protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent
605 protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*, **59**,
606 513-527.
- 607 **Canonne, J. and Rivas, S.** (2012) Bacterial effectors target the plant cell nucleus to
608 subvert host transcription. *Plant Signal Behav.* **7**, 217-221.
- 609 **Castresana, J.** (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for
610 their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 540-552.

611 **Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C. and Genin, S.** (2004)
612 Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia*
613 *solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host
614 cells through the type III secretion system. *Mol. Microbiol.* **53**, 115-128.

615 **Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F.,**
616 **Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. and**
617 **Gascuel, O.** (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-
618 specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, W465-469.

619 **Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C.,**
620 **Somssich, I., Genin, S. and Marco, Y.** (2003) Physical interaction between
621 RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III
622 effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 8024-
623 8029.

624 **Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E.,**
625 **Beynon, J., Arlat, M. and Marco, Y.** (1998) Genetic characterization of *RRS1*, a
626 recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial
627 soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 659-
628 667.

629 **Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz,**
630 **H. and Lloyd, S.A.** (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the
631 *Yersinia* type III secretion system. *J. Bacteriol.* **185**, 2259-2266.

632 **Feldman, M.F. and Cornelis, G.R.** (2003) The multitasking type III chaperones: all
633 you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 151-158.

634 **Genin, S. and Denny, T.P.** (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum*
635 Species Complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**, 67-89.

636 **Gonzalez, A., Plener, L., Restrepo, S., Boucher, C. and Genin, S.** (2011)
637 Detection and functional characterization of a large genomic deletion resulting in
638 decreased pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 strains.
639 *Environ. Microbiol.* **13**, 3172-3185.

640 **Gough, C.L., Genin, S., Lopes, V. and Boucher, C.A.** (1993) Homology between
641 the HrpO protein of *Pseudomonas solanacearum* and bacterial proteins implicated
642 in a signal peptide-independent secretion mechanism. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 378-
643 392.

644 **Guéneron, M., Timmers, A.C., Boucher, C. and Arlat, M.** (2000) Two novel
645 proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC,
646 which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the *hrp*-
647 secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **36**, 261-277.

648 **Guidot, A., Elbaz, M., Carrere, S., Siri, M.I., Pianzola, M.J., Prior, P. and**
649 **Boucher, C.** (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia*
650 *solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology*, **99**,
651 1105-1112.

652 **Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.F. and Gascuel, O.** (2009) Estimating
653 maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol. Biol.* **537**, 113-137.

654 **Hayward, A.C.** (2000) *Ralstonia solanacearum*. *Encyclopaedia of Microbiology. J.*
655 *Lederberg, ed. Academic Press, San Diego, CA*, 32-42.

656 **He, S.Y., Nomura, K. and Whittam, T.S.** (2004) Type III protein secretion
657 mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**,
658 181-206.

659 **Hueck, C.J.** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of
660 animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.

661 **Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G.R.** (2003) The needle length of
662 bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, **302**, 1757-
663 1760.

664 **Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T.** (2002) MAFFT: a novel method for
665 rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids*
666 *Res.* **30**, 3059-3066.

667 **Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N. and Boucher, C.** (2002)
668 PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts
669 as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia*
670 *solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 1058-1068.

671 **Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. and Büttner, D.** (2008)
672 HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system.
673 *PLoS Pathog.* **4**, e1000094.

674 **Marx, C.J. and Lidstrom, M.E.** (2002) Broad-host-range cre-lox system for antibiotic
675 marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques*, **33**, 1062-1067.

676 **McCann, H.C. and Guttman, D.S.** (2008) Evolution of the type III secretion system
677 and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol.* **177**, 33-47.

678 **Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S.I. and Macnab,**
679 **R.M.** (1999) FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in
680 *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol. Microbiol.* **34**, 295-304.

681 **Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I. and Valls, M.** (2012) A chromosomal insertion
682 toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies
683 in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 557-568.

684 **Morello, J.E. and Collmer, A.** (2009) *Pseudomonas syringae* HrpP Is a type III
685 secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant
686 cells but functions atypically for a substrate-switching protein. *J. Bacteriol.* **191**,
687 3120-3131.

688 **Mukaihara, T., Tamura, N. and Iwabuchi, M.** (2010) Genome-wide identification of
689 a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new
690 functional screen. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 251-262.

691 **Mukaihara, T., Tamura, N., Murata, Y. and Iwabuchi, M.** (2004) Genetic screening
692 of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional
693 activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **54**, 863-875.

694 **Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L.** (2003) The various and varying roles of
695 specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7-14.

696 **Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., Stocker, B.A. and Yamaguchi, S.** (1973) A
697 new *fla* gene in *Salmonella typhimurium*--*flaR*--and its mutant phenotype-
698 superhooks. *Arch. Mikrobiol.* **90**, 107-120.

699 **Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F. and Valls, M.** (2013) *Ralstonia solanacearum*,
700 a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.*
701 doi: 10.1111/mpp.12038.

702 **Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-**
703 **Noel, A.C., Boucher, C. and Genin, S.** (2009) Two type III secretion system
704 effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity
705 on tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**, 538-550.

706 **Poueymiro, M. and Genin, S.** (2009) Secreted proteins from *Ralstonia*
707 *solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 44-52.

708 **Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen,**
709 **C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D.,**
710 **Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C. and Prior, P.** (2010) Genomes of three

711 tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal
712 significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, **11**, 379.

713 **Remenant, B., de Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe,**
714 **V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C. and Prior, P.**
715 (2011) *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R.*
716 *solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles.
717 *PLoS One*, **6**, e24356.

718 **Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S. and Peeters, N.** (2011)
719 Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to
720 *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytol.* **192**,
721 976-987.

722 **Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M.,**
723 **Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N.,**
724 **Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan,**
725 **A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M.,**
726 **Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A.** (2002) Genome
727 sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.

728 **Schechter, L.M., Roberts, K.A., Jamir, Y., Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004)
729 *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel
730 effectors studied with a *Cya* translocation reporter. *J. Bacteriol.* **186**, 543-555.

731 **Schulz, S. and Büttner, D.** (2011) Functional characterization of the type III
732 secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas campestris*
733 *pv. vesicatoria*. *Infect. Immun.* **79**, 2998-3011.

734 **Sole, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D., Deslandes, L. and Valls, M.**
735 (2012) The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum*
736 type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Mol. Plant-Microbe*
737 *Interact.* **25**, 941-953.

738 **Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova,**
739 **S.N., Kokkinidis, M. and Panopoulos, N.J.** (2010) Playing the "Harp": evolution
740 of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 347-370.

741 **Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.J., Vaillieu, F., Gentzbittel, L. and**
742 **Jardinaud, M.F.** (2009) Dissection of bacterial Wilt on *Medicago truncatula*
743 revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process
744 and disease development. *Plant Physiol.* **150**, 1713-1722.

745 **van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P. and Boucher, C. (2002)**
746 Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the
747 HrpV and HrpX proteins are required for *Hrp* pilus assembly. *Mol. Microbiol.* **44**,
748 935-946.

749 **Xu, J., Zheng, H.J., Liu, L., Pan, Z.C., Prior, P., Tang, B., Xu, J.S., Zhang, H.,**
750 **Tian, Q., Zhang, L.Q. and Feng, J. (2011)** Complete genome sequence of the
751 plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82. *J. Bacteriol.* **193**, 4261-4262.
752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

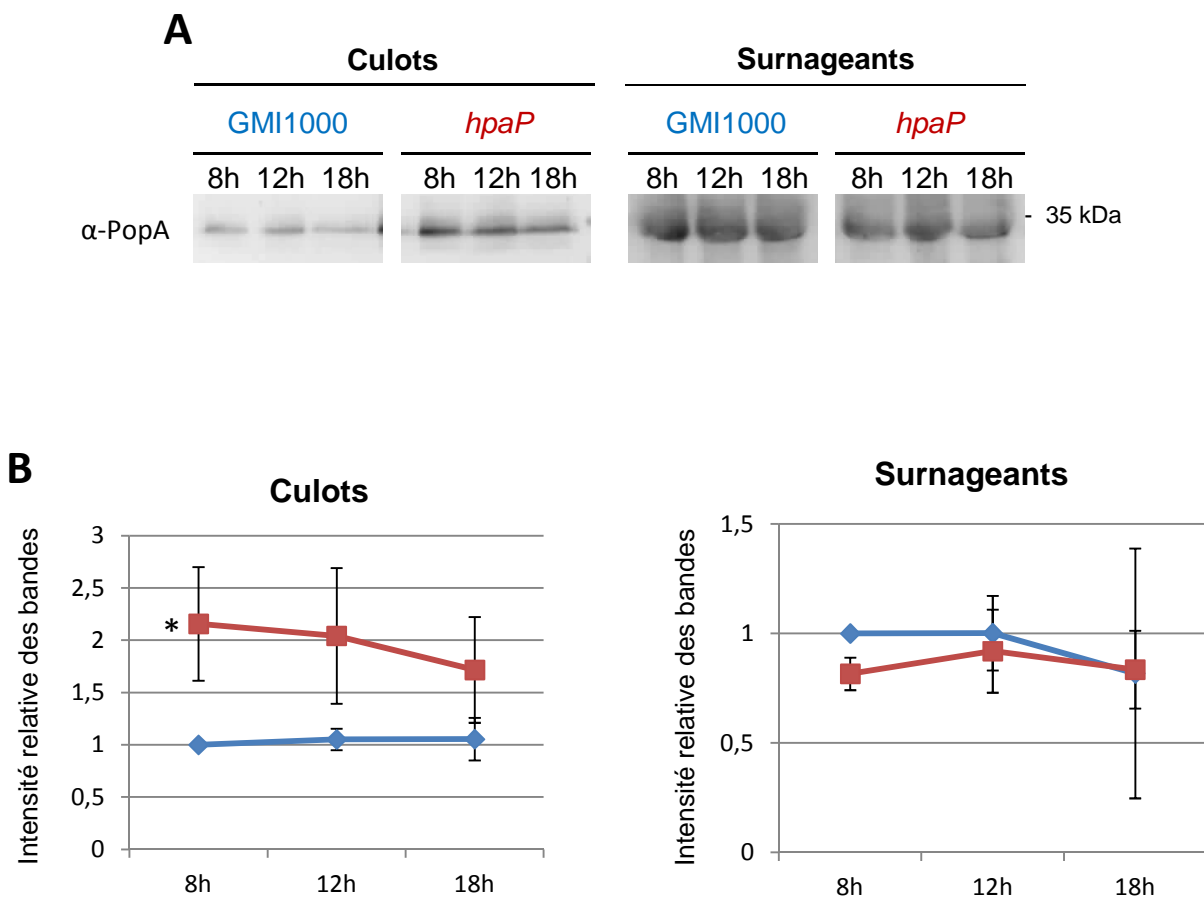


Figure 32. HpaP ne module pas la sécrétion de l'ET3 PopA mais inhibe son accumulation dans la bactérie. La souche sauvage GMI1000 (bleue) et le mutant *hpaP* (rouge) ont été cultivés en milieu minimum inducteur de la sécrétion de type III. Les surnageants de culture et les culots bactériens ont été séparés après 8, 12 et 18h de culture, puis analysés par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre PopA (A). L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel GeneTools (Syngene). La valeur obtenue pour la souche GMI1000 au temps 8h a servi de référence. Pour chaque valeur a été calculé le ratio des intensités comparé à cette référence. Les graphes représentent les moyennes des ratios obtenus pour trois répétitions biologiques (B). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne des trois valeurs. L'astérisque symbolise une différence significative entre la souche GMI1000 et le mutant *hpaP* (p-value < 0,01).

II. HpaP module l'accumulation dans la bactérie de la harpine PopA

Les résultats précédents suggèrent que HpaP module la sécrétion des ET3s PopP1 et AvrA de manières positive et négative, respectivement. En revanche, la sécrétion des ET3s PopP2 et GALA7 n'est pas altérée chez le mutant *hpaP*. La modulation de la sécrétion d'ET3s par HpaP présente donc une certaine spécificité. Hormis pour ces ET3s, l'effet de HpaP a également été analysé sur la sécrétion de la protéine PopA, caractérisée comme une probable harpine (Arlat *et al.*, 1994). Comme pour l'étude de la sécrétion des autres ET3s, la souche sauvage GMI1000 et le mutant *hpaP* ont été cultivés en milieu minimum, activateur de la sécrétion de type III. Les culots cellulaires et les surnageants ont été analysés par Western Blot après 8, 12 et 18 heures de culture, à l'aide d'un anticorps dirigé contre PopA (Figure 32 A). La quantification des bandes suivie d'un test statistique (ANOVA) révèle que la sécrétion de PopA n'est pas différentielle entre la souche sauvage et le mutant *hpaP* (p-value = 0,89) (Figure 32 B). En revanche, la quantité de PopA dans les culots bactériens est significativement plus importante dans le mutant *hpaP* que dans la souche sauvage (p-value = $1,8 \cdot 10^{-4}$). Ces résultats suggèrent que HpaP ne contrôle pas la sécrétion de PopA mais exerce un effet inhibiteur sur le niveau d'accumulation cytoplasmique de cet ET3.

III. La mutation de *hpaP* n'affecte pas la croissance bactérienne *in planta*

Les résultats présentés dans l'article mettent en avant le rôle capital de la protéine HpaP pour le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur plusieurs plantes hôtes, dont *A. thaliana*. Afin de mieux caractériser le rôle de HpaP dans l'établissement de la maladie, la croissance de *R. solanacearum in planta* a été déterminée 5 jours après inoculation, après broyage des plantes d'*A. thaliana* inoculées, étalement et dénombrement des colonies sur boîtes de Pétri. La souche sauvage GMI1000, le mutant *hpaP*, ainsi que ce même mutant exprimant la version sauvage de *hpaP* ou les versions de délétion des acides aminés conservés du

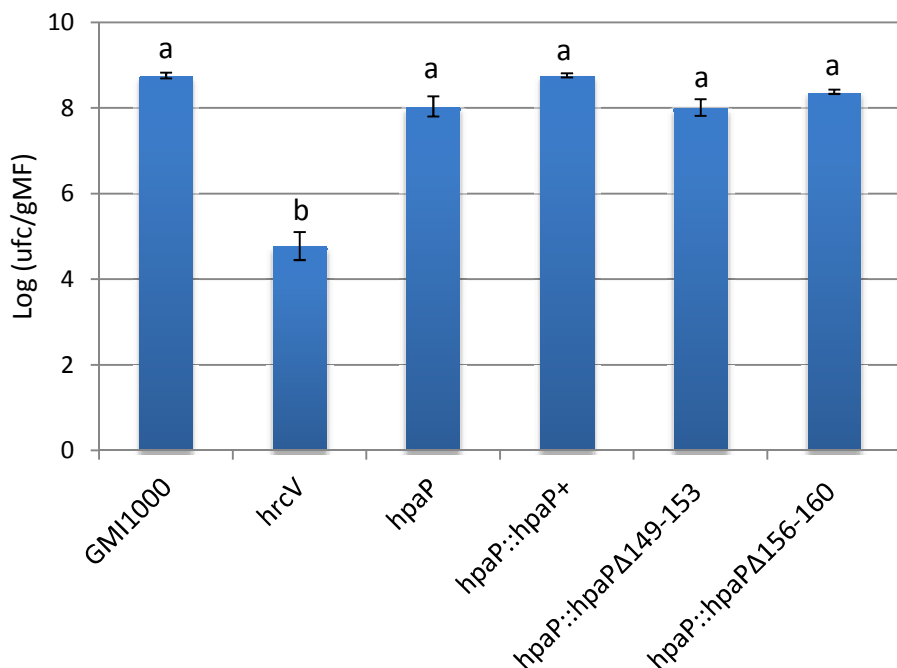


Figure 33. Croissance *in planta* de différents mutants du gène *hpaP*. La souche sauvage GMI1000, le mutant *hpaP*, ainsi que ce même mutant exprimant la version sauvage de *hpaP* (*hpaP::hpaP+*) ou les versions de délétion des acides aminés conservés du domaine T3S4 (*hpaP::hpaPΔ149-153* et *hpaP::hpaPΔ156-160*) ont été inoculés par arrosage sur *A. thaliana* à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les populations bactériennes *in planta* ont été déterminées 5 jours après inoculation, après broyage des plantes infectées, étalement et dénombrement des colonies sur boîtes de Pétri. Les résultats représentent la moyenne des données obtenues sur trois lots indépendants de trois plantes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne des trois valeurs. Les groupes statistiquement différents, obtenus à l'aide d'un test ANOVA et d'un test de Tukey (p -value < 0,05), sont indiqués par les lettres a et b. Trois répétitions biologiques ont été réalisées et donnent des résultats similaires.

domaine T3S4 (acides aminés 149 à 153 et 156 à 160) ont été utilisés. Le mutant *hrcV*, dont le SST3 est déficient, a été inclus comme témoin d'une souche non pathogène. Les résultats indiquent que la souche sauvage est capable de se multiplier *in planta* à hauteur d'environ 8 log(UFC/gMF) (Figure 33). Conformément aux attentes, le mutant *hrcV* exhibe une croissance *in planta* beaucoup plus faible que celle atteinte par la souche sauvage, avec une différence d'environ 4 log comparé à cette dernière. De manière plus surprenante, les données révèlent que les mutants *hpaP* exprimant ou non une version sauvage de *hpaP* se multiplient de manière similaire à la souche sauvage. Les mutants *hpaP* exprimant les versions de délétion des deux régions conservées du domaine T3S4 se comportent quant à eux comme le mutant *hpaP*. Un test ANOVA suivi d'un test de Tukey ont permis de révéler une différence significative entre le comportement du mutant *hrcV* et celui de l'ensemble des autres souches, dont les croissances *in planta* ne sont pas significativement différentes. Ces résultats mettent en exergue la capacité du mutant *hpaP* à se multiplier *in planta* comme la souche sauvage, en dépit d'un pouvoir pathogène significativement plus faible.

