



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *L'Institut National Polytechnique de Toulouse*

**Discipline ou spécialité :**

*Génétique et physiologie moléculaires des plantes et microorganismes associés*

---

**Présentée et soutenue par** *Marie TURNER*

**Le** *25 septembre 2009*

**Titre :**

*Plusieurs niveaux de contrôle sont mis en jeu lors du flétrissement bactérien chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula**

---

### JURY

*Frédérique VAN GIJSEGEM, Chargée de recherche, INRA, Paris, Rapporteur*  
*Bruno TOURAINE, Professeur de l'université de Montpellier, Rapporteur*  
*Philippe SIMONEAU, Professeur de l'université d'Angers, Examineur*  
*Stéphane GENIN, Directeur de recherche, CNRS, Toulouse, Examineur*  
*Marie-Françoise JARDINAUD, Maître de Conférence à l'ENSAT, Co-directrice de thèse*  
*Laurent GENTZBITTEL, Professeur à l'ENSAT, Directeur de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *SEVAB*

**Unité de recherche :** *Laboratoire de Symbiose et Pathologie des Plantes*

**Directeur(s) de Thèse :** *Marie-Françoise JARDINAUD et Laurent GENTZBITTEL*

**Rapporteurs :** *Frédérique VAN GIJSEGEM et Bruno TOURAINE*

Tout d'abord je tiens à dire merci aux membres du jury, pour avoir lu et évalué ce travail. Merci pour leurs critiques et leurs réflexions constructives.

Merci ensuite à mes deux directeurs de thèse, Marie-Françoise Jardinaud et Laurent Gentzbittel. Merci de m'avoir laissé la liberté d'apprendre et de travailler à mon rythme, tout en étant présents et disponibles. Merci pour toutes ces discussions stimulantes.

Je remercie ensuite Stéphane Genin, parce que sa présence a été précieuse pour moi tout au long de cette thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire SP2, pour tous les bons souvenirs que j'emporte. Un merci particulier pour Marie-José Tavella, une coéquipière mémorable par sa rigueur et son enthousiasme. Merci également à Fabienne Vailleau, pour ses compétences en pathologie et son soutien.

Merci aux membres de la plateforme microscopie pour leurs conseils, leurs nombreuses compétences et leur grande disponibilité, et particulièrement à Alain Jauneau qui a plus précisément suivi ce travail.

Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui ont participé à ce travail, Laure Gress et Amandine Barra, pour leur investissement et leur rigueur.

Merci à Joël Allemand, Timothée Chaumier, Alexandre-Gwen Agnès, Julie Faivre d'Arcier et Jean-Marie Arpizou, pour leur participation active et volontaire à cette traque désespérante des fautes diverses et variées qui se cachent partout sournoisement. D'ailleurs je ne remercie pas le verbe avoir.

Merci aux enseignants avec qui j'ai travaillé et qui m'ont transmis leurs savoirs en termes de pédagogie et d'enseignement. Merci en particulier à Anne Bernadac, tutrice de monitorat avec qui j'ai beaucoup aimé analyser le sol et Christian Chervin, qui m'a notamment initié au plaisir de la vinification.

Merci à tous les membres de l'IFR40 que je ne peux malheureusement citer un par un, dont les discussions bienveillantes, scientifiques ou amicales, m'ont beaucoup enrichi.

Merci à ma famille et mes amis, pour leur participation précieuse à mon équilibre par leur présence, leur confiance et leur soutien, depuis déjà bien avant ma thèse. Merci à Greg, présent à mes côtés depuis ma première année de Bio et qui m'a tant apporté...

Pour finir, je dis merci à tous ceux qui pensent que :

« Seuls les poissons morts suivent le cours de la rivière »

**"C'est la dose qui fait le poison"**

« On n'est pas responsable de la tête qu'on a, mais on est responsable de la tête qu'on fait »

« La porte la mieux fermée est celle que l'on peut laisser ouverte »

« Le bonheur ne dépend pas de ce qui nous manque, mais de la façon dont nous nous servons de ce que nous avons »

**La vie est belle....**

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>I. Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>II. Le système immunitaire des plantes</b>	<b>10</b>
A. Le modèle en zig-zag	11
B. La résistance quantitative	16
C. La transduction du signal éliciteur	17
D. La mise en place de la défense	21
<b>III. Les bactéries pathogènes de plante</b>	<b>24</b>
A. Généralités	24
B. Les mécanismes de pénétration	25
<b>IV. <i>R. solanacearum</i>, bactérie phytopathogène racinaire</b>	<b>28</b>
A. Biologie et répartition de <i>R. solanacearum</i>	28
B. La classification de <i>R. solanacearum</i>	29
C. Les moyens de lutte	30
D. Les mécanismes de résistance à <i>R. solanacearum</i>	31
E. La complexité du génome de <i>R. solanacearum</i>	35
<b>V. Les déterminants du pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i></b>	<b>36</b>
A. Généralités	36
B. Les systèmes d'exportation de protéines bactériennes	37
C. Les enzymes extracellulaires	37
D. Les exopolysaccharides	38
E. La mobilité	39
F. Le quorum sensing	39
<b>VI. L'appareil de sécrétion de type III</b>	<b>40</b>
A. Généralités	40
B. Mise en place de la structure et organisation génétique	41
C. La régulation des gènes <i>hrp</i>	42
D. La translocation des effecteurs	43
<b>VII. Les effecteurs de type III des bactéries pathogènes</b>	<b>44</b>
A. Diversité des effecteurs	44
B. Facteurs d'avirulence	45
C. Facteurs de virulence	46
D. Des agents doubles : AvrPto et AvrPtoB	49
E. Cas particulier des harpines	50
F. Les effecteurs de <i>R. solanacearum</i>	51
<b>VIII. Etude de la pathologie des légumineuses</b>	<b>52</b>
A. L'importance des légumineuses	52
B. Etude de <i>M. truncatula</i>	54

<b>IX.</b>	<b>Projet de thèse</b>	<b>57</b>
	<b>RESULTATS</b>	<b>59</b>
<b>I.</b>	<b>Publication “ Dissection of bacterial wilt on <i>Medicago truncatula</i> revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development” publiée dans <i>Plant physiology</i></b>	<b>59</b>
<b>II.</b>	<b>Mise en évidence de symptômes racinaires induit par <i>R. solanacearum</i> lors de son interaction avec <i>M. truncatula</i></b>	<b>69</b>
<b>III.</b>	<b>L’interaction évaluée du côté du partenaire bactérien</b>	<b>72</b>
A.	Quelles sont les molécules bactériennes impliquées dans le développement des symptômes racinaires?	72
B.	Comment se déroule l’infection chez une lignée sensible et une lignée résistante?	77
C.	Comment se déroule l’infection en s’affranchissant de l’étape de pénétration chez la lignée sensible et la lignée résistante?	80
<b>IV.</b>	<b>L’interaction évaluée du côté du partenaire végétal</b>	<b>82</b>
A.	L’éthylène est-il impliqué dans le processus infectieux ?	83
B.	Quelles sont les modifications cellulaires liées à l’infection chez les lignées sensible et résistante?	84
C.	En quoi les ET3s sont impliqués dans les modifications de l’extrémité racinaire chez la lignée sensible ?	88
	<b>DISCUSSION</b>	<b>95</b>
<b>I.</b>	<b>Corrélation entre les différents symptômes racinaires</b>	<b>95</b>
<b>II.</b>	<b>Les symptômes racinaires dans le processus infectieux : rôle des ET3s</b>	<b>97</b>
<b>III.</b>	<b>Mécanismes liés à la résistance</b>	<b>101</b>
A.	Des modifications pariétales semblent limiter la propagation de <i>R. solanacearum</i>	102
B.	Des divisions autour du cylindre central pourraient réduire la colonisation bactérienne	103
C.	La résistance peut également avoir lieu dans des stades plus tardifs de l’infection	104
<b>IV.</b>	<b>Les mécanismes impliqués dans la sensibilité</b>	<b>105</b>
A.	L’inhibition de la voie éthylène abolit les symptômes racinaires et la colonisation bactérienne	105
B.	<i>R. solanacearum</i> présente-t-elle une phase nécrotrophe ? Mise en évidence par la production de ROS	107
<b>V.</b>	<b>La complexité du pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i> et le rôle du SST3</b>	<b>111</b>
A.	Le rôle du SST3 dans l’attachement de la bactérie	111
B.	La colonisation <i>in planta</i> des mutants <i>hrp</i>	112
C.	L’induction de mécanismes de défense par les mutants <i>hrp</i>	113
	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>115</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>118</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>122</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- ABA** : Acide abcissique  
**ACUR** : Régions à usage de codon alternatif  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism  
**AHL** : N-acyl homosérine lactones  
**AMPC** : Adénosine monophosphate cyclique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**AVG** : Aminoethoxyvinylglycine  
**Avr** : Avirulence  
**CC** : Coiled-coil  
**CFU** : Cell forming unit  
**CHS** : Chalcone synthase  
**CT** : *p*-coumaroyltyramine  
**DFR** : Dihydroflavonol reductase  
**DON** : Deoxynivalenol  
**EPS** : Exopolysaccharide  
**ET** : Ethylène  
**ET3** : Effecteur de type III  
**ETI** : Effector Triggered Immunity  
**ETS** : Effector Triggered Susceptibility  
**FDA** : Fluoresceine di-acétate  
**FLS** : Flavonol synthase  
**FT** : Feruloyltyramine  
**GTP** : Guanosine-5'-triphosphate  
**GUS** :  $\beta$ -glucuronidase  
**HPI** : Heure post-inoculation  
**HR** : Réaction hypersensible  
**HRGP** : Glycoprotéines riches en hydroxyproline  
**IP3** : Inositol triphosphate  
**ITS** : Internal Transcribed Spacer  
**JA** : Acide jasmonique  
**JPI** : Jours post-inoculation  
**LPS** : Lipopolysaccharides

**LRR** : Leucine-Rich Repeat  
**LRS** : Laterals Root Structures  
**MAMP** : Micorbe Associated Molecular Pattern  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**MU** : 4-methylumbellifere  
**MUG** : 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide hydrate  
**NADPH** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
**NBT** : Nitrobluetétrazolium  
**NLP** : Nep1 (Necrosis and ethylene-inducing peptide-1)-like protein  
**NO** : Oxyde d'azote  
**OA** : Acide oxalique  
**PAMP** : Pathogen Associated Molecular Pattern  
**PCD** : Mort cellulaire programmée  
**PR** : Pathogenesis-related  
**PRR** : Pattern Recognition Receptor  
**PTI** : PAMP Triggered Immunity  
**QTL** : Quantitative Trait Loci  
**R** : Résistance  
**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RLK** : Récepteurs-Like Kinases  
**RLP** : Récepteurs-Like Protéines  
**RLU** : Unité relative de luminescence  
**ROS** : Espèces réactives d'oxygènes  
**SA** : Acide salicylique  
**SAR** : Résistance systémique acquise  
**SST2** : Système de sécrétion de type II  
**SST3** : Système de sécrétion de type III  
**SST4** : Système de sécrétion de type IV  
**TEG** : Tampon d'extraction GUS  
**TIR** : Toll-interleukin-1  
**ULP** : Proteases ubiquitin-like  
**UV** : Ultra violet  
**VNTR** : Nombre variable de répétitions en tandem

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Modèle en Zig-zag qui illustre le système immunitaire des plantes ——— p.11
- Figure 2.** Représentation schématique des différents modèles d'interaction entre protéines de résistances et effecteurs ——— p.13
- Figure 3.** Schéma représentatif des réactions de défense induites lors d'une interaction entre une plante et un agent pathogène ——— p.17
- Figure 4.** Représentation simplifiée des voies de régulation SA/JA/ET dans la mise en place de la défense ——— p.20
- Figure 5.** Illustration des symptômes de flétrissement causés par *R. solanacearum* sur différents hôtes ——— p.28
- Figure 6.** Diversité génétique et relations phylogénétiques entre les différentes souches du complexe d'espèce *R. solanacearum* ——— p.29
- Figure 7.** Schéma simplifié des voies de régulation de la production d'EPSI ——— p.39
- Figure 8.** Organisation génétique du cluster *hrp* de *R. solanacearum* ——— p.41
- Figure 9.** Représentation schématique du SST3 de *R. solanacearum* ——— p.42
- Figure 10.** Schéma simplifié de la régulation des gènes *hrp* de *R. solanacearum* ——— p.43
- Figure 11.** Cibles végétales et activités de PAMPs et d'effecteurs de type III des bactéries phytopathogènes ——— p.44
- Figure 12.** Modèle d'action de la protéase AvrPphB dans une plante d'*Arabidopsis* exprimant la protéine de résistance RPS5 infectée par *P. syringae* ——— p.46
- Figure 13.** Le processus d'ubiquitination par le complexe SCF ——— p.48
- Figure 14.** Représentation de la voie de sumoylation des eucaryotes et de l'action d'effecteurs de type III ——— p.49
- Figure 15.** Observation des poils absorbants suite à l'inoculation de la lignée A17 par les souches GMI1000 et GMI1000 *hrcS* ——— p.73

- Figure 16.** Viabilité de l'épiderme des extrémités racinaires de la lignée F83005.5, 3 jpi par les mutants d'effecteurs ————— p.74
- Figure 17.** Viabilité des extrémités racinaires de la lignée F83005.5, 3 jpi par les mutants *gala7*, *avrA* et le double mutant *gala7-avrA* ————— p.75
- Figure 18.** Croissance racinaire des lignées A17 et F83005.5 après inoculation par la souche GMI1000 et les mutants *gala7*, *avrA*, *gala7-avrA* et *hrcS* ————— p.76
- Figure 19.** Illustration du crible de colonisation des extrémités racinaires ————— p.77
- Figure 20.** Morphologie et colonisation de l'extrémité racinaire de la lignée A17, inoculée par le mutant *avrA* ————— p.78
- Figure 21.** Illustration du phénomène de divisions cellulaires autour des vaisseaux conducteurs ————— p.79
- Figure 22.** Quantification bactérienne par dosage enzymatique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase suite à l'inoculation sur racine intacte des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000 et les mutants *avrA*, *gala7* et *avrA-gala7* ————— p.80
- Figure 23.** Colonisation bactérienne des lignées A17 et F83005.5 après inoculation sur racines coupées ————— p.81
- Figure 24.** Quantification bactérienne par dosage enzymatique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase suite à l'inoculation sur racines coupées des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000 et les mutants *avrA* et *gala7* ————— p.82
- Figure 25.** Viabilité de l'extrémité racinaire 3 jpi par la souche GMI1000 ou par de l'eau, sur la lignée A17 prétraitée 24h avant inoculation par de l'AVG et sur le mutant *skI* — p.83
- Figure 26.** Autofluorescence et colonisation bactérienne de la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000 ————— p.85
- Figure 27.** Dosage de production d' $H_2O_2$  par émission de chimioluminescence ————— p.87
- Figure 28.** Analyse de la présence de  $O_2^-$  par coloration au NBT 7jpi par la souche GMI1000 ou par l'eau de la lignée A17 et F83005.5 ————— p.88
- Figure 29.** Coupes longitudinales de la lignée A17, inoculée par les mutants *gala7*, *avrA*, *gala7-avrA*, *hrcS*, la souche GMI1000 et de l'eau ————— p.89
- Figure 30.** Illustration des zones de prélèvement pour les coupes transversales ————— p.90

**Figure 31.** Morphologie et autofluorescence de l'extrémité racinaire de la lignée A17 en coupes transversales 7 jpi par le mutant *hrcS* ————— p.93

**Figure 32.** Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus, suite à une inoculation sur racine intacte ————— p.94

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Exemples de voies d'entrée de bactéries pathogènes ————— p.26

**Tableau 2.** Viabilité épidermique des extrémités racinaires suite à l'inoculation de la souche GMI1000 sur différentes espèces hôtes et non-hôtes de *R. solanacearum* ————— p.70

**Tableau 3.** Viabilité épidermique des extrémités racinaires suite à l'inoculation par différentes souches de *R. solanacearum* sur A17 et F83005.5 ————— p.71

**Tableau 4.** Analyse des modifications cellulaires observées en coupe transversale, induites au cours de l'infection des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000: lignification de l'endoderme, autofluorescence pariétale ou au niveau du contenu cellulaire et divisions autour du cylindre central ————— p.86

**Tableau 5.** Analyse des modifications cellulaires observées en coupe transversale, induites au cours de l'infection des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000 et les mutants *avrA*, *gala7* et *hrp-* : lignification de l'endoderme, autofluorescence pariétale ou au niveau du contenu cellulaire et divisions autour du cylindre central ————— p.91

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## I. Introduction générale

Dans leurs milieux, les plantes sont soumises à de nombreuses attaques d'agents pathogènes (champignons, virus, bactéries...) et ont élaboré des mécanismes d'adaptation et de régulation afin de survivre. Au cours de l'interaction pathogène, en fonction de la rapidité de détection de l'attaque et des moyens de défense mis en place, l'interaction aboutira ou non au développement de la maladie. La plante qui succombe à l'attaque est dite sensible et l'agent pathogène virulent, la relation est qualifiée de compatible. La plante qui survit est dite résistante et l'agent pathogène avirulent, la relation est qualifiée d'incompatible. Malgré la grande diversité des micro-organismes, une faible fraction des interactions entre plantes et agents pathogènes conduit au développement de la maladie. La présence de barrières physico-chimiques préformées comme la cuticule, les parois, la production constitutive de composés antimicrobiens constituent un premier élément empêchant le micro-organisme de pénétrer dans les organes de la plante ou dans ses cellules (Garcia-Brugger et al., 2006). L'élément central de la défense des plantes est l'induction de son système immunitaire suite à la détection spécifique ou non d'un envahisseur. Il sera détaillé §II.

Parmi les agents pathogènes responsables de pertes économiques importantes, les bactéries sont des organismes dont le contrôle est très difficile. La spécificité des bactéries pathogènes des plantes et en particulier leurs mécanismes de pénétration seront décrits §III. Parmi ces bactéries, *Ralstonia solanacearum* est un modèle d'étude important car elle est responsable de pertes économiques conséquentes en causant des dégâts sur de nombreuses espèces dans le monde entier. Sa biologie et ses mécanismes de virulence seront étudiés et en particulier la mise en place de l'appareil de sécrétion de type III (§IV-VI). Cette seringue lui permet d'injecter, à l'intérieur de la cellule hôte, des protéines effectrices impliquées dans la virulence de la bactérie. La variété des rôles, fonctions et localisations de ces effecteurs bactériens de type III sera illustrée §VII.