IV. La diminution de sécrétion/translocation de PopP1 chez le mutant *hpaP* n'impacte pas l'avirulence de *R. solanacearum* GMI1000 sur l'écotype résistant St40 du Pétunia

Les résultats présentés dans l'article suggèrent que la sécrétion et la translocation de l'ET3 PopP1 sont diminuées chez le mutant *hpaP*, par rapport à la souche sauvage GMI1000. Or, PopP1 a été caractérisé comme un facteur d'avirulence sur l'écotype St40 du Pétunia : alors que la souche GMI1000 est avirulente sur cet écotpe, un mutant *popP1* se révèle virulent (Lavie *et al.*, 2002). De même, la souche virulente Rd15 devient avirulente lorsqu'elle exprime PopP1. Nous avons dès lors testé si le niveau de sécrétion de PopP1 par le mutant *hpaP* était suffisant pour entraîner l'avirulence de la bactérie. La souche sauvage, le mutant *hpaP* et le mutant *popP1* ont été inoculés sur l'écotype St40 du Pétunia. Des courbes de survie ont été réalisées en suivant régulièrement les symptômes. Quatre

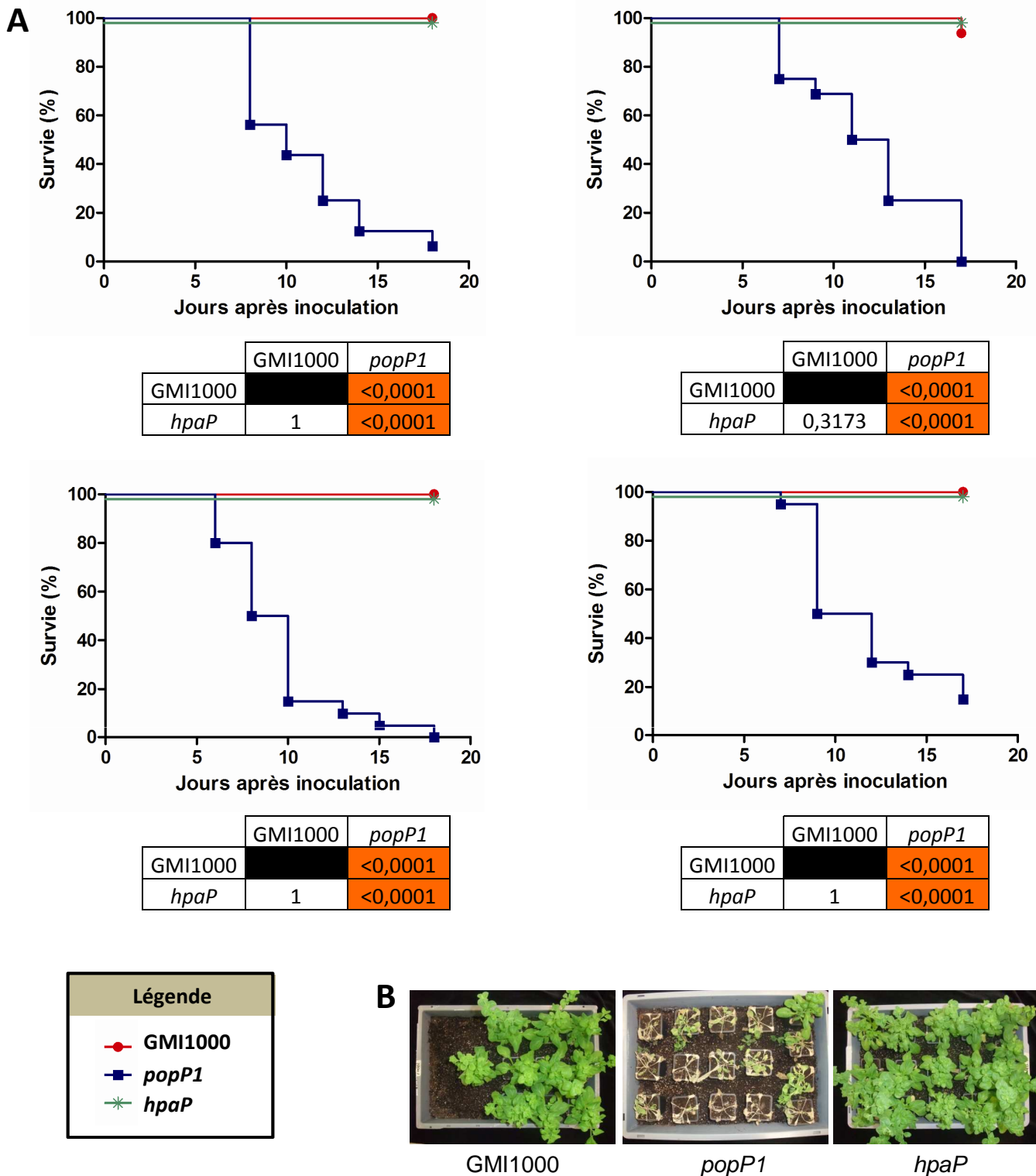
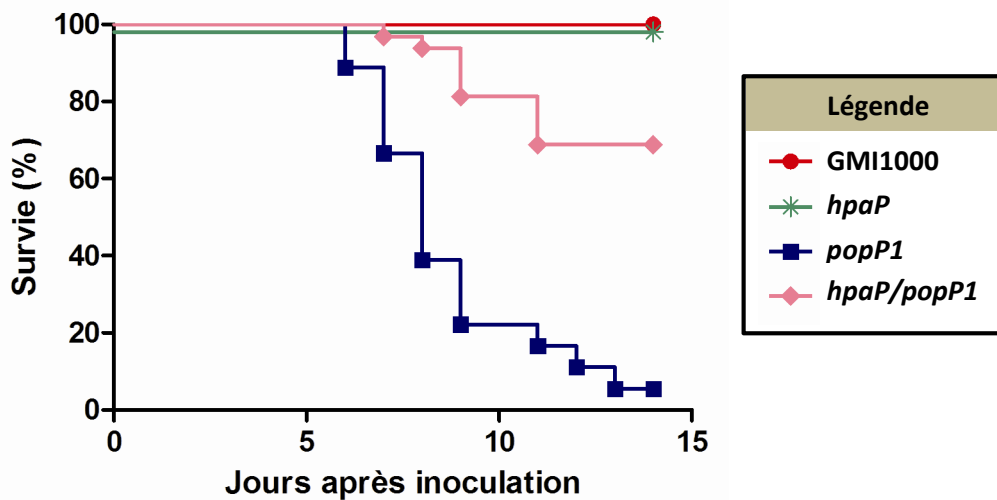


Figure 34. Pouvoir pathogène du mutant *hpaP* sur l'écotype St40 du Pétunia, résistant à *R. solanacearum* GMI1000. A) Courbes de survie de plantes de Pétunia inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et les mutants *popP1* (bleu) et *hpaP* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur au moins 16 plantes, à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les quatre répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01. B) Photos des plantes prises 17 jours après inoculation.



	GMI1000	<i>popP1</i>	<i>hpaP</i>
<i>hpaP/popP1</i>	0,0101	<0,0001	0,0101

Figure 35. Pouvoir pathogène du double mutant *hpaP/popP1* sur l'écotype St40 du Pétunia, résistant à *R. solanacearum* GMI1000. Courbes de survie de plantes de Pétunia inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge), les mutants *popP1* (bleu), *hpaP* (vert), et le double mutants *hpaP/popP1* (rose). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 18 à 32 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous le graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.

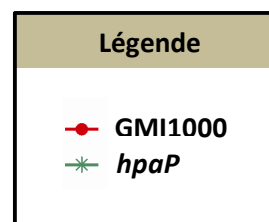
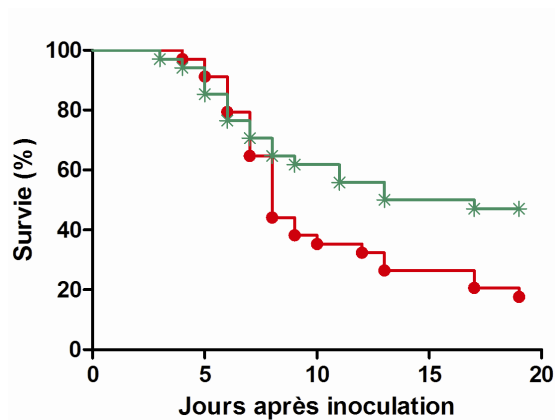
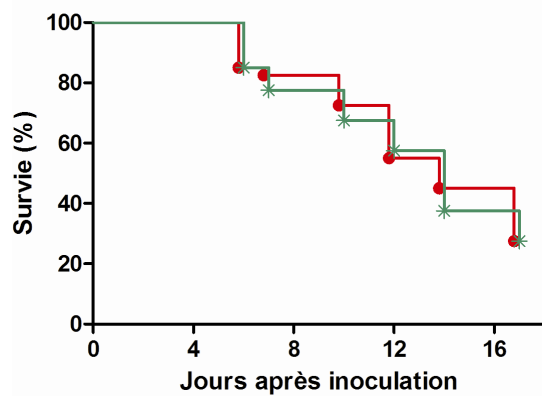
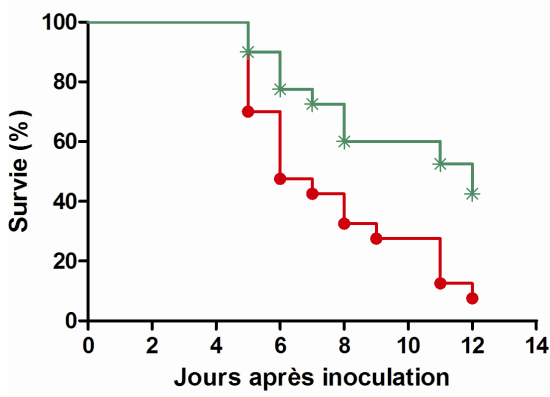
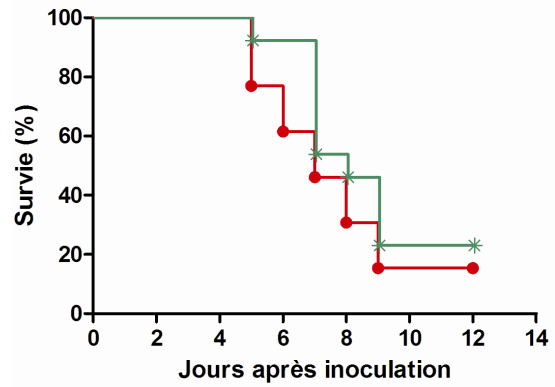
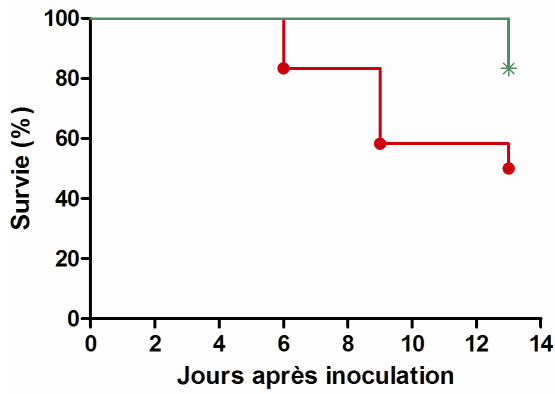


Figure 36. Implication de HpaP dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur Aubergine. Courbes de survie de plantes d'Aubergine inoculées avec la souche sauvage GMI1000 (rouge) et le mutant *hpaP* (vert). Chaque souche a été inoculée par arrosage sur 24 plantes à une densité cellulaire de 10^8 ufc/mL. Les cinq répétitions biologiques sont représentées. Les p-values issues des tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon sont affichées sous chaque graphe. Les cases oranges indiquent les p-values inférieures à 0,01.

répétitions biologiques ont abouti à des résultats similaires. La souche GMI1000 est incapable de provoquer des symptômes de maladie, contrairement au mutant *popP1* (Figure 34). Les données montrent également que le mutant *hpaP* est non virulent. Ces résultats suggèrent deux scénarios distincts : i) le niveau de translocation de PopP1 par le mutant *hpaP* est suffisant pour exercer sa fonction de facteur d'avirulence, ou ii) à la perte de l'effet avirulent de PopP1 chez le mutant *hpaP* s'ajoute un effet négatif sur la translocation d'autres ET3s collectivement requis pour le pouvoir pathogène.

Afin de tester ces hypothèses, le pouvoir pathogène d'un double mutant *hpaP-popP1* sur l'écotype St40 du Pétunia a été comparé aux précédentes souches. Les résultats indiquent que la courbe de survie liée au double mutant *hpaP-popP1* est significativement différente de celles de la souche sauvage (p-value = 0,010) et du mutant *popP1* (p-value < 0,0001) (Figure 35). Le double mutant *hpaP-popP1* semble donc virulent mais présente un pouvoir pathogène diminué par rapport au mutant *popP1*. Ceci suggère d'une part que la perte de virulence du mutant *hpaP* sur Pétunia est conférée par le facteur d'avirulence PopP1, et d'autre part que HpaP module probablement la translocation d'un ou plusieurs autres ET3s importants pour le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur Pétunia en absence de PopP1.

V. HpaP revêt une importance hôte-dépendante pour le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*

HpaP s'est révélé important pour le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur plusieurs plantes hôtes (*A. thaliana*, Tomate et Pétunia en absence de PopP1), sans être nécessaire à la virulence de la bactérie. En revanche, HpaP est strictement requis pour la virulence sur *M. truncatula* (F. Vaillau, données non publiées). Le comportement du mutant *hpaP* a également été analysé vis-à-vis de l'Aubergine. Le mutant *hpaP* et la souche sauvage GMI1000 ont été inoculés sur Aubergine par arrosage et les symptômes ont été suivis au cours du temps lors de cinq répétitions biologiques. Quatre d'entre elles ont abouti à des résultats similaires : les courbes de survie associées à la souche GMI1000 et au mutant *hpaP* ne se sont pas révélées statistiquement différentes (p-value > 0,01) (Figure 36). A l'inverse, une différence significative a été identifiée pour une des cinq répétitions (p-value = 0,0002).

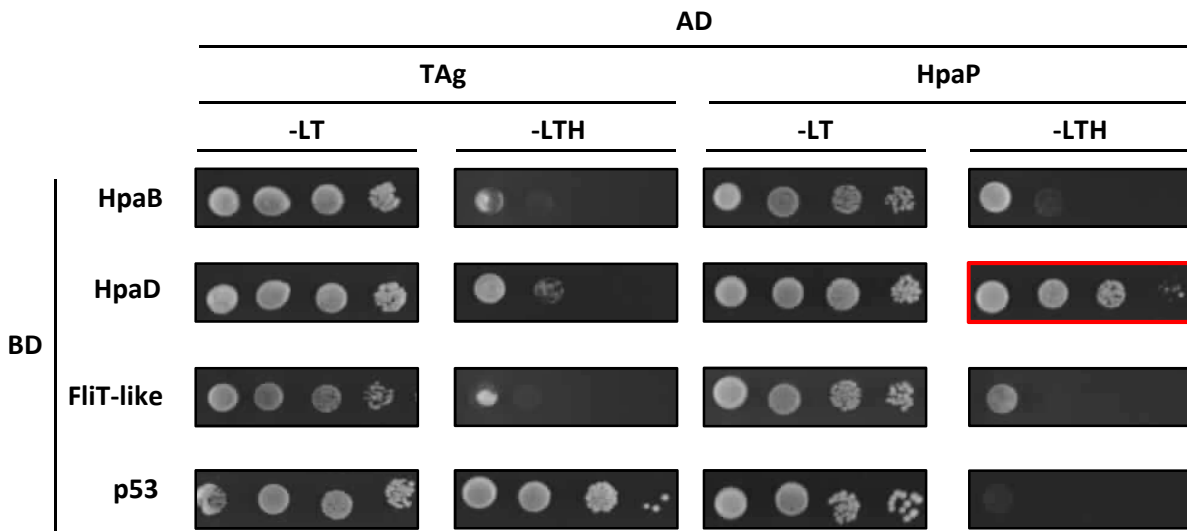


Figure 37. HpaP interagit spécifiquement avec HpaD. Les interactions entre HpaP et les CT3s putatives HpaB, HpaD et FliT-like ont été testées par double-hybride chez la levure dans les deux sens d'interaction. Les croissances des levures sur les milieux sélectifs -LT (sans leucine ni tryptophane ; témoin de co-transformation) et -LTH (-LT sans histidine ; témoin d'interaction) sont représentés. Les résultats positifs sont encadrés en rouge. Les protéines de fusion AD-TAg (antigène T) et BD-p53 sont utilisées comme témoins. AD : domaine d'activation ; BD : domaine de liaison à l'ADN. Deux répétitions biologiques ont été réalisées et donnent des résultats similaires.