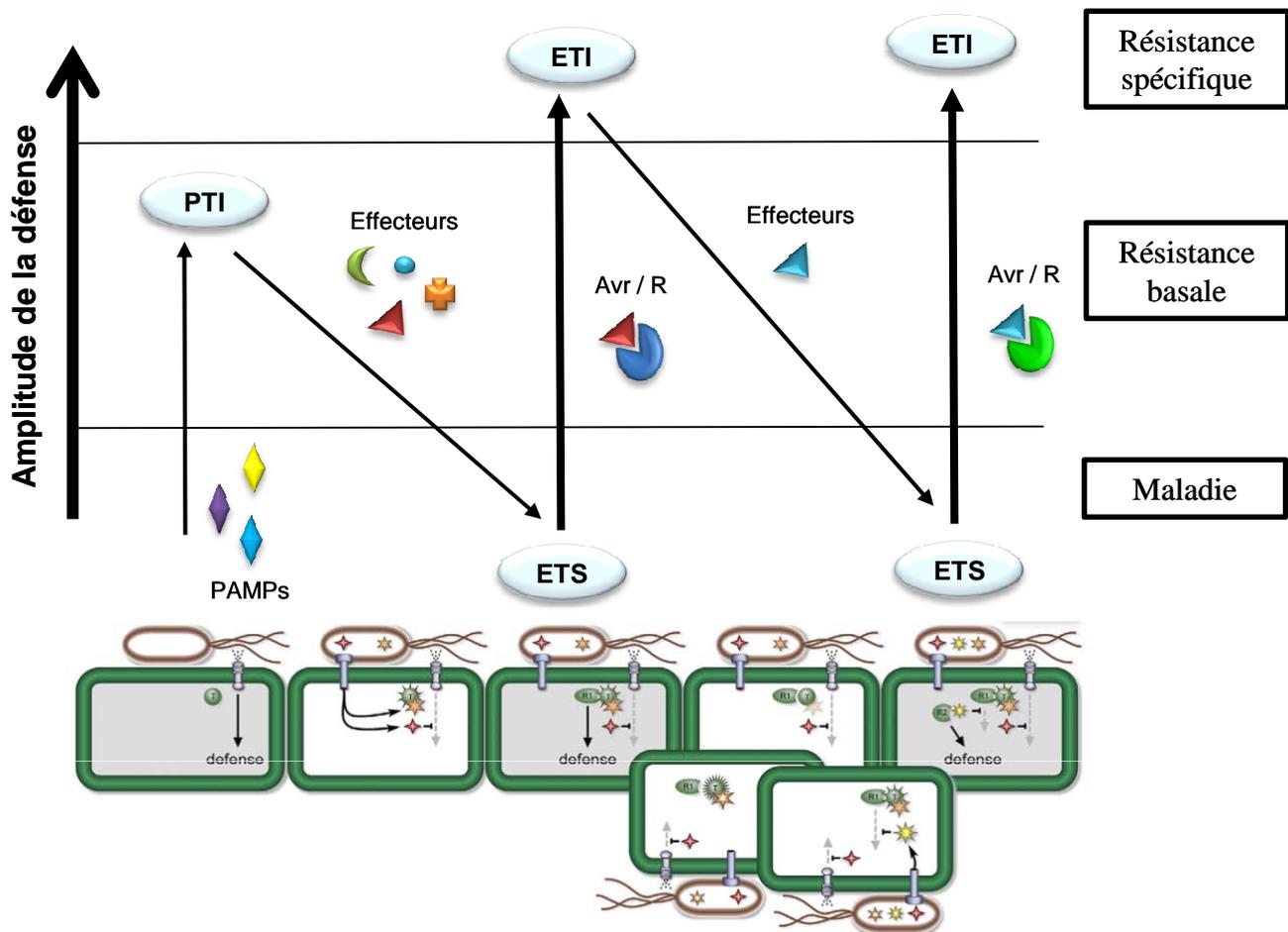
La majorité des dégâts causés par *R. solanacearum* implique la famille des Solanacées. La Tomate (*Solanum lycopersicum*) a donc largement servi comme modèle

d'étude pour le déroulement de cette maladie. L'étude de la plante modèle *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) a également permis de faire progresser les connaissances des mécanismes d'infection bactériens et de défense végétale au cours de cette interaction. Cependant, une problématique majeure ne pouvait pas progresser avec l'utilisation de ces plantes modèles : l'induction éventuelle de mécanismes de défense mis en place au cours d'une interaction symbiotique. Un pathosystème avec la légumineuse modèle *Medicago truncatula* a donc été mis en place et sera présenté dans cette introduction (§VIII).

## **II. Le système immunitaire des plantes**

Tel qu'il est décrit à l'heure actuelle, le système immunitaire des plantes se base sur la détection de l'agent pathogène comme étant du « non-soi » ou du « soi altéré » (Sanabria et al., 2008). La vitesse de détection est fondamentale dans la résistance des plantes car une détection trop lente est souvent responsable de la sensibilité de l'hôte (Jones et Dangl, 2006). Les molécules capables d'induire les réactions de défense des plantes sont des éliciteurs. En théorie, toute molécule produite par un agent pathogène peut-être un éliciteur (Nimchuk et al., 2003). Ils peuvent être endogènes (dérivés de la plante) ou exogènes (molécules issues du micro-organisme) et interagissent avec des récepteurs particuliers (Garcia-Brugger et al., 2006).

La coévolution des agents pathogènes et de leurs hôtes a conduit à une adaptation incessante de la part des deux partenaires. D'un côté les plantes doivent détecter l'agent pathogène et déjouer ses mécanismes de virulence ; de l'autre, les agents pathogènes doivent déjouer le système immunitaire des plantes et se propager au sein de l'hôte. L'étude de ce phénomène a permis de distinguer plusieurs types de résistance. D'un côté, des mécanismes de résistance basés sur la reconnaissance plus ou moins spécifique de l'agent pathogène par la plante ont été décrits et organisés selon un modèle dit en zig-zag (Jones et Dangl, 2006; Bent et Mackey, 2007)(Figure 1). D'un autre côté, des mécanismes de résistance quantitatifs gouvernés par des Quantitative Trait Loci (QTL) ont été mis en évidence. Dans tous les cas, une résistance efficace implique des processus de régulation complexes avec une transduction de signal éliciteur qui aboutit à la mise en place de mécanismes de défense.



**Figure 1. Modèle en Zig-zag qui illustre le système immunitaire des plantes (d'après Jones et Dangl 2006; Ma et Guttman 2008 )**

**En phase 1**, la plante détecte l'agent pathogène via des Microbial/Pathogen-Associated Molecular Pattern (M/PAMPs, losanges) via les Pattern Recognition Receptors (PRRs), ce qui entraîne alors la PAMP-Triggered Immunity (PTI), il y a un niveau de résistance basal. **En phase 2**, les agents pathogènes victorieux délivrent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI, permettent leur nutrition ou leur dispersion. Il en résulte ainsi une Effector-Triggered Susceptibility (ETS), il y a un développement de la maladie. **En phase 3**, un effecteur (triangle rouge) est reconnu par une protéine de résistance (bleu), activant alors une Effector-Triggered Immunity (ETI), version amplifiée de la PTI qui permet souvent de dépasser le seuil d'induction de la HR. La résistance est spécifique. **En phase 4**, des isolats de l'agent pathogène ayant perdu ou modifié l'effecteur rouge et/ou acquis des effecteurs (bleu) permettant de supprimer l'ETI sont sélectionnés, il y a à nouveau le développement de la maladie (ETS). **En phase 5**, de nouvelles protéines de résistance (vert) pourront alors reconnaître les nouveaux effecteurs (bleu), entraînant alors à nouveau l'induction de l'ETI.

## A. Le modèle en zig-zag

### 1) La PAMP Triggered Immunity (PTI)

La présence des bactéries est d'abord trahie par la présence de Pathogen ou Microbe Associated Molecular Patterns (PAMP ou MAMP) comme la flagelline, les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes ou les facteurs d'élongation TU. Ces molécules de surface communes à de nombreux agents pathogènes sont reconnues par des Patterns Recognition Receptors (PRRs) (Van der Hoorn et Kamoun, 2008). Ces récepteurs incluent des Récepteurs-Like Kinases (RLK), des Récepteurs-Like Protéines (RLP), ou des protéines de surface (Staal et Dixelus, 2009). Ce premier système de surveillance et de mise en place de défense est appelé PAMP Triggered Immunity (PTI). Cela correspond à ce qui était précédemment appelé résistance basale et résistance non hôte (de Wit, 2007; Ryan et al., 2007; Sanabria et al., 2008). Plusieurs interactions ont pu être établies entre des PAMPs d'agents pathogènes et leurs récepteurs et montrent des schémas de régulation complexes. Parmi les exemples décrits dans la littérature, on peut citer l'interaction entre Flg22, un PAMP de *Pseudomonas syringae* et FLS2 (Flagellin-sensitive 2), son récepteur chez d'Arabidopsis. Quand il est appliqué sur des plantules d'Arabidopsis, Flg22 est capable d'induire la formation de callose et l'expression de gènes de défense (*PDF1.2*, *PR-1* et *PR-5*) (Gomez-Gomez et al., 1999). FLS2 est un récepteur leucine-rich repeat dont la présence est nécessaire pour que Flg22 puisse induire les mécanismes de défense chez Arabidopsis (Kim et al., 2005). Des expériences d'immunoprécipitation ont montré l'interaction physique spécifique entre les deux partenaires (Chinchilla et al., 2006). Récemment, des avancées ont été faites dans la compréhension de la signalisation intracellulaire induite par FLS2. BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1), un récepteur-like kinase comprenant des Leucine Rich Repeats (LRR) qui a été décrit comme régulateur du récepteur de brassinostéroïde BRI1 formerait un complexe avec FLS2 et serait impliqué dans la signalisation intracellulaire induite par l'interaction Flg22/FLS2 (Chinchilla et al., 2007).

### 2) L'Effector Triggered Susceptibility (ETS)

Suite à ce premier niveau de défense, les micro-organismes se sont adaptés et ont mis en place des facteurs de virulence ou effecteurs qui peuvent le supprimer. En parallèle, des protéines de virulence permettant la multiplication et la colonisation de la bactérie

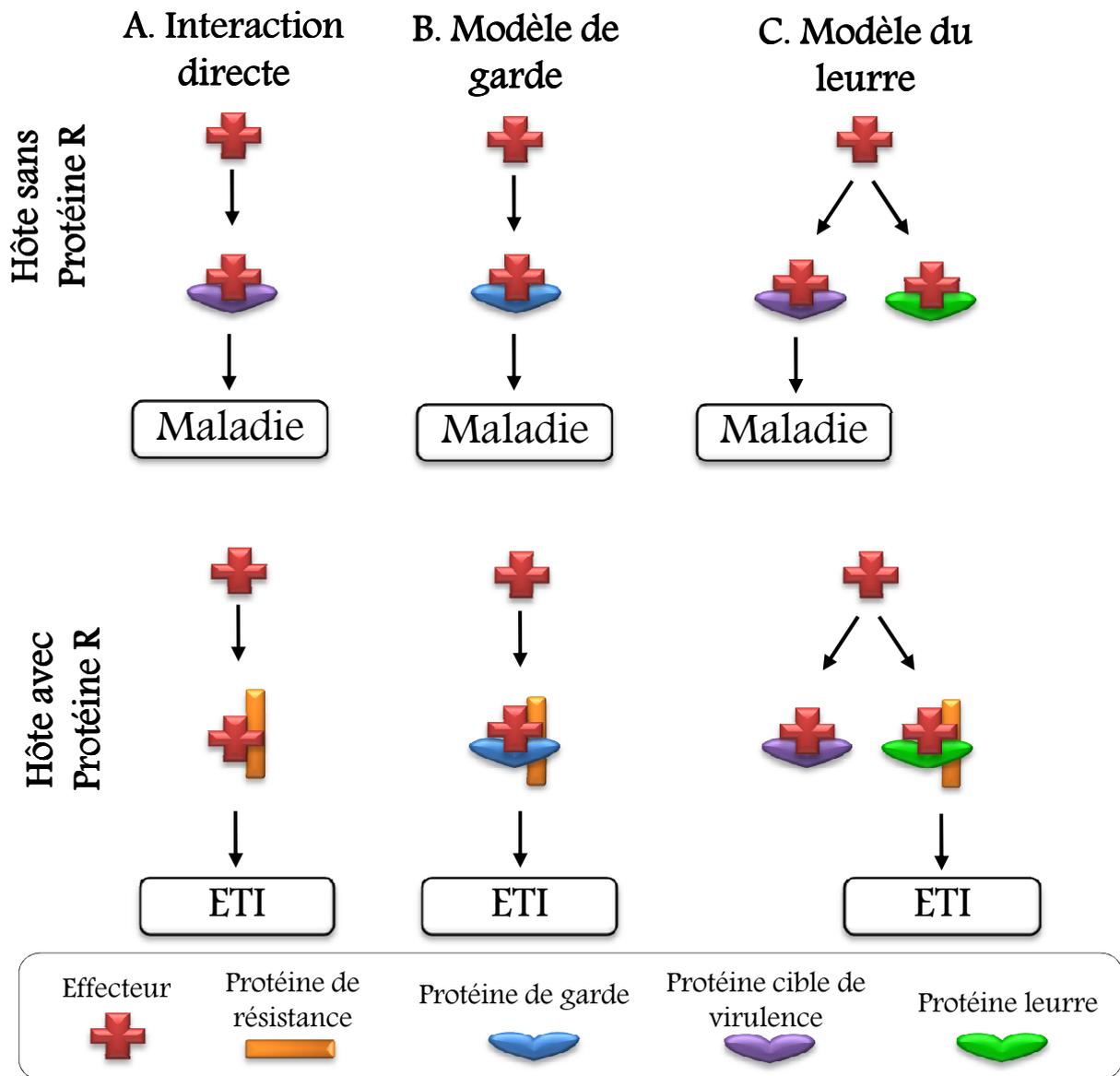
seront sélectionnées. Les plantes peuvent alors devenir sensibles, on parlera d'Effector Triggered Susceptibility (ETS). Ces effecteurs sont de natures variées et peuvent par exemple être directement injectés dans la cellule hôte par des systèmes de sécrétion bactériens. AvrPto de *P. syringae* est un effecteur délivré par l'appareil de sécrétion de type III (SST3) capable de se lier à FLS2 pour bloquer l'induction du système immunitaire, quand il est exprimé dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. Des souches mutées pour cet effecteur ne sont plus capables d'induire la maladie chez les plantes possédant FLS2. D'un autre côté, chez le mutant d'*Arabidopsis fls2*, la souche mutée pour *avrpto* et le sauvage se développent de la même manière. Ces données montrent qu'AvrPto est capable d'induire la maladie en surmontant la défense induite par FLS2 (Zong et al., 2008). Les protéines de virulence impliquées dans la suppression du système immunitaire, la multiplication bactérienne ou le développement des symptômes seront détaillées §VII-C.

### **3) L'Effector Triggered Immunity (ETI)**

En réponse à cette contre-attaque, les plantes ont mis en place des récepteurs spécialisés qui permettent de détecter ces effecteurs et d'activer une défense plus efficace, l'Effector Triggered Immunity (ETI). Ce mécanisme implique une reconnaissance spécifique entre une protéine de l'agent pathogène dite d'avirulence (Avr) et une protéine végétale dite de résistance (R). Plusieurs modèles ont été décrits pour définir la nature de l'interaction, directe ou indirecte, entre la protéine R et la protéine Avr.

#### **➤ Les protéines actrices**

**Les protéines d'avirulence** : Elles sont présentes chez tous les micro-organismes pathogènes étudiés : virus, champignons, bactéries. Certaines protéines Avr possèdent des séquences consensus d'adressage vers des compartiments cellulaires particuliers : membrane cytoplasmique ou divers organites cellulaires. La destruction de ces motifs d'adressage annihile la fonction d'avirulence. D'une espèce à l'autre, les protéines Avr sont en général des protéines hydrophiles solubles. Cependant, elles ne présentent pas de similitudes de séquences et sont de natures diverses. Dans le cas de certaines bactéries gram-dotées d'un SST3 (*Erwinia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.* et *Ralstonia sp.*), les protéines Avr sont directement injectées dans la cellule de la plante (Block et al., 2008).



**Figure 2. Représentation schématique des différents modèles d'interaction entre protéines de résistance et effecteurs (D'après Van der Hooft et Kamoun 2008).**

**A. Interaction directe :** L'effecteur déclenche la maladie en se liant avec sa protéine cible en l'absence de la protéine de résistance (R). En présence de la protéine R, la résistance est activée. **B. Modèle de garde :** L'effecteur est détecté par une protéine de garde qui entraîne le déclenchement de la maladie en l'absence de la protéine R. En présence de la protéine R, la modification de la protéine de garde par son interaction avec l'effecteur est détectée par la protéine R qui déclenche la résistance. **C. Modèle du leurre :** L'effecteur va se lier avec une cible de virulence ou une cible leurre. L'interaction avec la cible de virulence déclenche la maladie en l'absence de protéine R. La cible leurre ne déclenche pas la maladie en absence de protéine R mais permet le déclenchement de la résistance en présence de la protéine R.

**Les protéines de résistance** : Côté plante à l'heure actuelle, plus d'une quarantaine de gènes R a été identifiée chez différentes espèces. Contrairement à la diversité des gènes d'avirulence bactériens, la comparaison de structure des gènes R clonés révèle la présence de domaines protéiques très conservés, impliqués dans la reconnaissance et la transduction des signaux (Sanabria et al., 2008; Staal et Dixel, 2009). L'existence de ces motifs a permis de répartir les gènes R en huit classes. La majorité des gènes contient un site de nucléotide-binding (NB) et un domaine LRR avec des variations de leurs domaines N-terminal. Ces variations peuvent être des domaines en coiled-coil (CC) ou toll-interleukin-1 (TIR). Plus rarement, on trouve des protéines sérine/thréonine kinases ou des protéines extracellulaires LRR avec un domaine transmembranaire unique et une petite extrémité C-terminale ou un domaine kinase (Hammond-Kosack et Parker, 2003). La PTI est considérée comme une forme ancienne d'immunité et implique une reconnaissance par des récepteurs de surface. En revanche, l'ETI est plus intracellulaire avec l'action des protéines R. L'analyse de la structure de ces deux types de récepteurs semble indiquer que les protéines R auraient évolué à partir des PRRs (Zhou et Chai, 2008).

### ➤ L'interaction R/Avr (Figure 2)

**Interaction directe R/Avr** : Cette défense induite correspond à l'interaction « gène pour gène » décrite par Flor (Flor, 1971) entre les produits des gènes Avr et les produits des gènes R. Cette reconnaissance spécifique induit la mise en place de l'ETI uniquement chez l'hôte possédant le gène R correspondant au gène Avr. Ce modèle a d'abord été présenté comme un modèle de type « récepteur-ligand » dans lequel les produits des gènes R seraient les récepteurs spécifiques des produits des gènes Avr, impliquant alors une interaction physique entre les deux protéines (Keen, 1990). Parmi les interactions directes observées, on peut citer l'interaction entre Pi-ta et AVR-Pita(176) au cours de l'interaction entre le Riz (*Oryza sativa*) et l'agent de la pyriculariose *Magnaporthe grisea* (Jia et al., 2000) et l'interaction entre RRS1-R d'Arabidopsis avec le gène d'avirulence PopP2 de *R. solanacearum* (Deslandes et al., 2003). L'interaction directe R/Avr est cependant limitée à quelques interactions et les mécanismes sous-jacents de perception sont sujets à débat depuis des années. En effet, au niveau évolutif, ce modèle rend la plante fragilisée par des mutations rapides des effecteurs, qui tromperaient aisément la reconnaissance de la protéine

R (Van der Hoorn et Kamoun, 2008). Deux autres modèles plus complexes ont été développés, le modèle de garde et le modèle du leurre.