Globalement, les résultats semblent plutôt indiquer que la mutation de *hpaP* n'impacte pas le pouvoir pathogène de la bactérie sur Aubergine. L'importance de HpaP pour la pathogénie de *R. solanacearum* apparaît ainsi hôte-dépendante.

VI. HpaP interagit physiquement avec la CT3 putative

HpaD

Précédemment, nous avons tenté d'identifier des interactions protéine-protéine entre HpaP et quatre ET3s dont les profils de sécrétion chez le mutant *hpaP* ont été suivis (PopP1, PopP2, GALA7, AvrA). Seule une interaction entre HapP et PopP1 a été démontrée. Afin d'avoir une vision plus complète des ET3s dont la sécrétion pourrait être contrôlée par HpaP, des tests d'interaction en double-hybride chez la levure ont été réalisés avec 38 ET3s supplémentaires (38 fusionnés au domaine AD, dont 15 également fusionnés au domaine BD ; Tableau 4). Aucune nouvelle interaction n'a pu être mise en évidence (données non montrées). Notons cependant que l'unique interaction positive détectée en double-hybride chez la levure (*i.e.* entre HpaP et PopP1) n'est identifiable que lorsque la protéine HpaP est fusionnée au domaine AD, et pas au domaine BD. De plus, l'identification de l'interaction de la protéine HpaP avec elle-même a nécessité l'utilisation de la technique du GST pull-down, aucune interaction n'étant visible en double-hybride chez la levure. Ces observations suggèrent que l'utilisation de HpaP fusionnée au domaine BD ne puisse peut-être pas permettre d'identifier de potentielles interactions en double-hybride chez la levure.

L'ensemble des tests d'interaction protéine-protéine réalisés jusqu'à présent ont mis en exergue la capacité de la protéine de type T3S4 HpaP et des CT3s putatives HpaB et HpaD à interagir avec un ET3 commun : PopP1. Dès lors, il est possible que HpaP puisse être associée physiquement à des CT3s, en participant potentiellement au contrôle de la sécrétion d'ET3s ciblés de manière commune. Ainsi, les interactions entre HpaP et les trois CT3s putatives HpaB, HpaD et FliT-like ont été testées en double-hybride chez la levure, et ce dans les deux sens d'interaction. Les résultats indiquent une interaction spécifique entre HpaP et HpaD (Figure 37). Il faut de nouveau noter que cette interaction n'est détectée que lorsque HpaP est fusionnée au domaine AD, soutenant l'hypothèse précédemment avancée qu'une

protéine de fusion BD-HpaP ne permet probablement pas l'identification d'interactions protéine-protéine par double-hybride chez la levure.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 5. Liste des plasmides et souches utilisés dans cette étude

Plasmides pour les tests d'interaction en double-hybride	Descriptions	Références
pGBG	vecteur d'expression dans la levure pGBKT7 Matchmaker™ possédant une cassette Gateway™, permet l'expression d'une fusion N-terminale avec le domaine de liaison à l'ADN (BD) de GAL4, Km ^R , Cm ^R	L. Deslandes (LIPM)
pGAD	vecteur d'expression dans la levure pGADT7 Matchmaker™ possédant une cassette Gateway™, permet l'expression d'une fusion N-terminale avec le domaine d'activation (AD) de GAL4, Ap ^R , Cm ^R	L. Deslandes (LIPM)
pDL1	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAW</i> , Km ^R	cette étude
pDL2	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAA</i> , Km ^R	cette étude
pDL3	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG4</i> , Km ^R	cette étude
pDL4	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG5</i> , Km ^R	cette étude
pLD1	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>popP1</i> , Km ^R	L. Deslandes (LIPM)
pLD2	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>popP2</i> , Km ^R	L. Deslandes (LIPM)
pGG19	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAV</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG20	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAG</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG21	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAD</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG22	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAZ1</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG23	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAJ</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG24	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAF1</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG25	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripO1</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG26	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripAK</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pGG27	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripW</i> , Km ^R	G. Gacon-Labat (LIPM)
pAA101	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG1</i> , Km ^R	A. Angot (LIPM)
pAA103	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG3</i> , Km ^R	A. Angot (LIPM)
pAA96	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG6</i> , Km ^R	A. Angot (LIPM)
pNP210	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>ripG7</i> , Km ^R	N. Peeters (LIPM)
pDL5	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>hpaP</i> , Km ^R	cette étude
pDL6	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>hpaB</i> , Km ^R	cette étude
pDL7	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>hpaD</i> , Km ^R	cette étude
pDL8	vecteur dérivé de pGBG portant le gène <i>flit-like</i> , Km ^R	cette étude
pDL9	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripI</i> , Ap ^R	cette étude
pDL10	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripU</i> , Ap ^R	cette étude
pDL11	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>RSp0216</i> , Ap ^R	cette étude
pDL12	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAV</i> , Ap ^R	cette étude
pDL13	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAG</i> , Ap ^R	cette étude
pDL14	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAD</i> , Ap ^R	cette étude
pDL15	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAZ1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL16	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAJ</i> , Ap ^R	cette étude
pDL17	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAF1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL18	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripO1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL19	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripZ</i> , Ap ^R	cette étude
pDL20	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAM</i> , Ap ^R	cette étude

I. Matériel

I.1. Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes utilisées au cours de ces travaux sont listées dans l'article du chapitre II des résultats et dans le Tableau 5. Les souches d'*E. coli* et de *R. solanacearum* ont été cultivées respectivement à 37°C en milieu Luria-Bertani (Ausubel *et al.*, 1989) et à 28°C en milieu riche BG ou en milieu minimum comme précédemment décrit (Poueymiro *et al.*, 2009). Lorsque nécessaire, des antibiotiques ont été rajoutés aux concentrations finales suivantes (mg. L⁻¹) : kanamycine 25, gentamycine 10, ampicilline 50 et chloramphenicol 25 pour *E. coli* ; kanamycine 50, spectinomycine 40, gentamycine 10 et tétracycline 10 pour *R. solanacearum*.

I.2. Matériel végétal et conditions de culture

Les plantes suivantes ont été utilisées dans ces travaux : l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, la Tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Super Marmande VR), l'Aubergine (*Solanum melongena* cv. MM738), la lignée A17 de *M. truncatula*, le Pétunia (*Petunia hybrida* écotype St-40) et le Tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Bottom Special).

Les graines d'*A. thaliana* sont stérilisées dans de l'eau de Javel à 12°C pendant 20 minutes puis rincées 5 fois dans de l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite semées en boîtes de Pétri sur milieu Murashige-Skoog (4,41 g.L⁻¹ ; pH 5,8) supplémenté avec du saccharose (30 g.L⁻¹) et de la vitamine B5. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture (20°C ; 16h lumière/8h obscurité). Les plantules d'une semaine sont finalement repiquées sur des blocs de tourbe (Jiffy) puis cultivées en chambre de culture (22°C ; 8h lumière/16h obscurité).

Les graines de *M. truncatula* sont scarifiées chimiquement dans un bain d'acide sulfurique pur (H₂SO₄) pendant 5 minutes. Après 2 rinçages dans de l'eau distillée, les graines sont désinfectées par 5 mL d'eau de Javel à 12°C pendant 1 minute et 30 secondes puis rincées 6 fois dans de l'eau distillée stérile. Les graines sont mises

Tableau 5 (suite). Liste des plasmides et souches utilisés dans cette étude

pDL21	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripH2</i> , Ap ^R	cette étude
pDL22	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAK</i> , Ap ^R	cette étude
pDL23	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAN</i> , Ap ^R	cette étude
pDL24	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAW</i> , Ap ^R	cette étude
pDL25	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripQ</i> , Ap ^R	cette étude
pDL26	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripV1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL27	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAY</i> , Ap ^R	cette étude
pDL28	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripH1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL29	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripR</i> , Ap ^R	cette étude
pDL30	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripW</i> , Ap ^R	cette étude
pDL31	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>RSp0882</i> , Ap ^R	cette étude
pDL32	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>RSp0218</i> , Ap ^R	cette étude
pDL33	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripA2</i> , Ap ^R	cette étude
pDL34	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripA4</i> , Ap ^R	cette étude
pDL35	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripA3</i> , Ap ^R	cette étude
pDL36	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripA5</i> , Ap ^R	cette étude
pDL37	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripA1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL38	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripTPS</i> , Ap ^R	cette étude
pDL39	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripAA</i> , Ap ^R	cette étude
pDL40	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG4</i> , Ap ^R	cette étude
pDL41	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG5</i> , Ap ^R	cette étude
pDL42	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG6</i> , Ap ^R	cette étude
pDL43	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG7</i> , Ap ^R	cette étude
pDL44	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripB</i> , Ap ^R	cette étude
pDL45	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG1</i> , Ap ^R	cette étude
pDL46	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripG3</i> , Ap ^R	cette étude
pDL47	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripH3</i> , Ap ^R	cette étude
pDL48	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>ripTAL</i> , Ap ^R	cette étude
pLD3	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>popP1</i> , Ap ^R	L. Deslandes (LIPM)
pLD4	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>popP2</i> , Ap ^R	L. Deslandes (LIPM)
pDL49	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>hpaP</i> , Ap ^R	cette étude
pDL50	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>hpaB</i> , Ap ^R	cette étude
pDL51	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>hpaD</i> , Ap ^R	cette étude
pDL52	vecteur dérivé de pGAD portant le gène <i>fliT-like</i> , Ap ^R	cette étude

Souches de <i>R. solanacearum</i>	Descriptions	Références
GMI1658	mutant <i>popP1::Ω</i> , Sp ^R	Lavie <i>et al.</i> , 2002
GRS474	mutant <i>hpaB::Ω</i> , Sp ^R	S. Genin (LIPM)
GRS266	mutant <i>hpaD::Ω</i> , Sp ^R	S. Genin (LIPM)
GRS513	mutant <i>fliT-like::Ω</i> , Sp ^R	S. Genin (LIPM)
GMI1415ΔpopP1	<i>hpaP::Tn5B20</i> , <i>popP1::Ω</i> , Km ^R , Sp ^R	F. Vailleau (LIPM)

à imbiber 30 minutes dans le dernier bain d'eau puis sont étalées en boîtes de Pétri sur du Bacto-Agar (Difco, 7g.L⁻¹) et incubées à 4°C pendant 48 h. Les graines sont ensuite transférées à 20°C pendant 16h puis les plantules germées sont repiquées sur boîtes de Pétri carrées (12 x 12 cm) contenant du milieu Fahræus incliné (Barker *et al.*, 2007). Une interface de papier de germination CYG (Mega International) (Vaillieu *et al.*, 2007) empêche les racines de pénétrer dans le milieu gélifié. Les boîtes sont placées verticalement en chambre de culture (25°C ; 16h lumière/8h obscurité).

Les graines de Tomate, Aubergine, Pétunia et Tabac sont semées sur terreau et cultivées sous serre (20-22°C ; 16h lumière/8h obscurité).

II. Méthodes

II.1. Test de sécrétion de protéines *in vitro*

Les souches de *R. solanacearum* portant le plasmide pAM5 (Guénéron *et al.*, 2000), qui permet un plus fort niveau de transcriptions des gènes du SST3 régulés par HrpB, sont cultivées en milieu BG liquide pendant une nuit à 28°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 5 min et les culots sont resuspendus à une DO égale à 0,2 dans 50 mL de milieu minimum additionné de glutamate 10 mM, de saccharose 10 mM et de Rouge Congo à une concentration finale de 1000 µg.mL⁻¹. Les bactéries sont cultivées à 28°C et, au temps voulu, environ 50 mL de culture sont prélevés, en ajustant le volume pour avoir les mêmes quantités de bactéries pour toutes les souches. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min à température ambiante, les surnageants et les culots sont séparés. Les surnageants sont filtrés (0,22 µm) et aliquotés par 1 mL dans des tubes de 2 mL. Un microlitre de TCA 25 % froid est ajouté et le tout est incubé pendant la nuit dans la glace à 4°C. Les culots sont eux resuspendus dans 2 mL d'eau milliQ et aliquotés par 150 µL dans des tubes de 1,5 mL. Cinquantes microlitres de Laemmli 4X sont ajoutés et le tout est incubé pendant 5 min à 85°C avant d'être conservé à -20°C. Les aliquots de surnageants sont ensuite centrifugés 15 min à 13000 rpm à 4°C puis les culots sont lavés 2 fois avec 1 mL d'acétone 90% froid. Les culots sont mis à sécher 10 min à température ambiante et conservés à -20°C. Les culots sont finalement resuspendus

dans 36 μL de Laemmli 1X et 4 μL de Tris 2M pH 7,5. Les quantités de protéines présentes dans les surnageants et les culots des cultures initiales en milieu minimum sont analysées par Western-Blot.

II.2. Test de pouvoir pathogène et analyses statistiques

Les tests de pouvoir pathogène ont tous été réalisés *via* une inoculation par arrosage avec une suspension bactérienne de 10^8 bactéries/mL. Pour *A. thaliana*, 16 plantes ont été inoculées comme décrit par Deslandes *et al.* (1998) mais sans couper les racines. Pour la Tomate, l'Aubergine et le Pétunia, respectivement 24, 12 et 16 plantes ont été inoculées comme décrit par Gonzalez *et al.* (2011). Les tests sur *M. truncatula* ont été effectués *in vitro* selon Vaillau *et al.* (2007). Pour l'ensemble des plantes, les symptômes ont été suivis régulièrement et notés selon l'échelle macroscopique suivante : 0 pour une absence de symptômes ; 1, 2 et 3 pour respectivement 25 %, 50 % et 75 % de feuilles flétries ; et 4 pour un flétrissement total de la plante. Les données ont ensuite été transformées pour obtenir une notation binaire : 0 pour une note inférieure ou égale à 2, et 1 pour une note supérieure à 2. Le développement des symptômes de maladie est représenté par des courbes de survie selon l'analyse de Kaplan-Meier. Les cinétiques de flétrissement des souches ont été comparées deux à deux à l'aide du test non-paramétrique de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Une p-value inférieure à 0,01 a été considérée comme significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism version 5.0 (GraphPad Software).

II.3. Quantification des bactéries *in planta*

Les parties aériennes de trois lots de 3 plantes d'*A. thaliana* par souche inoculée ont été coupées à leur base, lavées 1 min dans de l'éthanol 70 % puis 3 fois 1 min dans de l'eau stérile. Après avoir été séché et pesé, le matériel végétal a été broyé dans un mortier contenant un peu de sable de Fontainebleau. Huit millilitres d'eau stérile ont été ajoutés et, après homogénéisation, 1 mL a été prélevé. Plusieurs dilutions ont été effectuées et étalées sur boîtes de Pétri sur milieu solide à l'aide d'un étaleur automatique Spiral (Interscience) avant incubation deux jours à

28°C. Le nombre de colonies a été déterminé et rapporté à la masse de matière fraîche végétale selon le protocole fourni (Interscience). Un test statistique ANOVA et un test de Tukey ont été effectués pour comparer les tailles des populations bactériennes moyennes.

II.4. Tests d'élicitation de la HR sur Tabac

Les tests d'élicitation de la HR ont été réalisés sur des plants de Tabac âgés de 4 semaines. Chaque souche bactérienne a été inoculée par infiltration foliaire à l'aide d'une seringue sans aiguille, à une densité cellulaire de 10^8 bactéries/mL. Les Tabacs inoculés ont été incubés en chambre de culture (28°C ; 12h lumière/12h obscurité) et le développement des symptômes de HR a été suivi 24h et 48h après infiltration.