**Modèle de garde** : Dans le modèle de garde, des mécanismes permettant à la plante de reconnaître les modifications d'une protéine cible suite à l'interaction avec l'effecteur de l'agent pathogène ont été sélectionnés. Cette reconnaissance déclencherait les mécanismes de défense. Ce modèle a d'abord été proposé pour expliquer les mécanismes de résistance impliqués dans l'interaction entre la protéine de résistance ser/thr kinase Pto de la Tomate et l'effecteur AvrPto de *P. syringae*. La formation de ce complexe serait ainsi reconnue par la protéine NB-LRR Prf, qui activerait la mise en place de la défense (Van der Biezen et Jones, 1998). Dans ce modèle, Pto est un constituant général de la défense des plantes qui pourrait être la cible de nombreux effecteurs bactériens. Le modèle de garde donne donc une explication au relativement faible nombre de protéines de résistance en comparaison avec la multitude d'effecteurs identifiés à ce jour (Dangl et Jones, 2001).

**Modèle du leurre**. Le modèle de garde tel qu'il a été décrit implique que les protéines de garde sont indispensables à la fonction de virulence des effecteurs en absence de protéine R. Plusieurs exemples de reconnaissances indirectes montrent cependant que certains effecteurs ont des cibles végétales multiples et que les protéines de garde ne sont pas toujours nécessaires à la mise en place de la virulence chez les plantes dépourvues de la protéine R. Il a donc été suggéré que ces protéines serviraient de leurre pour détecter les effecteurs des agents pathogènes via les protéines R. Au niveau évolutif, les cibles d'effecteurs sont sujettes à des forces opposées : éviter la manipulation par les effecteurs (interaction faible) et améliorer la perception de ces derniers (interaction forte). La duplication des cibles d'effecteurs ou l'évolution indépendante d'une cible leurre pourrait libérer en partie les contraintes évolutives et résulterait en un système d'utilisation de leurres qui seraient uniquement impliqués dans la perception des effecteurs par la protéine R et non dans l'induction de la maladie (Van der Hoorn et Kamoun, 2008).

Un exemple qui supporte l'hypothèse de modèle du leurre est le cas de la protéine végétale RCR3 (Shabab et al., 2008). L'interaction entre la protéine effectrice Avr2 du champignon pathogène *Cladosporium fulvum* et la protéine R CF-2 de la Tomate déclenche l'induction de mécanismes de défense. Au cours de la mise en place de cette défense, deux cystéine protéases, RCR3 et PIP1, sont induites. Avr2 intervient dans les phases précoces de

l'interaction en inhibant ces protéines. Ces deux protéines semblent cependant avoir des rôles différents au cours de l'interaction. La protéine RCR3 s'accumule moins fortement que PIP1 au cours de l'infection et ne joue pas de rôle dans la mise en place de la virulence de l'agent pathogène. En effet, des mutants *rcr3* ont une sensibilité équivalente à des plantes dépourvues du gène R *Cf-2*. En revanche, PIP1 semble nécessaire pour la mise en place de la maladie. Il semble donc que PIP1 soit une cible opérationnelle d'Avr2 et que RCR3 soit un leurre piégeant le champignon, qui est alors reconnu chez les plantes portant le gène *Cf-2*.

#### **4) L'évitement de L'ETI**

Nous avons vu comment la plante peut réussir à déjouer l'action d'effecteurs microbiens afin de mettre en place une défense plus efficace par une détection plus spécifique. L'agent pathogène peut cependant échapper à la mise en place de l'ETI par différentes stratégies (Ma et Guttman, 2008). Il pourra tout d'abord éliminer ou modifier les facteurs de virulence en cause pour qu'ils ne soient plus reconnus, tout en conservant leurs fonctions de virulence. Il pourra également supprimer l'ETI grâce à l'intervention d'autres effecteurs qui perturberont les voies de défense mises en place afin qu'elles ne puissent pas aboutir.

L'identification d'effecteurs capables d'inhiber la mise en place de la réaction hypersensible (HR) a permis d'illustrer cette étape (Zhou et Chai, 2008). Par exemple, HopPsyA est un effecteur de *P. syringae* capable d'induire une HR chez le Tabac (*Nicotiana tabacum*) et Arabidopsis. Afin d'évaluer la capacité d'autres effecteurs à supprimer cette HR, un système expérimental a été mis en place. Une souche de *Pseudomonas fluorescens* transformée avec le cosmide pHIR11 permettant l'expression de l'effecteur HopPsyA induit la formation d'une HR sur les deux hôtes. La mise en place ou non d'une HR suite à l'expression d'effecteurs individuels dans cette souche permet alors d'estimer leurs éventuelles capacités à interférer avec ce processus. Sur les 19 effecteurs testés, 5 ont été capables de supprimer l'induction de la HR sur Tabac et Arabidopsis, AvrPphE<sub>pto</sub>, AvrPpiB<sub>1pto</sub>, AvrPtoB, HopPtoE et HopPtoF. Sur Tabac, tous à l'exception de AvrPpiB<sub>1pto</sub> induisaient également une réduction de l'expression de PR1a. Ces résultats montrent bien la capacité de certains effecteurs à interférer avec la mise en place de l'ETI (Jamir et al., 2004).

## B. La résistance quantitative

Alors que la résistance spécifique s'exprime en tout ou rien (résistance/sensibilité), la résistance partielle ou quantitative se manifeste par des modulations dans la cinétique et l'intensité du développement de la maladie. La cartographie génétique de QTL par utilisation de marqueurs moléculaires est une méthode répandue et efficace pour l'étude des mécanismes complexes et souvent polygéniques sous-jacents dans ce type de résistance (Young, 1996). Les nombreux exemples dans la littérature montrent que la résistance quantitative est un mécanisme répandu dans les interactions plantes-agents pathogènes, deux exemples récents seront illustrés ici.

L'étude de la résistance de *Medicago truncatula* à l'antracnose (*Colletotrichum trifolii*) et au mildiou (*Erysiphe pisi*) a révélé l'implication de plusieurs QTLs (Ameline-Torregrosa et al., 2008). La lignée A17 est résistante et développe une HR suite à l'inoculation par les deux agents pathogènes, alors que les lignées F83005.5 et DZA315.16 sont respectivement sensibles à l'antracnose et au mildiou. L'analyse phénotypique de Recombinant Inbred Line (RILs) F7 a révélé que la résistance à l'antracnose semblait être gouvernée par un QTL majeur sur le chromosome 4, *Ct1*. En revanche, la résistance au mildiou semble impliquer plusieurs QTLs distincts en fonction des isolats testés. Face à l'isolat *Ep-a*, deux QTLs identifiés sur le chromosome 5, *Epa1* et *Epa2*, expliquent respectivement 26 et 23% de la résistance. Un QTL majeur situé sur le chromosome 4, *Epp1*, semble être impliqué dans la résistance face à l'isolat *Ep-p* et explique approximativement 66% du phénotype. *Ct1* et *Epp1*, bien que situés dans la même région, sont clairement distincts. Bien que les analyses *in silico* aient révélé la présence de gènes LRRs dans cette région, on ne connaît pas encore le ou les gènes directement impliqués dans ces résistances.

La pourriture du collet est provoquée par *Fusarium* sp., elle cause de nombreux dégâts sur les céréales et notamment sur l'Orge (*Hordeum vulgare*). L'étude du croisement de deux lignées TX9425 et Franklin, respectivement résistante et sensible aux 54 cultivars testés, a permis de mettre en évidence la présence d'un QTL majeur impliqué dans la résistance à *Fusarium* sp. Ce dernier, nommé *Qcrs.cpi-3H* et situé sur le bras long du chromosome 3H, explique 63.3% du phénotype (Li et al., 2009). La lignée résistante était plus petite que la sensible et le QTL impliqué dans la résistance était co-localisé avec un QTL impliqué dans la taille des plantes. Il semble pourtant possible qu'il n'y ait pas de lien entre