II.5. GST pull-down

Les souches bactériennes portant les plasmides d'intérêt sont cultivées dans 200 mL de milieu LB jusqu'à une absorbance à 600 nm égale à 0,6. L'expression de la GST ou des protéines de fusion GST et 6His est induite par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG. Après 4h de culture à 28°C, les cultures sont divisées en volumes de 50 mL et sont centrifugées à 5000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Une électrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie est réalisée avec des aliquots de culture prélevés avant centrifugation afin de vérifier le niveau de production et la solubilité des protéines recombinantes. Les culots sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Chaque culot est ensuite resuspendu dans 1 mL de tampon PBS (140 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄ ; 1,8 mM KH₂PO₄ ; pH 7,4) puis lysé par sonication 10 fois pendant 15 sec à 4°C, à intervalles d'une minute (Analog Sonifier Cell Disruptor, Branson). La solution obtenue est centrifugée à 16000 g pendant 20 min à 4°C et le surnageant est filtré (0,22 µm). Environ 400 µL de surnageant contenant la protéine GST ou la protéine de fusion GST sont incubés avec 50 µL de résine de Gluthatione-Sépharose (Amersham, Biosciences) sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante. La résine est ensuite lavée 3 fois avec 800 µL de PBS additionné de Triton X-100 0,1 %. Pour chaque lavage, une centrifugation est réalisée à 1000 g pendant 5 min à 4°C. La résine lavée est incubée

avec 400 μ L de surnageant contenant la protéine de fusion 6His sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante. La résine est lavée 4 fois comme précédemment. Cent microlitres de tampon d'éluion (10 mM GSH ; 50 mM Tris-HCl pH 8) préparé extemporanément sont ajoutés à la résine lavée. Le tout est incubé sous agitation à 700 rpm pendant 15 min à température ambiante avant que les protéines éluées soient récupérées par centrifugation à 1000 g pendant 5 min. Cette dernière étape d'éluion est répétée 2 fois.

II.6. Western-Blot

Les Western-Blot sont réalisés selon les protocoles classiques (Ausubel *et al.*, 1989). Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les anticorps sont utilisés aux dilutions suivantes : α -GALA7 à 1/10000, α -AvrA à 1/3000, α -PopP1 à 1/20000, α -PopP2 à 1/10000, α -PopA à 1/15000, α -HrpY à 1/15000, α -GST à 1/40000, α -6His à 1/10000, α -HA (Roche Applied Science) à 1/5000 et α -lapin conjugué à la peroxydase de raifort « HRP » (Santa-Cruz) à 1/50000.

II.7. Double-hybride chez la levure

Les tests d'interaction en double-hybride chez la levure sont réalisés en fusionnant les protéines d'intérêt aux domaines de liaison à l'ADN (BD pour Binding Domain) et d'activation (AD pour Activation Domain) de la protéine Gal4, par clonage dans les plasmides pGBG et pGAD, dérivés compatibles avec la technologie Gateway des plasmides pGBKT7 et pGADT7 du kit Matchmaker3 (DB Bioscience). La souche de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (BD Bioscience) est co-transformée par les vecteurs pGBG et pGAD contenant les protéines d'intérêt. Les double transformants sont ensuite repiqués par des dépôts de dilution sériée d'un facteur 10 sur un milieu sélectif témoin de la double transformation (sans leucine ni tryptophane) et sur un milieu plus sélectif témoin de l'interaction entre les deux protéines de fusion (milieu sans leucine ni tryptophane ni histidine). Lorsque nécessaire, une concentration déterminée de 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) est ajoutée au milieu témoin de l'interaction pour supprimer l'autoactivation par une

protéine de fusion seule. Chaque test d'interaction est effectué sur 4 colonies indépendantes issues de la double transformation.

II.8. Bioinformatique

Les alignements de séquences ont été réalisés grâce au programme MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Les pourcentages d'identité ou de similarité entre protéines ont été ensuite calculés à l'aide du programme SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

DISCUSSION

I. Caractérisation des CT3s putatives HpaB, HpaD et FliT-like

Lors du premier volet de ces travaux, nous nous sommes attachés à étudier le rôle des CT3s putatives HpaB, HpaD et FliT-like. Alors que ces trois protéines partagent une des caractéristiques typiques des CT3s (Thomas *et al.*, 2012), à savoir un poids moléculaire inférieur à 20 kDa, seules HpaB et HpaD présentent un caractère acide, qui se traduit par un point isoélectrique compris entre 4 et 5. La protéine FliT-like fait en effet figure d'exception avec un point isoélectrique égal à 9,2 donc nettement plus élevé. Un élément important et partagé par ces trois protéines est leur régulation transcriptionnelle dépendante de la protéine HrpB (Cunnac *et al.*, 2004b ; Occhialini *et al.*, 2005), facteur de régulation clé du SST3, suggérant des fonctions liées au SST3. Enfin, ces dernières n'ayant pas été détectées chez la souche RS1000 de *R. solanacearum* comme étant transloquées dans le cytoplasme des cellules végétales *via* le SST3 (Mukaihara *et al.*, 2010), un rôle d'ET3 semble être exclu. Parmi les nombreuses CT3s identifiées à ce jour chez les différentes bactéries pathogènes de plantes ou d'animaux, seule la protéine Spa15 chez *Shigella* spp. semble transiter à travers le SST3 (Faherty & Maurelli, 2009). La localisation des CT3s apparaît ainsi très majoritairement restreinte à la cellule bactérienne, à l'instar des protéines HpaB, HpaD et FliT-like.

I.1. HpaB, une CT3 de première importance

Afin de tester l'hypothèse d'un rôle de CT3s pour HpaB et HpaD, nous avons dans un premier temps cherché à identifier des interactions protéine-protéine avec des ET3s, en double-hybride chez la levure. Les résultats révèlent que HpaB est capable d'interagir avec au moins dix ET3s. Ces ET3s ne présentent pas de relations apparentes, certains d'entre eux appartenant à différentes familles d'ET3s, telles que les familles GALA et YopJ. La capacité de HpaB à interagir avec de nombreux ET3s suggère que cette protéine appartienne à la classe IB des CT3s. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le gène *hpaB* est localisé au sein du cluster *hrp*, les gènes codant pour les CT3s de classe IB étant classiquement situés au niveau des îlots de pathogénie codant pour les constituants des SST3s. Cependant, la dichotomie

classiquement admise entre CT3s de classe IA et IB, en particulier basée sur le nombre d'ET3s dépendants de la chaperonne, n'est en réalité pas aussi claire. En effet, il existe plusieurs cas de protéines qui présentent les caractéristiques emblématiques des CT3s de classe IA mais pour lesquelles des interactions ont été révélées avec plusieurs ET3s. Ainsi, le gène codant pour la protéine CesT chez *E. coli* jouxte celui codant pour l'ET3 Tir, dont la sécrétion est dépendante de CesT, ce qui a abouti en premier lieu à catégoriser CesT comme CT3 de classe IA. Or il a été démontré que CesT interagit non seulement avec Tir, mais également avec une dizaine d'autres ET3s répartis dans le génome bactérien (Abe *et al.*, 1999 ; Elliott *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 2005).

Nous avons pu mettre en évidence que la protéine HpaB est requise pour éliciter les symptômes de la HR sur Tabac, suggérant que les ET3s AvrA et PopP1, collectivement responsables de la mise en place de la HR suite à leur reconnaissance *in planta*, ne sont plus transloqués par un mutant *hpaB*. D'autre part, l'inoculation de ce mutant sur différentes plantes hôtes a révélé que la protéine HpaB est strictement nécessaire à la virulence de *R. solanacearum* sur l'ensemble des plantes hôtes testées, à savoir *A. thaliana*, *M. truncatula*, l'Aubergine et la Tomate. HpaB joue donc un rôle capital pour le pouvoir pathogène de la bactérie. Pour exercer un tel rôle sur la virulence de la bactérie, une première hypothèse peut être émise suggérant que HpaB contrôle la sécrétion d'un très grand nombre d'ET3s. Dans ce cas, quelle que soit l'espèce hôte, il est envisageable qu'un nombre suffisamment important d'ET3s nécessaires à l'établissement de la maladie ne soient plus transloqués. Sur *M. truncatula*, l'absence de sécrétion du seul ET3 GALA7 pourrait suffire à expliquer la perte de virulence du mutant *hpaB*, GALA7 étant strictement requis pour la virulence de *R. solanacearum* sur cette plante hôte (Angot *et al.*, 2006). Une deuxième hypothèse pourrait faire intervenir HpaB dans la mise en place du SST3 lui-même, ou *a minima* du pilus ou du translocon, ne permettant ainsi pas la translocation des ET3s dans la cellule eucaryote. Les études menées sur la souche RS1000 de *R. solanacearum* jouent en faveur de la première hypothèse. En effet, Mukaihara *et al.* (2010) ont démontré que HpaB est requis pour l'export *via* le SST3 de 66 ET3s mais pas pour l'export des harpines et des protéines du translocon. D'autre part, toujours chez la souche RS1000, l'observation en microscopie électronique de pili Hrp extracellulaires similaires à ceux produits par la

souche sauvage suggère que HpaB ne soit pas impliqué dans l'assemblage du SST3 (Mukaihara *et al.*, 2004). D'autres travaux, réalisés sur l'homologue de HpaB chez la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *vesicatoria*, que l'on nommera HpaB_{Xcv}, concordent avec les données obtenues chez *R. solanacearum*. En effet, la sécrétion des protéines du pilus et du translocon n'est pas affectée chez un mutant *hpaB*_{Xcv} (Büttner *et al.*, 2006 ; Lorenz *et al.*, 2008), permettant notamment la translocation d'au moins quelques ET3s, dont AvrBs3 et XopC (Büttner *et al.*, 2006).

Bien que certains ET3s paraissent toujours transloqués par un mutant *hpaB*_{Xcv}, les ET3s sont globalement peu ou pas sécrétés *in vitro*. Il est probable que la translocation de nombreux ET3s soit par conséquent affectée, sachant que ce mutant n'est pas capable d'induire l'apparition des symptômes de maladie sur plante hôte (Büttner *et al.*, 2004). Ce phénotype est également retrouvé pour un mutant de l'homologue de HpaB_{Xcv} chez *X. oryzae*, qui exhibe une translocation affectée pour 15 des 16 ET3s identifiés (Cho *et al.*, 2008 ; Furutani *et al.*, 2009). Dans l'ensemble, les données concernant HpaB chez *Xanthomonas* spp. concordent avec les résultats obtenus chez *R. solanacearum*. HpaB paraît jouer un rôle primordial dans le pouvoir pathogène de ces bactéries, en promouvant la sécrétion/translocation d'un large répertoire d'ET3s. Une différence réside dans le fait que nous n'ayons pas révélé d'interaction entre monomères de HpaB, contrairement à ce qui a été démontré pour HpaB_{Xcv} ainsi que pour l'ensemble des CT3s de classe IB chez les différentes bactéries pathogènes de plantes ou d'animaux (pour revue, voir Büttner, 2012). Il est cependant possible que l'interaction ne puisse simplement pas avoir lieu dans le cadre du système hétérologue qu'est le double-hybride chez la levure.

Chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, un modèle a été proposé pour la fonction de la CT3 HpaB_{Xcv}, intégrant d'autres protagonistes impliqués dans le contrôle de la sécrétion par le SST3 (voir aussi la mini-revue sur les CT3s en introduction). Dans un premier temps, il semblerait que la protéine HpaA interagisse avec HpaB, permettant la sécrétion des substrats précoces (protéines du pilus et du translocon). En absence de HpaA, HpaB inhibe la sécrétion de ces substrats précoces, probablement en obstruant leur accès à la base du SST3. Dans un second temps, une fois le pilus et le translocon assemblés, HpaA serait relargué à l'extérieur de la cellule bactérienne en transitant *via* le SST3. La CT3 HpaB serait dès lors libre d'interagir avec les ET3s et de promouvoir leur sécrétion/translocation. Compte tenu de la forte homologie

entre HpaB_{xcv} et HpaB chez *R. solanacearum* (49,7 % d'identité), et de la cohérence des résultats obtenus pour les deux espèces bactériennes, il est tout à fait envisageable que HpaB joue un rôle similaire chez *R. solanacearum*. Cependant, aucun homologue de HpaA n'a été identifié chez cette bactérie.

I.2. HpaD et FliT-like, de potentielles CT3s spécifiques à *R. solanacearum*

Les protéines HpaD et FliT-like présentent la capacité à interagir avec elles-mêmes, ce qui est une propriété largement partagée par les CT3s des différentes classes. Comme pour HpaB, des interactions avec des ET3s ont également été mises en évidence avec la CT3 putative HpaD. Cette protéine paraît ainsi pouvoir interagir physiquement avec au moins neuf ET3s. A l'instar de HpaB, HpaD interagit avec des ET3s sans relations apparentes, dont certains sont membres des familles d'ET3s GALA et YopJ. Ces interactions suggèrent un rôle de CT3 de classe IB pour HpaD, en accord avec la localisation du gène *hpaD* au niveau du cluster de gènes *hrp* codant pour le SST3. De manière intéressante, sept ET3s interagissent à la fois avec HpaD et HpaB (Figure 38), laissant supposer que ces deux protéines puissent agir de concert pour contrôler la sécrétion d'un même groupe d'ET3s. Cependant, si tel est effectivement le cas, il semble que cela n'implique pas d'interaction directe entre HpaD et HpaB, comme le révèlent les tests en double-hybride chez la levure. La littérature fait état d'autres cas de substrats communs à deux CT3s, bien que ceux-ci soient exceptionnels. Ces exemples comprennent l'interaction des deux CT3s SseA et SsaE avec la protéine du translocon SseB chez *Salmonella* spp. (Zurawsky & Stein, 2004 ; Miki *et al.*, 2009) et l'interaction des deux CT3s CesD et CesD2 avec la protéine du translocon EspD chez *E. coli* (Wainwright & Kaper, 1998 ; Neves *et al.*, 2003). HpaB et HpaD représenteraient donc le premier cas de CT3s interagissant avec des ET3s communs. Il reste cependant à démontrer que ces deux protéines sont effectivement nécessaires à la sécrétion des ET3s en question.

L'aptitude de FliT-like à interagir avec des ET3s n'a pas été testée. En revanche, il apparaît que FliT-like et HpaB puissent interagir entre elles. Les CT3s exercent majoritairement leurs fonctions sous forme d'homodimères, mais certains exemples de CT3s associées en hétérodimères ont déjà été rapportés. Ainsi, chez

Yersinia spp., les CT3s YscE et YscG, associées en hétérodimères, interagissent avec la sous-unité YscF de l'aiguille et promeuvent sa sécrétion (Allaoui *et al.*, 1995 ; Sun *et al.*, 2008). Un rôle identique a été identifié pour les homologues de ces CT3s chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (Quinaud *et al.*, 2005 ; Sal-Man *et al.*, 2013). Deux autres cas de CT3s fonctionnant sous forme hétérodimérique ont également été caractérisés chez *Yersinia* spp. (SycD-YscY et SycN-YscB) (Bröms *et al.*, 2005 ; Schubot *et al.*, 2005). La capacité de HpaD à interagir de manière homomérique peut sembler contradictoire avec un potentiel rôle sous forme d'hétérodimères avec FliT-like, il a cependant été montré que les CT3s fonctionnant sous forme d'hétérodimères peuvent s'associer en homodimères en absence de l'autre partenaire (Imada *et al.*, 2010).

L'inoculation des mutants *hpaD* et *FliT-like* sur différentes plantes hôtes a révélé que ces deux protéines peuvent jouer un rôle dans le pouvoir pathogène, bien que moindre comparé à celui de la protéine HpaB. Les résultats suggèrent que HpaD et FliT-like sont impliqués dans la pathogénie de *R. solanacearum* sur *A. thaliana*. D'une manière moins certaine, HpaD pourrait l'être également sur *M. truncatula*. Il s'avère donc que l'importance de HpaD et FliT-like est dépendante de l'espèce hôte. Il est possible que ce comportement reflète l'importance, elle aussi hôte-spécifique, des ET3s potentiellement contrôlés par HpaD et FliT-like, en accord avec un hypothétique rôle de ces protéines en tant que CT3s. Ces résultats suggèrent par ailleurs que FliT-like, malgré son interaction avec HpaB, n'est pas aussi important pour le contrôle de la sécrétion des ET3s que ne l'est HpaB. Cette observation est confirmée par le fait que FliT-like élicite des symptômes de HR sur Tabac de manière comparable à la souche sauvage, indiquant que FliT-like, contrairement à HpaB, n'est pas requis pour la translocation *in planta* des ET3s AvrA et PopP1. La protéine HpaD n'apparaît pas non plus nécessaire à la translocation de ces ET3s. Afin de valider l'ensemble de ces données, il sera nécessaire de tester la complémentation phénotypique de ces différentes mutations *via* l'intégration dans les mutants des versions sauvages correspondantes.