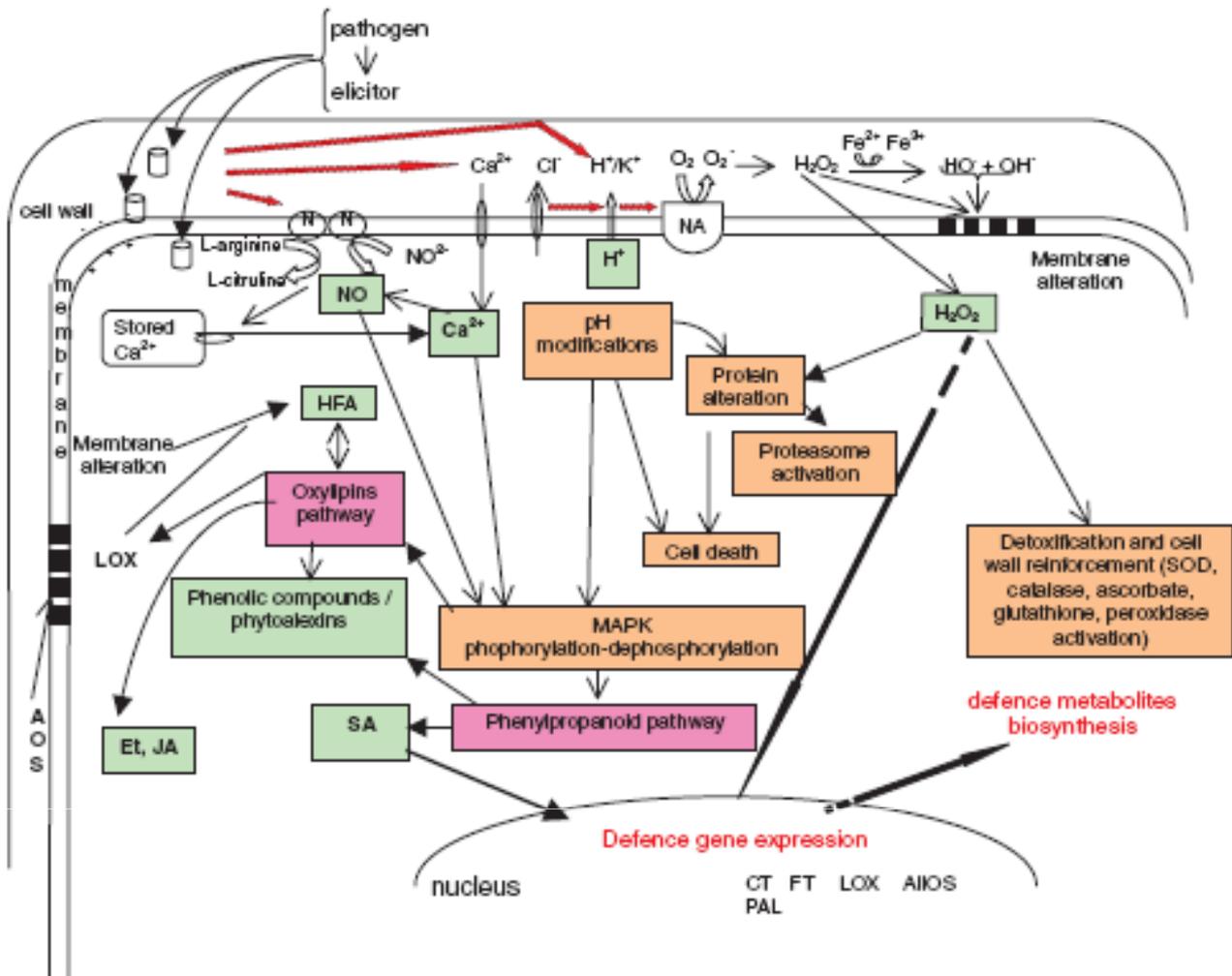


Figure 3. Schéma représentatif des réactions de défense induites lors d'une interaction entre une plante et un agent pathogène (Desender et al., 2007).

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante déclenche la production de molécules signal (boîtes vertes), qui vont soit activer des voies biochimiques spécifiques (boîtes roses) ou directement affecter le métabolisme cellulaire (boîtes oranges).

les deux phénotypes. En effet, des études précédentes sur le blé avaient également établi une co-localisation de QTLs gouvernant la résistance à *Fusarium sp.* et la taille de la plante, mais la lignée sensible était plus petite que la résistante (Wallwork et al., 2004).

## C. La transduction du signal éliciteur

Quelque soit la nature de l'éliciteur, la détection de l'agent pathogène va induire une cascade de signalisation permettant la mise en place des défenses. Malgré la diversité des éliciteurs, on retrouve des mécanismes intracellulaires communs conduisant à la mise en place de la résistance (Garcia-Brugger et al., 2006). La PTI et l'ETI partagent les mêmes voies de signalisation pour la mise en place de mécanismes de défense. L'ETI semble être une forme accélérée et plus intense de PTI (Jones et Dangl, 2006; Ryan et al., 2007; Ma et Guttman, 2008).

### 1) Les étapes précoces (Figure 3)

Après la perception du signal éliciteur, les récepteurs de plante vont alors pouvoir activer leurs effecteurs : canaux ioniques, protéines kinases, guanosine-5'-triphosphate (GTP) binding protein ou protéines G, qui vont à leur tour transférer le signal à des seconds messagers (adénosine monophosphate (AMP) cyclique, inositol triphosphate (IP3)...). La cascade d'évènements s'organise alors comme suit : phosphorylations et déphosphorylations réversibles des protéines membranaires et cytosoliques (GTP binding protein ou protéines G), pic de calcium cytosolique, dépolarisation membranaire, efflux de K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>/influx de H<sup>+</sup> résultant en une alcalinisation extracellulaire et acidification cytoplasmique, activation de Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), production d'oxydes d'azote (NO), activation de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase (NADPH) oxidase et production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) induisant notamment une peroxydation des lipides membranaires (Zhao et al., 2005; Desender et al., 2007). Cette oxydation des lipides est un mécanisme qui permet la génération de signaux cellulaires mais il semble que ces molécules réactives puissent également se lier à des protéines et les dégrader (Mueller et al., 2008).

Ces événements se déroulent de quelques minutes à quelques heures après infection. D'un éliciteur à l'autre, on retrouvera une combinaison plus ou moins partielle de ces événements, qui peuvent différer dans leurs cinétiques et leurs intensités. Ces étapes

assurent l'amplification et la spécificité du signal et vont entraîner la production d'éthylène (ET), de jasmonate (JA) et d'acide salicylique (SA), qui permettront ensuite la mise en place de défenses appropriées (Garcia-Brugger et al., 2006).

## **2) La signalisation hormonale : les voies SA, JA et ET**

La transduction du signal éliciteur est un réseau complexe faisant intervenir des composants multiples. Parmi les différentes étapes, l'intervention des hormones est centrale. Si la majorité des hormones est reconnue à ce jour pour intervenir dans le système immunitaire des plantes, ET, JA et SA sont les principales décrites et étudiées (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Spoel et Dong, 2008; Bari et Jones, 2009; Leon-Reyes et al., 2009).

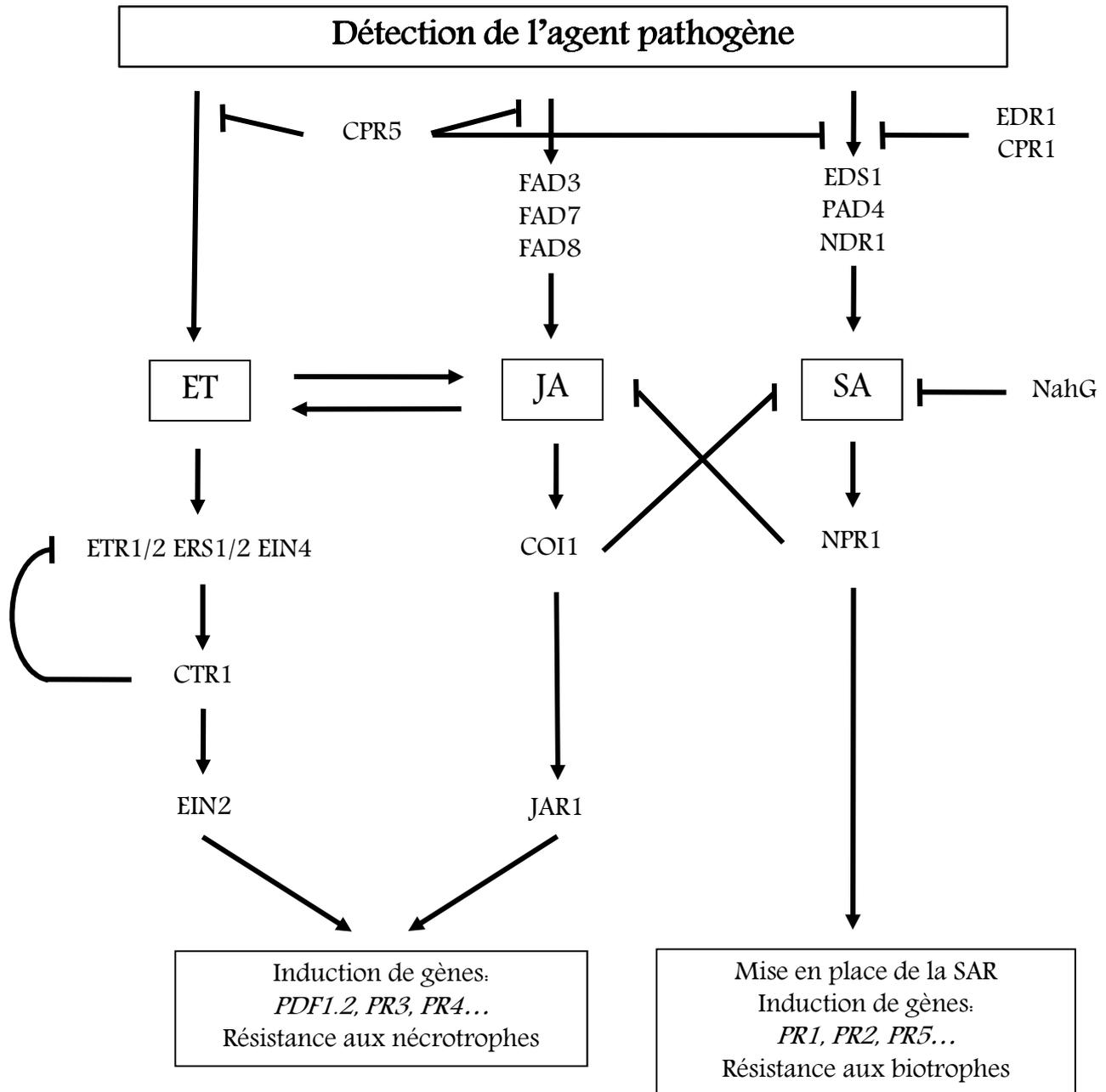
**L'acide salicylique** : SA joue un rôle clé dans la défense vis-à-vis d'agents pathogènes. C'est un dérivé d'acide phénolique qui s'accumule au point d'infection et dans les tissus adjacents. Il est requis pour l'activation des réponses de défense au niveau local comme *PR1* et va permettre la mise en place d'une résistance systémique acquise (SAR), qui confère une résistance plus importante lors d'une infection ultérieure par une grande variété d'agents pathogènes (Grant et Jones, 2009). De nombreux exemples dans la littérature illustrent l'importance de cette molécule et de la voie de signalisation qu'elle induit afin de permettre la mise en place de la défense. Halim *et al.* (2007) ont étudié le déroulement de la maladie chez un mutant transgénique de Pomme de terre (*Solanum tuberosum*) incapable d'accumuler le SA (*nahG*), suite à une inoculation par *Phytophthora tuberosum*. Il n'y a pas de différence dans la taille des lésions formées, mais une croissance de l'agent pathogène bien plus importante chez le mutant que chez le sauvage (Halim et al., 2007). Une autre étude a été faite sur des mutants d'*Arabidopsis* déficients en acide salicylique (*sid2-1*, *pad4-1* et *nahG*) ou inhibés dans sa voie de signalisation (*npr1*), infectés par le nématode à kyste *Heterodera schachtii*. Les résultats révèlent une sensibilité accrue de tous les mutants en comparaison avec le sauvage (Wubben et al., 2008). L'effet systémique du SA sur la résistance a également été illustré puisqu'un traitement par la molécule au niveau des racines de Tomate entraîne, au niveau foliaire, une réduction du nombre et de la taille des lésions induites par *Alternaria solani* (Spletzer et Enyedi, 1999).

**L'acide jasmonique** : C'est une molécule signal dérivée d'acide gras qui est impliquée dans divers aspects de la biologie de la plante comme le développement des

graines ou la défense face à des stress biotiques ou abiotiques. Son intervention dans la défense des plantes a été largement illustrée, elle est notamment nécessaire pour l'induction de gènes de défense comme *PDF1.2*, *PR3* ou *PR4* (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Grant et Jones, 2009). Récemment, l'étude de la signalisation induite par JA a permis l'identification d'une Leucine aminopeptidase A (LapA) de la Tomate. Cette enzyme interviendrait dans la mise en place de la défense induite par JA contre l'herbivore *Manduca sexta* (Fowler et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, AtPLAI a été identifiée comme étant une hydrolase impliquée dans la production de JA. Cette enzyme serait nécessaire à la mise en place de la défense vis à vis de *Botrytis cinerea* (Yang et al., 2007).

**L'éthylène** : Cette hormone végétale a un rôle pléiotrope sur différents aspects de la biologie et du développement de la plante. Elle intervient dans divers mécanismes de maturation, de mort cellulaire, d'élongation racinaire ou de défense vis-à-vis de stress biotique ou abiotique (Alonso et Stepanova, 2004). Au cours d'une interaction pathogène, son intervention va notamment permettre l'activation de gènes de défense comme *PDF1.2*, *PR3* ou *PR4* (Kunkel et Brooks, 2002). Chez *Arabidopsis*, un traitement par l'éliciteur Flg22 induit l'expression de gènes de défense et un dépôt de callose, suite à sa perception par FLS2. Ces réponses sont abolies chez des mutants de perception (*etr1*) ou de transduction (*ein2*) d'ET. La voie ET est donc requise pour des réponses de défense basale induites par Flg22 (Clay et al., 2009). Durant l'interaction entre le champignon *B. cinerea* et son hôte *Nicotiana benthamiana*, l'inhibition de la voie ET a entraîné une augmentation du développement de la maladie. Dans ce cas, son rôle dans la défense pourrait aussi être lié à un effet direct sur l'agent pathogène. En effet, ET affecte l'expression de gènes fongiques *in planta* et inhibe la croissance du mycelium *in vitro* (Chague et al., 2006).

L'implication d'ET dans les interactions pathogènes est complexe et sujette à controverse car il contribue à la résistance dans certaines interactions mais va promouvoir la maladie dans d'autres (Kunkel et Brooks, 2002). On peut notamment citer le mutant de transduction d'ET *ein2* d'*Arabidopsis*, qui a une sensibilité accrue envers *B. cinerea* (Thomma et al., 1999), un développement plus important de la maladie après une infection par *P. syringae* ou *Xanthomonas campestris* (Bent et al., 1992) mais des symptômes retardés avec *R. solanacearum* (Hirsch et al., 2002). Un autre exemple du rôle de l'ET dans la sensibilité est l'étude du mutant de Tomate incapable de percevoir l'ET, *never ripe*. En effet, ce mutant a des symptômes réduits en comparaison avec le sauvage suite à l'inoculation par



**Figure 4. Représentation simplifiée des voies de régulation SA/JA/ET dans la mise en place de la défense** (d'après Kunkel et al., 2002, Broeckeaert et al., 2006 et Spoel et al., 2003). Suite à la détection de l'agent pathogène, deux voies principales sont décrites, ET/JA et SA qui ont principalement des régulations croisées négatives. La voie ET/JA semble impliquée dans la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes et la voie SA vis-à-vis des agents pathogènes biotrophes. L'activation de ces voies permet la mise en place de mécanismes de défense et l'activation de gènes particuliers en fonction des voies induites.

deux bactéries pathogènes, *X. campestris* pv *vesicatoria* et *P. syringae* pv *tomato* et un champignon pathogène *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* (Lund et al., 1998).

### ➤ Interaction entre les voies hormonales (Figure 4)

L'interaction entre les voies de signalisation induites par ces hormones forme un réseau complexe de régulation, principalement étudié dans la cadre de la mise en place de la HR détaillée §D. Il semble qu'il y ait deux voies principales de signalisation dans la défense des plantes, une voie dépendante du SA et une voie qui implique JA et ET. JA seul serait impliqué dans la réponse aux blessures et aux herbivores. En interaction avec ET, il permettrait à la plante de se défendre contre les agents pathogènes nécrotrophes. La voie SA serait impliquée dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Grant et Jones, 2009).

La collaboration entre les voies JA et ET dans la mise en place de la défense a notamment été mise en évidence par la régulation des mêmes gènes de défense comme PR-3, PR-4 et PDF1.2 (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998). Le facteur de transcription à domaine APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) ORA59 semble être un intégrateur essentiel des voies de transduction ET et JA, notamment pour l'induction du gène de défense *PDF1.2* (Pre et al., 2008).

Une régulation négative de la voie JA sur la voie SA et réciproquement a notamment été montrée par l'étude de mutants d'*Arabidopsis* ne pouvant pas accumuler de SA (*eds4* et *pad4*) et dont l'expression de gènes JA-dépendants était augmentée (Gupta et al., 2000). Il semble que l'inhibition de la voie SA sur la voie JA se fasse par l'intermédiaire de *NPR1*. Cette hypothèse est illustrée notamment par l'inhibition de l'expression de *PDF1.2* par la voie SA de manière *NPR1* dépendante (Spoel et al., 2003; Leon-Reyes et al., 2009). Réciproquement, une étude sur le Tabac montre que JA inhibe l'expression de gènes PR SA-dépendants (Niki et al., 1998). Il semble que l'inhibition de la voie SA par la voie JA soit dépendante de *COI1* (Kloek et al., 2001). Il semblerait que l'antagonisme entre voies SA et ET/JA puisse être utilisé par des agents pathogènes à leurs avantages. Par exemple, la toxine coronatine de *P. syringae* est connue pour induire sa fonction de virulence en activant la voie JA de l'hôte. Cette induction entraîne une inhibition de la voie de défense SA propice au développement de la maladie (Brooks et al., 2005). Les plantes malades ont d'ailleurs souvent des phénotypes correspondants à des déséquilibres hormonaux comme la galle du

collet induite par *Agrobacterium tumefaciens* ou les balais de sorcière induits par *Taphrina* sp, suggérant que ces voies sont une cible privilégiée des agents pathogènes (Grant et Jones, 2009).

Cependant de nombreuses études montrent que la régulation entre ces voies hormonales ne peut se résumer à un antagonisme SA et JA/ET. Un travail récent sur la Pomme de terre montre une collaboration entre voies JA et SA pour l'induction d'une défense efficace. Pep-13 est un PAMP de *Phytophthora infestans* capable notamment d'induire l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'une réponse HR-like. Ces réponses nécessiteraient que les deux voies JA et SA soient fonctionnelles, il semble donc que dans ce contexte, SA et JA puissent agir dans la même voie de transduction (Halim et al., 2009). Une autre étude sur *Arabidopsis* montre que la défense contre *Sclerotinia sclerotiorum* nécessite l'induction des trois hormones pour être efficace (Guo et Stotz, 2007). Comme nous l'avons vu, *NPR1* a été décrit comme étant requis pour la régulation négative de l'expression de *PDF1.2* par la voie SA. Une étude récente montre que l'induction biotique par *Alternaria brassicola* ou abiotique de la voie ET peut restaurer l'inhibition de *PDF1.2* chez des mutants *npr1* de manière dépendante d'*EIN2*, ET peut donc avoir un effet négatif sur la voie JA. Les mécanismes qui soutendent ce processus ne sont pas encore éclaircis, ET pourrait agir en aval ou de manière redondante à *NPR1* (Leon-Reyes et al., 2009).

Ces résultats montrent la complexité des réseaux mis en place afin d'assurer une défense efficace adaptée. Une difficulté supplémentaire pour la plante dans la lutte contre les parasites se rajoute avec l'action de l'agent pathogène, qui va pouvoir se servir de la mise en place de ce réseau à son profit.