II. Caractérisation de la protéine de type T3S4 HpaP

Le deuxième volet des travaux a été consacré à la caractérisation fonctionnelle de la protéine HpaP, membre putatif de la famille des protéines de type T3S4. La majeure partie des résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication et sont discutés dans le cadre de celle-ci. La discussion qui suit est ainsi essentiellement centrée sur les résultats complémentaires à l'article.

II.1. Rôle de HpaP dans le contrôle de la sécrétion de type III

Les résultats publiés dans l'article mettent en évidence un rôle de la protéine HpaP dans le contrôle du processus de sécrétion de type III. La protéine HpaP semble impliquée dans le contrôle de l'export de substrats précoces, telle la sous-unité HrpY du pilus, comme dans celui des substrats tardifs que sont les ET3s. De plus, HpaP paraît exercer un effet positif ou négatif sur la sécrétion des ET3s, selon la protéine considérée. Nos résultats révèlent également que HpaP n'est probablement pas impliqué dans la sécrétion de la protéine PopA, caractérisée comme une probable harpine (Arlat *et al.*, 1994 ; Racapé *et al.*, 2005). En revanche, HpaP semble exercer un effet inhibiteur sur l'accumulation de PopA dans la bactérie, suggérant une régulation de la synthèse ou de la stabilité de PopA par HpaP. Un effet de modulation du niveau d'accumulation de substrats du SST3 dans le cytoplasme bactérien n'a jamais été décrit pour la protéine T3S4 HpaC chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Büttner *et al.*, 2006 ; Lorenz & Büttner, 2011). Il est intéressant de noter que HpaP semble exercer ce rôle également vis-à-vis de la sous-unité HrpY du pilus, mais pas vis-à-vis des différents ET3s testés. Il est ainsi tentant d'émettre l'hypothèse que la protéine HpaP puisse être impliquée dans un processus de régulation négative de substrats du SST3 autres que les ET3s. Si tel est le cas, la nature d'une telle régulation reste une question ouverte. Cependant, il existe plusieurs exemples de protéines impliquées dans le contrôle de la sécrétion de type III, comme des CT3s, jouant également un rôle de régulateurs transcriptionnels de certains substrats du SST3. Ainsi, chez *S. flexneri*, la CT3 Spa15, outre le fait de promouvoir la sécrétion d'ET3s, agit comme un co-anti-activateur participant à l'inhibition de l'expression de gènes codant pour des ET3s (Parsot *et al.*, 2005).

Malgré l'hypothèse d'un contrôle de HpaP sur la sécrétion de nombreux ET3s pour expliquer son importance pour le pouvoir pathogène, aucune interaction avec d'autres ET3s que PopP1 n'a pu être mise en évidence. Il ne peut pas être écarté que la quinzaine d'ET3s testés n'interagisse réellement pas avec HpaP. L'interaction de HpaP avec de nombreux ET3s resterait néanmoins tout à fait possible, au vu des 74 ET3s que renferme la souche GMI1000 (Poueymiro & Genin, 2009). Il est cependant également envisageable que la fonction de HpaP dans le contrôle de la sécrétion d'ET3s n'implique pas d'interactions directes avec ces ET3s, ou qu'un autre partenaire protéique soit nécessaire à ces interactions. Dans ce cas, le fait qu'une interaction ait été observée entre HpaP et PopP1 pourrait être le reflet d'une fonction particulière de cet ET3. Des protéines transloquées et donc caractérisées comme ET3s ont déjà été identifiées comme jouant également un rôle particulier dans le contrôle de la sécrétion de type III : chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, HpaA est une protéine transloquée et nécessaire à la translocation de nombreux substrats du SST3 (Huguet *et al.*, 1998 ; Lorenz *et al.*, 2008) ; chez *P. syringae* et *E. amylovora*, la protéine HrpJ est un facteur de pathogénicité transloqué qui est impliqué dans la hiérarchie de sécrétion (Fu *et al.*, 2006 ; Nissinen *et al.*, 2007 ; Crabill *et al.*, 2012).

Outre une interaction HpaP-PopP1, nous avons mis en exergue une interaction entre HpaP et la CT3 putative HpaD. Ce résultat suggère l'existence de complexes protéiques HpaP-CT3s, qui pourraient intervenir dans le contrôle de la sécrétion des ET3s. Cette hypothèse coïncide notamment avec le fait que PopP1 interagisse avec HpaP et HpaD. En revanche, les nombreux autres ET3s interagissant avec HpaD ne semblent pas interagir avec HpaP. Une telle interaction entre protéine à domaine T3S4 et CT3 a précédemment été identifiée chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, entre HpaC et HpaB_{Xcv} (Büttner *et al.*, 2006). La sécrétion d'un certain groupe d'ET3s semble par ailleurs contrôlée à la fois par HpaC et HpaB_{Xcv}. Nos travaux n'ont pas révélé d'interaction entre les homologues respectifs HpaP et HpaB chez *R. solanacearum*, mais cette différence pourrait résider dans l'utilisation de deux techniques de test d'interaction différentes.

II.2. HpaP est un facteur de spécificité d'hôte

Le mutant *hpaP* exhibe des comportements différents en fonction des plantes hôtes : une perte de virulence sur *M. truncatula*, une diminution du pouvoir pathogène sur *A. thaliana* et la Tomate, et enfin un pouvoir pathogène identique à la souche sauvage sur l'Aubergine. En accord avec la modulation de la sécrétion des ET3s AvrA et PopP1 que nous avons révélée, l'importance hôte-dépendante de HpaP pour le pouvoir pathogène soutient un rôle de cette protéine dans le contrôle de la sécrétion d'ET3s, l'importance de chacun des ET3s étant variable en fonction de l'espèce hôte. A ce jour, aucun autre phénotype hôte-dépendant n'a été décrit pour des mutants de protéines T3S4. Ceci peut s'expliquer en partie par l'utilisation récurrente d'une seule espèce hôte pour les tests de virulence avec les autres bactéries étudiées, dont les spectres d'hôtes sont généralement beaucoup plus réduits que dans le cas de *R. solanacearum*.

L'impact de la mutation de *hpaP* sur les étapes du processus infectieux sur *M. truncatula* a été analysé par microscopie à l'aide de souches exprimant le gène rapporteur codant pour la protéine GUS (β -glucuronidase ; M. Prévot, données non publiées). Les résultats suggèrent que le mutant *hpaP* soit capable de pénétrer au sein des tissus racinaires, bien que sa progression paraisse limitée aux cellules de l'épiderme. Ce qui a été confirmé par la quantification des bactéries *in planta*, révélant que le mutant *hpaP* se multiplie faiblement comparé à la souche sauvage, et de manière similaire à un mutant dont le SST3 est déficient. Si l'on considère que le caractère non virulent du mutant *hpaP* sur *M. truncatula* est lié à une perturbation de la sécrétion d'ET3s, cette perte de virulence peut s'expliquer de manière simple par deux hypothèses : i) la mutation de *hpaP* perturbe la sécrétion d'un ou plusieurs ET3s agissant normalement comme facteur(s) de virulence, ou ii) la perturbation de la sécrétion d'ET3s par la mutation de *hpaP* aboutit à la reconnaissance par la plante d'un ou plusieurs ET3s agissant dès lors comme facteur(s) d'avirulence. Afin de tester ces deux hypothèses, des expériences de co-inoculation ont été réalisées, consistant à inoculer simultanément la souche sauvage et le mutant *hpaP* sur *M. truncatula*. Les résultats ont mis en exergue un développement des symptômes de maladie très faible suite à une telle co-inoculation, comparé à l'inoculation de la souche sauvage seule (F. Vailleau, données non publiées). Cet effet dominant

négatif du mutant *hpaP* sur la souche sauvage soutient la deuxième hypothèse, c'est-à-dire qu'un ou plusieurs facteur(s) d'avirulence serai(en)t sécrété(s) par le mutant *hpaP* et éliciterai(en)t les réponses de défense de la plante. Notons que cette seconde hypothèse n'implique pas de rejeter la première, les deux effets « absence de facteur(s) de virulence » et « présence de facteur(s) d'avirulence » pouvant parfaitement être couplés.

Afin de tenter d'identifier le facteur d'avirulence en question, et dans l'hypothèse où il est unique, des tests de pouvoir pathogène sur *M. truncatula* ont été effectués en inoculant des double mutants *hpaP/ET3*, l'objectif étant de retrouver un pouvoir pathogène similaire à celui de la souche sauvage. Ces tests ont été poursuivis avec ma participation ces dernières années et la caractérisation d'une protéine inconnue, qui s'est révélée être un bon candidat, a été entamée.

II.3. HpaP est un élément important dans les étapes tardives de l'infection

Le mutant *hpaP* n'est pas affecté dans sa capacité à se multiplier dans *A. thaliana*, alors qu'il est fortement affecté dans son pouvoir pathogène sur cette plante hôte. L'aptitude de ce mutant à coloniser la plante paraît donc différente sur *A. thaliana* et sur *M. truncatula*, mais ceci peut s'expliquer aisément par la perte de virulence complète que présente le mutant *hpaP* sur *M. truncatula*. De manière surprenante, il semble donc que HpaP soit nécessaire, en tout cas sur *A. thaliana*, à l'établissement des symptômes de maladie, mais pas à la pénétration dans les racines ni à la colonisation massive du xylème. A l'inverse, chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, un mutant *hpaC* se multiplie moins que la souche sauvage dans des feuilles de Poivron (Lorenz & Büttner, 2011). Une première hypothèse pour expliquer ce comportement du mutant *hpaP* pourrait proposer que l'absence de la protéine HpaP elle-même, et non les conséquences de son absence sur le SST3 et les ET3s, serait directement responsable de la diminution des symptômes. Le fait que HpaP ne semble ni sécrété ni transloqué tend cependant à rejeter cette hypothèse. Une deuxième hypothèse pourrait envisager un rôle du SST3 et des ET3s, dont la sécrétion est modulée par HpaP, dans l'apparition des symptômes. La fonction de certains ET3s serait donc directement liée aux symptômes, ce qui a été suggéré pour

les ET3s de la famille GALA chez *R. solanacearum*. En effet, un septuple mutant *gala1-7* est fortement affecté dans son pouvoir pathogène sur *A. thaliana* mais se multiplie *in planta* comme la souche sauvage (Angot *et al.*, 2006). De même, une observation similaire a été rapportée pour deux mutants d'ET3 chez *P. syringae* (Badel *et al.*, 2003 ; Lopez-Solanilla *et al.*, 2004). La façon dont certains ET3s pourraient être impliqués dans le développement des symptômes de maladie reste cependant inconnue. En tout état de cause, un rôle des ET3s dans les étapes tardives de l'infection est soutenu par une récente analyse du transcriptome de *R. solanacearum* au cours de l'infection. Celle-ci révèle que des gènes codant pour des constituants du SST3 et pour des ET3s sont fortement exprimés *in planta* lorsque la bactérie a atteint une densité cellulaire élevée dans les vaisseaux du xylème (Jacobs *et al.*, 2012). Des observations similaires ont également été obtenues par qRT-PCR (Monteiro *et al.*, 2012a).

Le flétrissement causé par *R. solanacearum* est directement lié à la production d'EPS en grande quantité dans le xylème. L'activation de l'expression des gènes codant pour les EPS dépend en partie du régulateur central PhcA, qui est contrôlé par un système dépendant de la densité cellulaire impliquant la production et la détection de la molécule signal 3-OH PAME (Flavier *et al.*, 1997 ; Genin & Denny, 2012). Au-delà d'une densité cellulaire de 10^7 bactéries.mL⁻¹, PhcA est activé et induit l'expression du gène codant pour le régulateur XpsR, qui active directement la transcription de l'opéron *eps* (Huang *et al.*, 1995). Cependant la synthèse des EPS est également sous le contrôle d'autres régulateurs, notamment des systèmes à deux composants VsrA/VsrD et VsrB/VsrC qui induisent respectivement l'expression du gène *xpsR* et de l'opéron *eps* (Schell *et al.*, 1994 ; Huang *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1998). Ces systèmes à deux composants répondent à des signaux métaboliques encore inconnus, mais il serait envisageable que certains ET3s soient responsables d'une modification de l'environnement métabolique de la bactérie *in planta*, aboutissant à la synthèse des EPS. Partant du principe que HpaP module la sécrétion de certains ET3s, cette hypothèse permettrait d'expliquer l'absence de symptômes élicités par le mutant *hpaP*, malgré une multiplication bactérienne *in planta* similaire à la souche sauvage.

CONCLUSION

Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés à la caractérisation fonctionnelle de plusieurs protéines potentiellement impliquées dans le contrôle du processus de sécrétion de type III. La dernière décade témoigne d'un nombre croissant d'études qui visent à comprendre les fonctions assumées par les différents acteurs du contrôle de la sécrétion des substrats du SST3. C'est particulièrement vrai pour les bactéries pathogènes d'animaux, pour lesquelles des modèles de régulation intégrant plusieurs protagonistes protéiques ont commencé à émerger. Les données sont cependant bien plus éparses concernant les bactéries phytopathogènes, et spécialement la bactérie modèle *R. solanacearum*.

Le premier volet a été consacré à l'étude de trois CT3s putatives : HpaB, HpaD et FliT-like. Nos travaux ont mis en évidence la capacité de HpaB à interagir avec de nombreux ET3s. En accord avec ces résultats, HpaB s'est révélé être une protéine centrale pour la virulence de *R. solanacearum* sur les différentes plantes hôtes testées, ainsi que pour l'élicitation des symptômes de HR sur Tabac. L'ensemble de ces données suggère que HpaB contrôle la sécrétion d'un large répertoire d'ET3s, caractéristique typique des CT3s de classe IB.

Les protéines HpaD et FliT-like paraissent également être impliquées, bien que dans une moindre mesure, dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*, et ce de manière hôte-spécifique. Ces deux protéines ont exhibé la capacité à interagir de façon homomérique, alors que FliT-like paraît également pouvoir interagir de manière hétéromérique avec HpaB.

Le deuxième volet des travaux a consisté à étudier le rôle de la protéine T3S4 putative HpaP dans le contrôle du processus de sécrétion de type III. Nos résultats indiquent que la protéine HpaP interagit avec elle-même et n'est ni sécrétée, ni transloquée dans la cellule végétale. La protéine HpaP paraît être fortement impliquée dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*, et de manière hôte-spécifique. Cette observation concorde avec un rôle dans la modulation de la sécrétion de substrats du SST3 que nous avons révélé pour HpaP, et qui pourrait faire intervenir des interactions entre HpaP et les substrats du SST3. Une implication de HpaP dans l'établissement d'une hiérarchie de sécrétion entre substrats précoces et tardifs est par ailleurs suggérée. Nos résultats soutiennent également un rôle important de HpaP, et donc potentiellement des ET3s, dans les étapes tardives de

l'infection. Finalement, une première caractérisation fonctionnelle du domaine T3S4 localisé dans la région C-terminale de HpaP a démontré la stricte nécessité de ce domaine pour la fonction de HpaP dans le contrôle de la sécrétion de l'ET3 PopP1 et dans le pouvoir pathogène de la bactérie. À l'inverse, les interactions protéine-protéine identifiées impliquant HpaP ne semblent pas dépendre du domaine T3S4.

Dans l'ensemble, ces travaux représentent une avancée dans l'identification des acteurs impliqués dans l'orchestration de la sécrétion de type III chez *R. solanacearum*, ainsi que dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu. En accord avec les données disponibles chez la souche RS1000 de *R. solanacearum* et chez la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *vesicatoria*, il est plus que probable que la protéine HpaB agisse comme une CT3 de classe IB. Il est en revanche encore trop tôt pour affirmer que les protéines HpaD et FliT-like jouent également un rôle de CT3, en particulier pour FliT-like pour laquelle l'identification de partenaires protéiques parmi les ET3s n'a pas été entreprise. Il est notable que les protéines HpaD et FliT-like soient conservées chez l'ensemble des souches de *R. solanacearum*, *R. syzygii* et BDB séquencées, suggérant ainsi un rôle conservé au sein du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Quoiqu'il en soit, il sera nécessaire de valider les interactions identifiées par une autre technique que le double-hybride chez la levure. En ce sens, des techniques de purification par affinité peuvent être envisagées. Il serait particulièrement intéressant d'utiliser ces approches en conditions d'interactions natives, c'est-à-dire dans la cellule de *R. solanacearum*, et de les coupler à une analyse par spectrométrie de masse, afin d'identifier les interactions protéiques de manière plus exhaustive. Une telle approche revêt également l'intérêt de pouvoir identifier des complexes protéiques mettant en jeu plus de deux partenaires. La caractérisation de HpaD et FliT-like comme CT3 exigera d'autre part de démontrer le contrôle de ces protéines dans la modulation de la sécrétion de substrats du SST3. Dans cette optique, l'analyse de surnageants de culture par spectrométrie de masse pourrait également apporter une vision globale, en comparant les sécrétomes de la souche sauvage et des différents mutants d'intérêt.

Un rôle de la protéine HpaP est fortement suggéré dans la modulation de la sécrétion de substrats du SST3, incluant la sous-unité du pilus et des ET3s. Les approches évoquées précédemment seront de même utiles afin de déterminer de

manière plus exhaustive quelles sont les protéines qui interagissent avec HpaP et dont la sécrétion est dépendante de cette protéine. Pour l'instant, aucune donnée n'indique clairement qu'il y ait un lien entre l'interaction d'une protéine avec HpaP et le contrôle de sa sécrétion par HpaP. Bien que HpaP soit vraisemblablement impliqué dans le contrôle de la sécrétion, il n'est cependant pas certain que cette protéine exerce une fonction d'orchestration de la hiérarchie de sécrétion entre substrats précoces (la piline), intermédiaires (les protéines du translocon) et tardifs (les ET3s). Cette question devra être adressée clairement dans les travaux futurs.

Les données accumulées ces dix dernières années à l'égard de protéines de type T3S4 chez les bactéries modèles pathogènes d'animaux ont significativement amélioré la compréhension des fonctions endossées par cette famille de protéines. Il ressort un rôle de la protéine YscP chez *Yersinia* spp. et des homologues chez *Salmonella* spp. et *Shigella* spp. dans le contrôle de la longueur de l'aiguille du SST3. Il est intéressant de noter une dichotomie marquée sur ce point entre les bactéries pathogènes d'animaux et les bactéries phytopathogènes, pour lesquelles les pili de type III arborent des tailles beaucoup plus variables. L'hypothèse principale pour expliquer cette différence suggère que les bactéries phytopathogènes doivent s'adapter à des épaisseurs variables des parois cellulaires des différentes plantes hôtes.

Il apparaît également que les protéines de type T3S4 occupent chez les bactéries pathogènes un rôle dans la modulation de la sécrétion de divers substrats du SST3, une fonction dans la mise en place d'une hiérarchie de sécrétion ayant parfois été mise en évidence. Cependant, une dichotomie entre agents pathogènes d'animaux et pathogènes de plantes n'apparaît dans ce cas pas du tout évidente. En effet, les travaux réalisés sur les trois espèces modèles les plus étudiées parmi les bactéries pathogènes d'animaux ont abouti à l'émergence d'autant de modèles pour expliquer les mécanismes de contrôle de la sécrétion par les protéines T3S4. Les modèles de la règle moléculaire, du mètre ruban et le modèle basé sur l'assemblage de la tige interne ont ainsi été proposés dans le cadre d'études sur *Yersinia* spp., *Shigella* spp. et *Salmonella* spp. De la même manière, des différences notables sont à signaler concernant le rôle des protéines de type T3S4 dans la modulation de la sécrétion de type III chez les bactéries phytopathogènes. Par exemple, chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, l'absence de la protéine HpaC n'a aucun effet sur la

sécrétion de la piline, alors que chez *P. syringae* l'absence de la protéine T3S4 HrpP affecte négativement la sécrétion de la piline. De manière intéressante, le rôle de HpaP chez *R. solanacearum* se révèle être encore différent, la piline HrpY étant sur-sécrétée par un mutant *hpaP*. Un autre point de divergence concerne la capacité des protéines de type T3S4 à transiter par le SST3 : ces protéines ne sont pas des substrats du SST3 chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* et *R. solanacearum* alors que l'homologue chez *P. syringae* est transloqué. Par ailleurs, chez les bactéries pathogènes d'animaux, les protéines de type T3S4 décrites sont toutes sécrétées.

Nos travaux soulignent ainsi les divergences fonctionnelles dont font preuve les protéines de type T3S4 chez les bactéries pathogènes, malgré une implication générale dans les mécanismes de contrôle de la sécrétion dépendante du SST3.

BIBLIOGRAPHIE

- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 10306-10311.
- Abby, S.S. and Rocha, E.P.C.** (2012) The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems. *Plos Genetics*, **8**.
- Abe, A., de Grado, M., Pfuetzner, R.A., Sanchez-SanMartin, C., DeVinney, R., Puente, J.L., Strynadka, N.C.J. and Finlay, B.B.** (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Molecular Microbiology*, **33**, 1162-1175.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 2531-2536.
- 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.
- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L.J. and Cornelis, G.R.** (2005) Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*, **56**, 54-67.
- Akeda, Y. and Galan, J.E.** (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, **437**, 911-915.
- 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 Journal*, **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. *Journal of Bacteriology*, **179**, 5655-5662.
- Allaoui, A., Schulte, R. and Cornelis, G.R.** (1995) Mutational analysis of the *yersinia-enterocolitica* virC operon - characterization of yscE, yscF, yscG, yscI, yscJ, yscK required for yop secretion and yscH encoding yopR. *Molecular Microbiology*, **18**, 343-355.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C. and Cornelis, G.R.** (1994) Yscu, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane-protein involved in Yop secretion. *Journal of Bacteriology*, **176**, 4534-4542.

- Anderson, D.M. and Schneewind, O.** (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular Microbiology*, **31**, 1139-1148.
- Andrade, A., Pardo, J.P., Espinosa, N., Perez-Hernandez, G. and Gonzalez-Pedrajo, B.** (2007) Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **468**, 121-127.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailliau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C. and Genin, S.** (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14620-14625.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S. and Peeters, N.** (2007) Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *Plos Pathogens*, **3**, 1-13.
- Antony, G., Zhou, J.H., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. and Yang, B.** (2010) Rice xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene Os-11N3. *Plant Cell*, **22**, 3864-3876.
- 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 Journal*, **13**, 543-553.
- Aslam, S.N., Newman, M.A., Erbs, G., Morrissey, K.L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T.T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Knight, M.R. and Cooper, R.M.** (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current Biology*, **18**, 1078-1083.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1989) Current protocols and molecular biology. New York, NY : Greene Publishing & Associates Wiley Interscience.
- 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.
- Ayers, M., Howell, P.L. and Burrows, L.L.** (2010) Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiology*, **5**, 1203-1218.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J. and Shirasu, K.** (2006) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *Embo Journal*, **25**, 2007-2016.
- Badel, J.L., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Shimizu, R., Collmer, A. and He, S.Y.** (2003) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 HopPtoM (CEL

- ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Molecular Microbiology*, **49**, 1239-1251.
- Bar, M. and Avni, A.** (2009) EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant Journal*, **59**, 600-611.
- Barker, D.F., Pfaff, T., Moreau, D., Groves, E., Ruffel, S., Lepetit, M., Whitehand, F., Maillet, F., Nair, R.M. and Journet, E.P.** (2007) Growing *M. truncatula* : choice of substrates and growth conditions. In *Medicago truncatula handbook* (Mathesius, U., Journet, E.P. and Sumner, L.W., eds).
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M. and Yoshioka, H.** (2013a) Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 271-277.
- Berger, C., Robin, G.P., Bonas, U. and Koebnik, R.** (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiology-Sgm*, **156**, 1963-1974.
- Bernoux, M., Ellis, J.G. and Dodds, P.N.** (2011) New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 512-518.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P., Marco, Y. and Deslandes, L.** (2008) RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell*, **20**, 2252-2264.
- Bhatt, G. and Denny, T.P.** (2004) *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *Journal of Bacteriology*, **186**, 7896-7904.
- Biemans-Oldehinkel, E., Sal-Man, N., Deng, W., Foster, L.J. and Finlay, B.B.** (2011) Quantitative Proteomic Analysis Reveals Formation of an EscL-EscQ-EscN Type III Complex in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **193**, 5514-5519.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A.** (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secretome. *Molecular Microbiology*, **39**, 652-663.
- 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.

- 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. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 425-434.
- Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J. and VanGijsegem, F.** (1996) Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, **20**, 681-683.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 379-406.
- Bonardi, V., Cherkis, K., Nishimura, M.T. and Dangl, J.L.** (2012) A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Current Opinion in Immunology*, **24**, 41-50.
- Boter, M., Amigues, B., Peart, J., Breuer, C., Kadota, Y., Casais, C., Moore, G., Kleanthous, C., Ochsenbein, F., Shirasu, K. and Guerois, R.** (2007) Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell*, **19**, 3791-3804.
- Botteaux, A., Sani, M., Kayath, C.A., Boekema, E.J. and Allaoui, A.** (2008) Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism. *Molecular Microbiology*, **70**, 1515-1528.
- Boucher, C.A., Barberis, P.A., Trigalet, A.P. and Demery, D.A.** (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum* - isolation of tn5-induced avirulent mutants. *Journal of General Microbiology*, **131**, 2449-2457.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L.B., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. and Sheen, J.** (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*, **464**, 418-U116.
- Boyd, A.P., Lambermont, I. and Cornelis, G.R.** (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: Role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4811-4821.
- Boyes, D.C., Nam, J. and Dangl, J.L.** (1998) The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15849-15854.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C. and Genin, S.** (1999) prhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade

- controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **31**, 237-251.
- Broms, J.E., Edqvist, P.J., Carlsson, K.E., Forsberg, A. and Francis, M.S.** (2005) Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. *Journal of Bacteriology*, **187**, 7738-7752.
- Broms, J.E., Edqvist, P.J., Forsberg, A. and Francis, M.S.** (2006) Tetratricopeptide repeats are essential for PcrH chaperone function in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Fems Microbiology Letters*, **256**, 57-66.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N.** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, **6**, 629-639.
- Brown, D.G. and Allen, C.** (2004) *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Molecular Microbiology*, **53**, 1641-1660.
- Brown, D.G., Swanson, J.K. and Allen, C.** (2007) Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 2777-2786.
- Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E. and Romantschuk, M.** (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. tomato across the host plant cell wall. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 394-404.
- Buchko, G.W., Niemann, G., Baker, E.S., Belov, M.E., Smith, R.D., Heffron, F., Adkins, J.N. and McDermott, J.E.** (2010) A multi-pronged search for a common structural motif in the secretion signal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III effector proteins. *Molecular Biosystems*, **6**, 2448-2458.
- Büttner, D.** (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**, 262-310.
- Büttner, D., Gurlebeck, D., Noel, L.D. and Bonas, U.** (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular Microbiology*, **54**, 755-768.
- Büttner, D. and He, S.Y.** (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, **150**, 1656-1664.
- Büttner, 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*. *Molecular Microbiology*, **59**, 513-527.
- Burghout, P., van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S.A., Tommassen, J. and Koster, M.** (2004) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, **186**, 4645-4654.
- 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.
- Cao, Y., Tian, B., Liu, Y., Cai, L., Wang, H., Lu, N., Wang, M., Shang, S., Luo, Z. and Shi, J.** (2013) Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance. *Genome Announcements*, **1**, e00125-13.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8336-8341.
- Castillo, J.A. and Greenberg, J.T.** (2007) Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 1225-1238.
- Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., Lefeuvre, P. and Prior, P.** (2012) Phylogeny and population structure of brown rot- and moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 2367-2375.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M.K., Yu, K.S., Sekine, K.T., Gao, Q.M., Selote, D., Hu, Y.L., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A. and Kachroo, P.** (2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, **43**, 421-+.
- 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. *Journal of Bacteriology*, **180**, 5211-5217.
- Chaturvedi, R., Venables, B., Petros, R.A., Nalam, V., Li, M.Y., Wang, X.M., Takemoto, L.J. and Shah, J.** (2012) An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *Plant Journal*, **71**, 161-172.
- 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-U199.

- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-U412.
- Cho, H.J., Park, Y.J., Noh, T.H., Kim, Y.T., Kim, J.G., Song, E.S., Lee, D.H. and Lee, B.M.** (2008) Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microbial Pathogenesis*, **44**, 473-483.
- Chung, E.H., da Cunha, L., Wu, A.J., Gao, Z.Y., 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.
- Cisz, M., Lee, P.-C. and Rietsch, A.** (2008) EXoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **190**, 2726-2738.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G. and Ausubel, F.M.** (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science*, **323**, 95-101.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K. and Bent, A.F.** (2000) The *Arabidopsis* *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 9323-9328.
- Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A. and Denny, T.P.** (1997) A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Journal of Bacteriology*, **179**, 3639-3648.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B.** (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science*, **308**, 548-550.
- Coenye, T. and Vandamme, P.** (2003) Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GM11000 genome. *Bmc Genomics*, **4**.
- Colburn-Clifford, J. and Allen, C.** (2010) A *cbb(3)*-type cytochrome c oxidase contributes to *Ralstonia solanacearum* R3bv2 growth in microaerobic environments and to bacterial wilt disease development in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 1042-1052.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X. and Bertolla, F.** (2008) Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *Fems Microbiology Ecology*, **66**, 14-24.

- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 497-505.
- Crabill, E., Karpisek, A. and Alfano, J.R.** (2012) The *Pseudomonas syringae* HrpJ protein controls the secretion of type III translocator proteins and has a virulence role inside plant cells. *Molecular Microbiology*, **85**, 225-238.
- Crago, A.M. and Koronakis, V.** (1998) *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Molecular Microbiology*, **30**, 47-56.
- Crepin, V.F., Prasanna, S., Shaw, R.K., Wilson, R.K., Creasey, E., Abe, C.M., Knutton, S., Frankel, G. and Matthews, S.** (2005) Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Molecular Microbiology*, **55**, 1658-1670.
- Cunnac, S., Boucher, C. and Genin, S.** (2004a) Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **186**, 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C. and Genin, S.** (2004b) 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.
- Dale, C., Young, S.A., Haydon, D.T. and Welburn, S.C.** (2001) The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 1883-1888.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H.** (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, **8**, 1793-1807.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826-833.
- Delaspre, F., Penalver, C.G.N., Saurel, O., Kiefer, P., Gras, E., Milon, A., Boucher, C., Genin, S. and Vorholt, J.A.** (2007) The *Ralstonia solanacearum* pathogenicity regulator HrpB induces 3-hydroxy-oxindole synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 15870-15875.
- Deng, W.Y., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. and Finlay, B.B.** (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, **101**, 3597-3602.

- Denny, T.P.** (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: *Plant-Associated Bacteria* (ed. SS Gnanamanickam), pp. 573–644. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 8024-8029.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 659-667.
- Deslandes, L. and Rivas, S.** (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science*, **17**, 644-655.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U. and Cornelis, G.R.** (2010) Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *Embo Journal*, **29**, 1928-1940.
- Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M. and Cornelis, G.R.** (2012) Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Molecular Microbiology*, **85**, 878-892.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I. and Hirt, H.** (2007) Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: Abusing MAPK defense signaling. *Science*, **318**, 453-456.
- Dong, X.N.** (2004) NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 547-552.
- Durrant, W.E. and Dong, X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185-209.
- Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Lloyd, S.A.** (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *Journal of Bacteriology*, **185**, 2259-2266.
- Elliott, S.J., Hutcheson, S.W., Dubois, M.S., Mellies, J.L., Wainwright, L.A., Batchelor, M., Frankel, G., Knutton, S. and Kaper, J.B.** (1999) Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **33**, 1176-1189.
- Elphinstone, J.G.** (2005) The current Bacterial Wilt situation: a global overview. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia Solanacearum Species Complex*

(Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds), pp. 9–28. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.

- Engelhardt, S., Lee, J., Gaebler, Y., Kemmerling, B., Haapalainen, M.-L., Li, C.-M., Wei, Z., Keller, H., Joosten, M., Taira, S. and Nuernberger, T.** (2009) Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *Plant Journal*, **57**, 706-717.
- Faherty, C.S. and Maurelli, A.T.** (2009) Spa15 of *Shigella flexneri* is secreted through the type III secretion system and prevents staurosporine-induced apoptosis. *Infection and Immunity*, **77**, 5281-5290.
- Fall, S., Mercier, A., Bertolla, F., Calteau, A., Gueguen, L., Perriere, G., Vogel, T.M. and Simonet, P.** (2007) Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a "spandrel" of dna repair mechanisms. *Plos One*, **2**.
- Fan, J. and Doerner, P.** (2012) Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: complex, yes; silver bullet, no. *Current Opinion in Plant Biology*, **15**, 400-406.
- Fauvart, M., Verstraeten, N., Dombrecht, B., Venmans, R., Beullens, S., Heusdens, C. and Michiels, J.** (2009) *Rhizobium etli* HrpW is a pectin-degrading enzyme and differs from phytopathogenic homologues in enzymically crucial tryptophan and glycine residues. *Microbiology-Sgm*, **155**, 3045-3054.
- Fegan, M. and Prior, P.** (2005) How complex is the 'Ralstonia solanacearum species complex'. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia Solanacearum Species Complex* (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds), pp. 449-461. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- 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 Journal*, **18**, 265-276.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M. and Dewdney, J.** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, **144**, 367-379.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A. and Denny, T.P.** (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **26**, 251-259.
- Flor, H.H.** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275-296.

- Flores-Cruz, Z. and Allen, C.** (2011) Necessity of oxyr for the hydrogen peroxide stress response and full virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 6426-6432.
- Fu, Z.Q. and Dong, X.N.** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 839-863.
- Fu, Z.Q., Guo, M. and Alfano, J.R.** (2006) *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 harpin. *Journal of Bacteriology*, **188**, 6060-6069.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 69-79.
- Gauthier, A. and Finlay, B.B.** (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **185**, 6747-6755.
- Geldner, N. and Robatzek, S.** (2008) Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant Physiology*, **147**, 1565-1574.
- Genin, S.** (2010) Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, **187**, 920-928.
- Genin, S. and Boucher, C.** (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 107-134.
- Genin, S., Brito, B., Denny, T.P. and Boucher, C.** (2005) Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *Febs Letters*, **579**, 2077-2081.
- Genin, S. and Denny, T.P.** (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. In *Annual Review of Phytopathology*, **50**, 67-89.
- 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*. *Molecular Microbiology*, **6**, 3065-3076.

- Gillings, M., Fahy, P. and Davies, C.** (1993) restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 44-48.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. and Rathjen, J.P.** (2009) AvrPtoB targets the lysm receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Current Biology*, **19**, 423-429.
- Göhre, V., Spallek, T., Haeweker, 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. *Current Biology*, **18**, 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **18**, 277-284.
- Gonzalez, A., Plener, L., Restrepo, S., Boucher, C. and Genin, S.** (2011) Detection and functional characterization of a large genomic deletion resulting in decreased pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 strains. *Environmental Microbiology*, **13**, 3172-3185.
- Gophna, U., Ron, E.Z. and Graur, D.** (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, **312**, 151-163.
- Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A.S., Archer, C.R., Huber, R., Powell, T.K., Lindow, S., Kaiser, M. and Dudler, R.** (2008) A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, **452**, 755-U757.
- Gueneron, M., Timmers, A.C.J., Boucher, C. and Arlat, M.** (2000) Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the Hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **36**, 261-277.
- Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P. and Bertolla, F.** (2009) Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *Isme Journal*, **3**, 549-562.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S. and Boucher, C.** (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology*, **189**, 377-387.
- Gutierrez, J.R., Balmuth, A.L., Ntoukakis, V., Mucyn, T.S., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E. and Rathjen, J.P.** (2010) Prf immune complexes of tomato are

- oligomeric and contain multiple Pto-like kinases that diversify effector recognition. *Plant Journal*, **61**, 507-518.
- 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.
- Haapalainen, M., Engelhardt, S., Kuefner, I., Li, C.-M., Nuernberger, T., Lee, J., Romantschuk, M. and Taira, S.** (2011) Functional mapping of harpin HrpZ of *Pseudomonas syringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Molecular Plant Pathology*, **12**, 151-166.
- Hartmann, N. and Büttner, D.** (2013) The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* spp. is involved in substrate docking during type iii secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 1176-1189.
- Hayward, A.C.** (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **29**, 65-87.
- Hernandez-Romero, D., Solano, F. and Sanchez-Amat, A.** (2005) Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6808-6815.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H.J., Orth, K. and Mudgett, M.B.** (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology*, **50**, 377-389.
- Huang, J.Z., Carney, B.F., Denny, T.P., Weissinger, A.K. and Schell, M.A.** (1995) A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **177**, 1259-1267.
- Huang, J.Z., Yindeeyoungyeon, W., Garg, R.P., Denny, T.P. and Schell, M.A.** (1998) Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *Journal of Bacteriology*, **180**, 2736-2743.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C.A.** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10098-10103.
- 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. *Molecular Microbiology*, **29**, 1379-1390.
- Imada, K., Minamino, T., Kinoshita, M., Furukawa, Y. and Namba, K.** (2010) Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar

- type III chaperone FlIT with its binding partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 8812-8817.
- Izore, T., Job, V. and Dessen, A.** (2011) Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*, **19**, 603-612.
- Jackson, M.W. and Plano, G.V.** (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *Fems Microbiology Letters*, **186**, 85-90.
- Jacobs, J.M., Babujee, L., Meng, F.H., Milling, A. and Allen, C.** (2012) The *In planta* Transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: Conserved Physiological and Virulence Strategies during Bacterial Wilt of Tomato. *Mbio*, **3**.
- Jelenska, J., van Hal, J.A. and Greenberg, J.T.** (2010) *Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13177-13182.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L. and Greenberg, J.T.** (2007) A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Current Biology*, **17**, 499-508.
- Jeppesen, M.G., Navratil, T., Spremulli, L.L. and Nyborg, J.** (2005) Crystal structure of the bovine mitochondrial elongation factor Tu(.)Ts complex. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 5071-5081.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D.** (2010) Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant Journal*, **62**, 367-378.
- Jin, Q.L. and He, S.Y.** (2001) Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, **294**, 2556-2558.
- Job, V., Mattei, P.-J., Lemaire, D., Attree, I. and Dessen, A.** (2010) Structural basis of chaperone recognition of type iii secretion system minor translocator proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 23222-23230.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G.R.** (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, **302**, 1757-1760.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J. and Greenberg, J.T.** (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science*, **324**, 89-91.

- Jurkowski, G.I., Smith, R.K., Yu, I.C., Ham, J.H., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Fengler, K.A. and Bent, A.F.** (2004) *Arabidopsis* DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 511-520.
- Kang, Y.W., Liu, H.L., Genin, S., Schell, M.A. and Denny, T.P.** (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology*, **46**, 427-437.
- Katagiri, F.** (2004) A global view of defense gene expression regulation - a highly interconnected signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 506-511.
- Katoh, K. and Standley, D.M.** (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772-780.
- 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.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6496-6501.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A. and Mudgett, M.B.** (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell*, **20**, 1915-1929.
- 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.
- Kimbrough, T.G. and Miller, S.I.** (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11008-11013.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A.S., Becker, D. and Hedrich, R.** (2010) Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 13471-13479.
- Kubori, T. and Galan, J.E.** (2002) *Salmonella* type III secretion-associated protein InvE controls translocation of effector proteins into host cells. *Journal of Bacteriology*, **184**, 4699-4708.

- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.** (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, 602-605.
- Kuc, J.** (1987) Translocated signals for plant immunization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **494**, 221-223.
- Kvitko, B.H., Ramos, A.R., Morello, J.E., Oh, H.-S. and Collmer, A.** (2007) Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *Journal of Bacteriology*, **189**, 8059-8072.
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X. and Galan, J.E.** (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type iii systems. *Science*, **331**, 1188-1191.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N. and Boucher, C.** (2002) PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 1058-1068.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, **14**, 2627-2641.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O. and Staskawicz, B.J.** (2005) Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, **17**, 1268-1278.
- Lewis, J.D., Lee, A., Ma, W.B., Zhou, H.B., Guttman, D.S. and Desveaux, D.** (2011) The YopJ superfamily in plant-associated bacteria. *Molecular Plant Pathology*, **12**, 928-937.
- Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M. and Taira, S.** (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *Embo Journal*, **21**, 1909-1915.
- Li, J.-G., Liu, H.-X., Cao, J., Chen, L.-F., Gu, C., Allen, C. and Guo, J.-H.** (2010) PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Molecular Plant Pathology*, **11**, 371-381.
- Li, Z.F., Wu, S.L., Bai, X.F., Liu, Y., Lu, J.F., Xiao, B.G., Lu, X.P. and Fan, L.J.** (2011) Genome Sequence of the Tobacco Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **193**, 6088-6089.
- Libault, M., Wan, J.R., Czechowski, T., Udvardi, M. and Stacey, G.** (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase

- genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 900-911.
- Liu, H.L., Zhang, S.P., Schell, M.A. and Denny, T.P.** (2005) Pyramiding, unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 1296-1305.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.J.D. 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.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P.A., Schneider, A.R. and Collmer, A.** (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology*, **54**, 353-365.
- Lorenz, C. and Büttner, D.** (2009) Functional characterization of the type iii secretion atpase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, **191**, 1414-1428.
- Lorenz, C. and Buttner, D.** (2011) Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Molecular Microbiology*, **79**, 447-467.
- Lorenz, C., Hausner, J. and Büttner, D.** (2012) HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. *Plos One*, **7**.
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. and Buttner, D.** (2008) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *Plos Pathogens*, **4**.
- Lovell, H.C., Mansfield, J.W., Godfrey, S.A.C., Jackson, R.W., Hancock, J.T. and Arnold, D.L.** (2009) Bacterial evolution by genomic island transfer occurs *via* dna transformation *in planta*. *Current Biology*, **19**, 1586-1590.
- Lu, D.P., Wu, S.J., Gao, X.Q., Zhang, Y.L., Shan, L.B. and He, P.** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BI1, 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.
- Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.-A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., Brendel, V. and Bogdanove, A.J.** (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *Plos One*, **3**.
- Lunelli, M., Lokareddy, R.K., Zychlinsky, A. and Kolbe, M.** (2009) IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106**, 9661-9666.

- Ma, K.W., Flores, C. and Ma, W.B.** (2011) Chromatin configuration as a battlefield in plant-bacteria interactions. *Plant Physiology*, **157**, 535-543.
- Mackey, D., Belkhadir, 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.
- Mackey, D., Holt, B.F., 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. and McFall, A.J.** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, **61**, 1365-1371.
- Maekawa, T., Cheng, W., Spiridon, L.N., Toller, A., Lukasik, E., Saijo, Y., Liu, P.Y., Shen, Q.H., Micolta, M.A., Somssich, I.E., Takken, F.L.W., Petrescu, A.J., Chai, J.J. and Schulze-Lefert, P.** (2011) Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death. *Cell Host & Microbe*, **9**, 187-199.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, 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. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 614-629.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E. and Unger, V.M.** (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, **306**, 1040-1042.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 637-646.
- Martinez-Argudo, I. and Blocker, A.J.** (2010) The *Shigella* T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors. *Molecular Microbiology*, **78**, 1365-1378.
- Melotto, M., Underwood, W. and He, S.Y.** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, **46**, 101-122.
- Meng, F.H., Yao, J. and Allen, C.** (2011) A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *Journal of Bacteriology*, **193**, 2477-2486.

- Mestre, P. and Baulcombe, D.C.** (2006) Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein. *Plant Cell*, **18**, 491-501.
- Michelmore, R.W. and Meyers, B.C.** (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, **8**, 1113-1130.
- Miki, T., Shibagaki, Y., Danbara, H. and Okada, N.** (2009) Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity Island 2. *Journal of Bacteriology*, **191**, 6843-6854.
- Mills, E., Baruch, K., Charpentier, X., Kobi, S. and Rosenshine, I.** (2008) Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host & Microbe*, **3**, 104-113.
- Mishina, T.E. and Zeier, J.** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **50**, 500-513.
- Mithofer, A., Ebel, J. and Felle, H.H.** (2005) Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 983-990.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J. and Baulcombe, D.C.** (2002) Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *Embo Journal*, **21**, 4511-4519.
- Monaghan, J. and Zipfel, C.** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, **15**, 349-357.
- Monteiro, F., Genin, S., van Dijk, I. and Valls, M.** (2012a) A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology-Sgm*, **158**, 2107-2116.
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I. and Valls, M.** (2012b) A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 557-568.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa, C.** (2006) *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 599-607.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M. and Namba, K.** (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *Journal of Molecular Biology*, **359**, 466-477.

- Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J.** (2009) A Simple cipher governs dna recognition by TAL effectors. *Science*, **326**, 1501-1501.
- Mueller, C.A., Broz, P. and Cornelis, G.R.** (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular Microbiology*, **68**, 1085-1095.
- Mukaihara, T., Tamura, N. and Iwabuchi, M.** (2010) Genome-Wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type iii effector proteins by a new functional screen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 251-262.
- Mukaihara, T., Tamura, N., Murata, Y. and Iwabuchi, M.** (2004) Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **54**, 863-875.
- Mur, L.A.J., Laarhoven, L.J.J., Harren, F.J.M., Hall, M.A. and Smith, A.R.** (2008) Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiology*, **148**, 1537-1546.
- Mysore, K.S. and Ryu, C.M.** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, **9**, 97-104.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D.G.** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, **312**, 436-439.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D.G.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*, **135**, 1113-1128.
- Neves, B.C., Mundy, R., Petrovska, L., Dougan, G., Knutton, S. and Frankel, G.** (2003) CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infection and Immunity*, **71**, 2130-2141.
- Newman, M.A., Sundelin, T., Nielsen, J.T. and Erbs, G.** (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci*, **4**, 139.
- Nissinen, R.M., Ytterberg, A.J., Bogdanove, A.J., Van Wijk, K.J. and Beer, S.V.** (2007) Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 55-67.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumphlin, 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 10774-10779.
- Nürnberg, T. and Lipka, V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, **6**, 335-345.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S. and Boucher, C.** (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 938-949.
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. and Abe, A.** (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **188**, 2801-2811.
- Ohgita, T., Hayashi, N., Hama, S., Tsuchiya, H., Gotoh, N. and Kogure, K.** (2013) A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force-dependent type III secretion apparatus rotation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **27**, 2862-2872.
- Pallen, M.J., Bailey, C.M. and Beatson, S.A.** (2006) Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Science*, **15**, 935-940.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F.** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, **318**, 113-116.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. and Demers, B.** (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, **56**, 1627-1635.
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L.** (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, **6**, 7-14.
- 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.
- Pedley, K.F. and Martin, G.B.** (2003) Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology*, **41**, 215-243.

- Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F. and Valls, M.** (2013) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology*, **14**, 651-662.
- 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.Y., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 7652-7657.
- Pieterse, C.M. and van Loon, L.** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 456-464.
- Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H.** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 421-426.
- Plener, L., Boistard, P., Gonzalez, A., Boucher, C. and Genin, S.** (2012) Metabolic Adaptation of *Ralstonia solanacearum* during Plant Infection: A Methionine Biosynthesis Case Study. *Plos One*, **7**.
- Plener, L., Manfredi, P., Valls, M. and Genin, S.** (2010) PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type iii secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **192**, 1011-1019.
- Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z.M., Gerstein, M., Snyder, M. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development*, **23**, 80-92.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C. and Genin, S.** (2009) Two type iii secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 538-550.
- Poueymiro, M. and Genin, S.** (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology*, **12**, 44-52.
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A.S., Engel, A., Panopoulos, N.J., Mansfield, J., Pugsley, A.P., Karamanou, S. and Economou, A.** (2003) Type III protein translocase - HrcN is a peripheral membrane ATPase that is activated by oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 25816-25824.

- Preston, G.M., Bertrand, N. and Rainey, P.B.** (2001) Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Molecular Microbiology*, **41**, 999-1014.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. and Petersen, M.** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *Embo Journal*, **27**, 2214-2221.
- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A. and Attree, I.** (2005) The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 36293-36300.
- Racape, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., Nurnberger, T., Parlange, F., Puverel, S. and Keller, H.** (2005) Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Molecular Microbiology*, **58**, 1406-1420.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E., Mongrand, B., Domergue, F. and Roby, D.** (2008) A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 752-767.
- Rairdan, G.J., Collier, S.M., Sacco, M.A., Baldwin, T.T., Boettrich, T. and Moffett, P.** (2008) The coiled-coil and nucleotide binding domains of the potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. *Plant Cell*, **20**, 739-751.
- Rairdan, G.J. and Moffett, P.** (2006) Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell*, **18**, 2082-2093.
- Ramonell, K.M., Zhang, B., Ewing, R.M., Chen, Y., Xu, D., Stacey, G. and Somerville, S.** (2002) Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, **3**, 301-311.
- Remenant, B., Babujee, L., Lajus, A., Medigue, C., Prior, P. and Allen, C.** (2012) Sequencing of K60, type strain of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **194**, 2742-2743.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C. and Prior, P.** (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *Bmc Genomics*, **11**.

- Remenant, B., de Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C. and Prior, P.** (2011) *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *Plos One*, **6**.
- Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S. and Peeters, N.** (2011) Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytologist*, **192**, 976-987.
- Robatzek, S., Chinchilla, D. and Boller, T.** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, **20**, 537-542.
- Rodriguez-Herva, J.J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., Lopez-Torrejon, G., Diaz, I., del Pozo, J.C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodriguez-Palenzuela, P. and Lopez-Solanilla, E.** (2012) A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology*, **14**, 669-681.
- Rohmer, L., Guttman, D.S. and Dangl, J.L.** (2004) Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Genetics*, **167**, 1341-1360.
- Roine, E., Wei, W.S., Yuan, J., NurmiahoLassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. and He, S.Y.** (1997) Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 3459-3464.
- Römer, 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.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U. and Lahaye, T.** (2009) Recognition of AvrBs3-Like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper *bs3* alleles. *Plant Physiology*, **150**, 1697-1712.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L.R., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F.M. and Martin, G.B.** (2007) A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, **448**, 370-U313.
- Ross, J.A. and Plano, G.V.** (2011) A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC. *Journal of Bacteriology*, **193**, 2276-2289.

- 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.
- Sal-Man, N., Setiaputra, D., Scholz, R., Deng, W.Y., Yu, A.C.Y., Strynadka, N.C.J. and Finlay, B.B.** (2013) EscE and EscG are cochaperones for the type III needle protein EscF of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **195**, 2481-2489.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A.** (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.
- Sana, T.R., Fischer, S., Wohlgemuth, G., Katrekar, A., Jung, K.H., Ronald, P.C. and Fiehn, O.** (2010) Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics*, **6**, 451-465.
- Sanchez-SanMartin, C., Bustamante, V.W., Calva, E. and Puente, J.L.** (2001) Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 2823-2833.
- Sani, M., Allaoui, A., Fusetti, F., Oostergetel, G.T., Keegstra, W. and Boekema, E.J.** (2007) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron*, **38**, 291-301.
- Schechter, L.M., Roberts, K.A., Jamir, Y., Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004) *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *Journal of Bacteriology*, **186**, 543-555.
- Schell, M.A.** (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*, **38**, 263-292.
- Schell, M.A., Denny, T.P. and Huang, J.Z.** (1994) VsrA, a second two-component sensor regulating virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology*, **11**, 489-500.
- Scholze, H. and Boch, J.** (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, **14**, 47-53.
- Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., Schmied, W.H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galan, J.E. and Marlovits, T.C.** (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *Plos Pathogens*, **6**.

- Schreiner, M. and Niemann, H.H.** (2012) Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD in complex with a peptide of the minor translocator YopD. *Bmc Structural Biology*, **12**.
- Schubot, F.D., Jackson, M.W., Penrose, K.J., Cherry, S., Tropea, J.E., Plano, G.V. and Waugh, D.S.** (2005) Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *Journal of Molecular Biology*, **346**, 1147-1161.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G. and Chinchilla, D.** (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 9444-9451.
- Schwessinger, B. and Ronald, P.C.** (2012) Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63, **63**, 451-482.
- Shan, L.B., He, P., Li, J.M., Heese, A., Peck, S.C., Nurnberger, T., Martin, G.B. and Sheen, J.** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host & Microbe*, **4**, 17-27.
- Shapiro, A.D. and Zhang, C.** (2001) The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **127**, 1089-1101.
- Sharfman, M., Bar, M., Ehrlich, M., Schuster, S., Melech-Bonfil, S., Ezer, R., Sessa, G. and Avni, A.** (2011) Endosomal signaling of the tomato leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant Journal*, **68**, 413-423.
- Shen, Q.H., Zhou, F.S., Bieri, S., Haizel, T., Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P.** (2003) Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley *mla* disease resistance genes to the powdery mildew fungus. *Plant Cell*, **15**, 732-744.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, **9**, 261-270.
- Silva-Herzog, E., Ferracci, F., Jackson, M.W., Joseph, S.S. and Plano, G.V.** (2008) Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein. *Microbiology-Sgm*, **154**, 593-607.
- Sole, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D.G., Deslandes, L. and Valls, M.** (2012) The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 941-953.

- Sorg, J.A., Blaylock, B. and Schneewind, O.** (2006) Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 16490-16495.
- Spaeth, K.E., Chen, Y.-S. and Valdivia, R.H.** (2009) The *Chlamydia* Type III secretion system c-ring engages a chaperone-effector protein complex. *Plos Pathogens*, **5**.
- Spanu, P., Grosskopf, D.G., Felix, G. and Boller, T.** (1994) The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein-phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiology*, **106**, 529-535.
- Spoel, S.H. and Loake, G.J.** (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 358-364.
- Sukhan, A., Kubori, T. and Galan, J.E.** (2003) Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. *Journal of Bacteriology*, **185**, 3480-3483.
- Sun, W.X., 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.
- Sun, P., Tropea, J.E., Austin, B.P., Cherry, S. and Waugh, D.S.** (2008) Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *Journal of Molecular Biology*, **377**, 819-830.
- Sundin, C., Thelaus, J., Broms, J.E. and Forsberg, A.** (2004) Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microbial Pathogenesis*, **37**, 313-322.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L.I. and Fegan, M.** (1996) Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**, 10-15.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C.** (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo Journal*, **19**, 3876-3887.
- Tameling, W.I.L., Vossen, J.H., Albrecht, M., Lengauer, T., Berden, J.A., Haring, M.A., Cornelissen, B.J.C. and Takken, F.L.W.** (2006) Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiology*, **140**, 1233-1245.

- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M. and Panopoulos, N.J.** (2010) Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annual Review of Phytopathology*, **48**, 347-370.
- Tang, X., Xiao, Y. and Zhou, J.-M.** (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 1159-1166.
- Tans-Kersten, J., Huang, H.Y. and Allen, C.** (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, **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 Pathogens*, **6**.
- Thomas, J., Stafford, G.P. and Hughes, C.** (2004) Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3945-3950.
- Thomas, N.A., Deng, W., Baker, N., Puente, J. and Finlay, B.B.** (2007) Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 29634-29645.
- Thomas, N.A., Deng, W.Y., Puente, J.L., Frey, E.A., Yip, C.K., Strynadka, N.C.J. and Finlay, B.B.** (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **57**, 1762-1779.
- Thomas, N.A., Ma, I., Prasad, M.E. and Rafuse, C.** (2012) Expanded roles for multicargo and class 1B effector chaperones in type iii secretion. *Journal of Bacteriology*, **194**, 3767-3773.
- Torres, M.A.** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, **138**, 414-429.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**, 373-378.
- Triplett, L.R., Zhao, Y. and Sundin, G.W.** (2006) Genetic differences between blight-causing *Erwinia* species with differing host specificities, identified by suppression subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7359-7364.
- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant*

Biology, **13**, 459-465.

- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. and Katagiri, F.** (2009) Network properties of robust immunity in plants. *Plos Genetics*, **5**.
- Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.J., Vaillau, F., Gentzbittel, L. and Jardinaud, M.F.** (2009) Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type iii secretion system effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiology*, **150**, 1713-1722.
- Ueda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H.** (2006) Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, **61**, 31-45.
- Uma, B., Rani, T.S. and Podile, A.R.** (2011) Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 2141-2152.
- Underwood, W., Zhang, S.Q. and He, S.Y.** (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **52**, 658-672.
- Vaillau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L. and Petitprez, M.** (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 159-167.
- Valls, M., Genin, S. and Boucher, C.** (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *Plos Pathogens*, **2**, 798-807.
- van der Hoorn, R.A.L. and Kamoun, S.** (2008) From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, **20**, 2009-2017.
- van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P. and Boucher, C.** (2002) Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Molecular Microbiology*, **44**, 935-946.
- van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marendia, 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. *Molecular Microbiology*, **36**, 249-260.
- van Ooijen, G., Mayr, G., Albrecht, M., Cornelissen, B.J.C. and Takken, F.L.W.** (2008) Transcomplementation, but not physical association of the CC-NB-ARC and LRR domains of tomato R protein Mi-1.2 is altered by mutations in the ARC2 subdomain. *Molecular Plant*, **1**, 401-410.

- van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, M.M.A., Albrecht, M., Cornelissen, B.J.C. and Takken, F.L.W.** (2008) Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1383-1397.
- van Overbeek, L.S., Bergervoet, J.H.H., Jacobs, F.H.H. and van Elsas, J.D.** (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology*, **94**, 463-469.
- Vingadassalom, D., Campellone, K.G., Brady, M.J., Skehan, B., Battle, S.E., Robbins, D., Kapoor, A., Hecht, G., Snapper, S.B. and Leong, J.M.** (2010) Enterohemorrhagic *E. coli* requires N-WASP for efficient type iii translocation but not for EspF(U)-mediated actin pedestal formation. *Plos Pathogens*, **6**.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J. and Perret, X.** (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology*, **28**, 1381-1389.
- Wagner, S., Stenta, M., Metzger, L.C., Dal Peraro, M. and Cornelis, G.R.** (2010) Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13860-13865.
- Wainwright, L.A. and Kaper, J.B.** (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **27**, 1247-1260.
- Wairuri, C.K., van der Waals, J.E., van Schalkwyk, A. and Theron, J.** (2012) *Ralstonia solanacearum* Needs Flp Pili for Virulence on Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 546-556.
- Wang, D., Roe, A.J., McAteer, S., Shipston, M.J. and Gally, D.L.** (2008) Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157 : H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir. *Molecular Microbiology*, **69**, 1499-1512.
- Wang, Y.J., Li, J.F., Hou, S.G., Wang, X.W., Li, Y.A., Ren, D.T., Chen, S., Tang, X.Y. and Zhou, J.M.** (2010) A *Pseudomonas syringae* ADP-Ribosyltransferase Inhibits *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *Plant Cell*, **22**, 2033-2044.
- Weaver, L.M., Swiderski, M.R., Li, Y. and Jones, J.D.G.** (2006) The *Arabidopsis thaliana* TIR-NB-LRR R-protein, RPP1A; protein localization and constitutive activation of defence by truncated alleles in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **47**, 829-840.
- Weber, E. and Koebnik, R.** (2005) Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, **187**, 6175-6186.

- Weber, E. and Koebnik, R.** (2006) Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, **188**, 1405-1410.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H. and Pugin, A.** (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, **14**, 1937-1951.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J.C., Lemaire, C., Poussier, S. and Prior, P.** (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *Isme Journal*, **6**, 961-974.
- Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 383-389.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Neumayer, W., Trcek, J. and Heesemann, J.** (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion. *Bmc Microbiology*, **4**.
- Wirthmueller, L., Zhang, Y., Jones, J.D.G. and Parker, J.E.** (2007) Nuclear accumulation of the *Arabidopsis* immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Current Biology*, **17**, 2023-2029.
- Wong, T., Amidi, A., Dodds, A., Siddiqi, S., Wang, J., Yep, T., Tamang, D.G. and Saier, M.H.** (2007) Evolution of the bacterial flagellum. *Microbe*, **2**, 335-340.
- Wood, S.E., Jin, J. and Lloyd, S.A.** (2008) YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *Journal of Bacteriology*, **190**, 4252-4262.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zhang, J., Chen, J.F., Chen, M.S. and Zhou, J.M.** (2011) BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 100-107.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W.M., Li, Y., Tang, X.Y., Zhu, L.H., Chai, J.J. and Zhou, J.M.** (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology*, **18**, 74-80.
- Xiao, F.M., He, P., Abramovitch, R.B., Dawson, J.E., Nicholson, L.K., Sheen, J. and Martin, G.B.** (2007) The N-terminal region of *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB elicits Pto-dependent immunity and has two distinct virulence determinants. *Plant Journal*, **52**, 595-614.
- Xing, W., Zou, Y., Liu, Q., Liu, J.N., Luo, X., Huang, Q.Q., Chen, S., Zhu, L.H., Bi, R.C., Hao, Q., Wu, J.W., Zhou, J.M. and Chai, J.J.** (2007) The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature*, **449**, 243-247.

- Xu, J., Zheng, H.J., Liu, L., Pan, Z.C., Prior, P., Tang, B., Xu, J.S., Zhang, H., Tian, Q., Zhang, L.Q. and Feng, J.** (2011) Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82. *Journal of Bacteriology*, **193**, 4261-4262.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C.A.** (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10104-10109.
- Yang, B., Sugio, A. and White, F.F.** (2006) Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10503-10508.
- Yang, H., Shan, Z., Kim, J., Wu, W., Lian, W., Zeng, L., Xing, L. and Jin, S.** (2007) Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **189**, 2599-2609.
- Yao, J. and Allen, C.** (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, **188**, 3697-3708.
- Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A. and Ohnishi, K.** (2009a) The global virulence regulator phca negatively controls the *Ralstonia solanacearum* hrp regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. *Journal of Bacteriology*, **191**, 3424-3428.
- Yoshimochi, T., Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi, Y. and Ohnishi, K.** (2009b) Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of General Plant Pathology*, **75**, 196-204.
- Yu, X.-J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K.E. and Holden, D.W.** (2010) pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science*, **328**, 1040-1043.
- Yu, Y.H., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., Feng, J.X., Verdier, V. and Szurek, B.** (2011) Colonization of rice leaf blades by an african strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice *Nodulin-3 Os11N3* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 1102-1113.
- Zarivach, R., Deng, W.Y., Vuckovic, M., Felise, H.B., Nguyen, H.V., Miller, S.I., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C.J.** (2008) Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature*, **453**, 124-127.
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C.J.** (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**, 131-137.

- Zhang, J., Shao, F., Cui, H., Chen, L.J., Li, H.T., Zou, Y., Long, C.Z., Lan, L.F., Chai, J.J., Chen, S., Tang, X.Y. and Zhou, J.M.** (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-Induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, **1**, 175-185.
- Zhao, Y., Sundin, G.W. and Wang, D.** (2009) Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Microbiology*, **55**, 457-464.
- Zhu, Z.H., Xu, F., Zhang, Y.X., Cheng, Y.T., Wiermer, M., Li, X. and Zhang, Y.L.** (2010) *Arabidopsis* resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13960-13965.
- Zipfel, C. and 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, J.D.G., 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., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G. and Boller, T.** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764-767.
- Zurawski, D.V. and Stein, M.A.** (2004) The SPI2-encoded SseA chaperone has discrete domains required for SseB stabilization and export, and binds within the C-terminus of SseB and SseD. *Microbiology-Sgm*, **150**, 2055-2068.

Auteur : David LOHOU

Titre : Contribution à la caractérisation fonctionnelle de protéines de contrôle de la sécrétion d'effecteurs de type III chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : chaperonnes et protéine à domaine T3S4.

Directeur de thèse : Stéphane Genin

Co-directrice : Fabienne Vailleau

RESUME

La bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* est l'agent responsable du flétrissement bactérien sur plus de 200 espèces végétales, dont des espèces agronomiques, faisant de cette bactériose une des plus importantes dans le monde. Le pouvoir pathogène de la bactérie repose en grande partie sur sa capacité à injecter des protéines, appelées effecteurs de type III (ET3s), *via* le système de sécrétion de type III (SST3). La dernière décennie a été notamment marquée par la découverte chez les bactéries pathogènes de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle du processus de sécrétion de type III. Chez *R. solanacearum*, ces mécanismes de contrôle de la sécrétion restent méconnus, contrairement aux mécanismes de régulation transcriptionnelle. Au cours de ces travaux, nous nous sommes attachés à caractériser les fonctions des protéines HpaB (RSp0853), HpaD (RSp0848) et FliT-like (RSc2897) pour lesquelles plusieurs éléments suggèrent un potentiel rôle comme chaperonnes de type III (CT3s), ainsi que de la protéine HpaP qui présente un domaine T3S4 (Type III Secretion Substrate Specificity Switch). Nous avons pu mettre en évidence la capacité de certaines CT3s à interagir entre elles et, pour HpaB et HpaD, à interagir avec de nombreux ET3s. De plus, les trois CT3s putatives semblent impliquées dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*, HpaB s'avérant même indispensable à la virulence de la bactérie. D'autre part, nos travaux mettent en exergue l'importance de la protéine HpaP pour le pouvoir pathogène de la bactérie et son implication dans le contrôle de la sécrétion de substrats du SST3. Les résultats suggèrent notamment que HpaP promeut la sécrétion de l'ET3 PopP1 en interagissant physiquement avec ce dernier. Finalement, la caractérisation de séquences conservées du domaine T3S4 révèle l'importance de cette région pour la fonction de la protéine HpaP. L'ensemble de ces travaux suggère l'implication de plusieurs protéines dans le contrôle du processus de sécrétion de type III et souligne la diversité des mécanismes mis en jeu impliquant les protéines de type T3S4 chez les bactéries pathogènes.

Mots-clés : flétrissement bactérien, système de sécrétion de type III (SST3), chaperonnes de type III (CT3s), type III secretion substrate specificity switch (T3S4), pouvoir pathogène, HpaP, HpaB, HpaD, FliT-like.

Discipline : Interactions Plantes-Microorganismes

Laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde-Rouge, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France.