## **D. La mise en place de la défense**

L'induction des voies de signalisation décrites plus haut va permettre la mise en place de mécanismes de résistance efficaces grâce à l'activation de réactions de défense qui peuvent être de plusieurs natures. On assiste notamment à un renforcement des parois, la production d'antibiotiques et la synthèse de protéines pathogenesis-related (PR) qui peuvent être liés à une réaction HR dans le cadre de l'ETI (Garcia-Brugger et al., 2006).

## **1) La constitution de barrière pour limiter la pénétration de l'agent pathogène**

La résistance à la pénétration au niveau des parois est une composante clé de la défense basale. Le principal mécanisme élaboré par la plante dans ce but est le renforcement des parois cellulaires, afin de former une barrière physico-chimique contre l'agent pathogène. Cela peut tout d'abord se faire par un cross-linking des protéines pariétales induit par la production de ROS (Baker et Orlandi, 1995). L'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) est une réaction de défense décrite chez le Melon (*Cucumis melo*) en réponse à l'inoculation par *Colletotrichum lagenarium*, qui a ensuite été rencontrée dans de nombreux systèmes (Esquerre-Tugaye, 1979; Esquerre-Tugaye et al., 1979). L'induction simultanée de peroxydases pariétales permettrait de ponter les HRGPs entre elles ou avec d'autres constituants, entraînant ainsi un renforcement pariétal. Un autre mécanisme répandu de renforcement pariétal s'opère par des dépôts de composés spécifiques. Ces derniers peuvent être de nature polysaccharidique comme pour la callose, mais ils sont majoritairement phénoliques comme la lignine ou la subérine (Hoefle et Huckelhoven, 2008).

Dans le cadre de l'étude de l'interaction pathogène entre deux légumineuses, le Pois (*Pisum sativum*) et la Vesce (*Vicia faba*), confrontées à l'holoparasite angiosperme *Orobanche crenata*, il a été montré que chez les lignées résistantes, le parasite est arrêté dans sa progression avant de pouvoir atteindre le cylindre central. L'induction de callose et de peroxydase à ce niveau semble permettre de bloquer la colonisation du parasite chez le Pois (Perez-de-Luque et al., 2006). Chez la Vesce, des dépôts de callose au niveau des parois corticales et une lignification de l'endoderme semblent liés à la résistance (Pérez-de-Luque et al., 2007).

## **2) La synthèse des composés antimicrobiens**

La synthèse de composés antimicrobiens est une étape importante pour la mise en place d'une défense efficace. Elle s'illustre tout d'abord par l'induction des protéines PR dont il existe 17 familles. Elles sont réparties en fonction de leurs rôles et leurs séquences en acides aminés, sont intra ou extra-cellulaires et s'accumulent après une attaque par un agent pathogène ou un traitement par un éliciteur (Sels et al., 2008). Elles peuvent posséder

deux bactéries pathogènes, *X. campestris* pv *vesicatoria* et *P. syringae* pv *tomato* et un champignon pathogène *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* (Lund et al., 1998).

### ➤ Interaction entre les voies hormonales (Figure 4)

L'interaction entre les voies de signalisation induites par ces hormones forme un réseau complexe de régulation, principalement étudié dans la cadre de la mise en place de la HR détaillée §D. Il semble qu'il y ait deux voies principales de signalisation dans la défense des plantes, une voie dépendante du SA et une voie qui implique JA et ET. JA seul serait impliqué dans la réponse aux blessures et aux herbivores. En interaction avec ET, il permettrait à la plante de se défendre contre les agents pathogènes nécrotrophes. La voie SA serait impliquée dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Grant et Jones, 2009).

La collaboration entre les voies JA et ET dans la mise en place de la défense a notamment été mise en évidence par la régulation des mêmes gènes de défense comme PR-3, PR-4 et PDF1.2 (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998). Le facteur de transcription à domaine APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) ORA59 semble être un intégrateur essentiel des voies de transduction ET et JA, notamment pour l'induction du gène de défense *PDF1.2* (Pre et al., 2008).

Une régulation négative de la voie JA sur la voie SA et réciproquement a notamment été montrée par l'étude de mutants d'*Arabidopsis* ne pouvant pas accumuler de SA (*eds4* et *pad4*) et dont l'expression de gènes JA-dépendants était augmentée (Gupta et al., 2000). Il semble que l'inhibition de la voie SA sur la voie JA se fasse par l'intermédiaire de *NPRI*. Cette hypothèse est illustrée notamment par l'inhibition de l'expression de *PDF1.2* par la voie SA de manière *NPRI* dépendante (Spoel et al., 2003; Leon-Reyes et al., 2009). Réciproquement, une étude sur le Tabac montre que JA inhibe l'expression de gènes PR SA-dépendants (Niki et al., 1998). Il semble que l'inhibition de la voie SA par la voie JA soit dépendante de *COII* (Kloek et al., 2001). Il semblerait que l'antagonisme entre voies SA et ET/JA puisse être utilisé par des agents pathogènes à leurs avantages. Par exemple, la toxine coronatine de *P. syringae* est connue pour induire sa fonction de virulence en activant la voie JA de l'hôte. Cette induction entraîne une inhibition de la voie de défense SA propice au développement de la maladie (Brooks et al., 2005). Les plantes malades ont d'ailleurs souvent des phénotypes correspondants à des déséquilibres hormonaux comme la galle du

collet induite par *Agrobacterium tumefaciens* ou les balais de sorcière induits par *Taphrina* sp, suggérant que ces voies sont une cible privilégiée des agents pathogènes (Grant et Jones, 2009).

Cependant de nombreuses études montrent que la régulation entre ces voies hormonales ne peut se résumer à un antagonisme SA et JA/ET. Un travail récent sur la Pomme de terre montre une collaboration entre voies JA et SA pour l'induction d'une défense efficace. Pep-13 est un PAMP de *Phytophthora infestans* capable notamment d'induire l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'une réponse HR-like. Ces réponses nécessiteraient que les deux voies JA et SA soient fonctionnelles, il semble donc que dans ce contexte, SA et JA puissent agir dans la même voie de transduction (Halim et al., 2009). Une autre étude sur *Arabidopsis* montre que la défense contre *Sclerotinia sclerotiorum* nécessite l'induction des trois hormones pour être efficace (Guo et Stotz, 2007). Comme nous l'avons vu, *NPR1* a été décrit comme étant requis pour la régulation négative de l'expression de *PDF1.2* par la voie SA. Une étude récente montre que l'induction biotique par *Alternaria brassicola* ou abiotique de la voie ET peut restaurer l'inhibition de *PDF1.2* chez des mutants *npr1* de manière dépendante d'*EIN2*, ET peut donc avoir un effet négatif sur la voie JA. Les mécanismes qui soutendent ce processus ne sont pas encore éclaircis, ET pourrait agir en aval ou de manière redondante à *NPR1* (Leon-Reyes et al., 2009).

Ces résultats montrent la complexité des réseaux mis en place afin d'assurer une défense efficace adaptée. Une difficulté supplémentaire pour la plante dans la lutte contre les parasites se rajoute avec l'action de l'agent pathogène, qui va pouvoir se servir de la mise en place de ce réseau à son profit.

## **D. La mise en place de la défense**

L'induction des voies de signalisation décrites plus haut va permettre la mise en place de mécanismes de résistance efficaces grâce à l'activation de réactions de défense qui peuvent être de plusieurs natures. On assiste notamment à un renforcement des parois, la production d'antibiotiques et la synthèse de protéines pathogenesis-related (PR) qui peuvent être liés à une réaction HR dans le cadre de l'ETI (Garcia-Brugger et al., 2006).

des activités antimicrobiennes en dégradant la paroi des champignons ou des bactéries par leurs activités chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) (Legrand et al., 1987; Ponstein et al., 1994; Brunner et al., 1998) ou glucanases (PR-2) (Kauffmann et al., 1987). La classe PR-12 est constituée des défensines, qui inhibent la croissance fongique en perméabilisant leurs membranes (Thevissen et al., 1999). D'autres, bien qu'ayant un rôle établi dans la défense des plantes, ont des fonctions qui restent inconnues à ce jour, PR-1 (Alexander et al., 1993) ou PR-17 (Okushima et al., 2000).

Parmi les composés antimicrobiens, il y a également des métabolites secondaires lipophiles de faibles poids moléculaires, les phytoalexines, qui s'accumulent rapidement au site d'infection (Hammerschmidt, 1999; Dixon et al., 2002). Les exemples décrits sont des dérivés de la voie des phenylpropanoïdes : flavonoïdes, isoflavonoïdes, sesquiterpènes... leurs natures et nombres varient en fonction de l'hôte. On retrouve notamment la camalexine chez *Arabidopsis* (Thomma et al., 1999), la pisatine chez le Pois (Perrin et Bottomley, 1961) ou la médicarpine chez *Medicago* sp. (Ingham, 1982; Deavours et Dixon, 2005). La résistance de la Luzerne (*Medicago sativa*) vis-à-vis du nématode *Pratylenchus penetrans* serait liée à une induction plus importante de plusieurs enzymes de la voie des phenylpropanoïdes dont l'isoflavone réductase, enzyme clé de la biosynthèse de médicarpine (Baldrige et al., 1998). Les phytoalexines se retrouvent également dans les matrices de callose, permettant une résistance mécanique et chimique au niveau pariétal (Hardham et al., 2007). Une induction rapide et intense de la voie des phenylpropanoïdes est une étape clé de la résistance dans de nombreux systèmes puisque cette voie est liée non seulement à la synthèse de phytoalexines, mais également de lignine et de SA que nous avons vu précédemment (Loake et al., 1991; Dixon et al., 1996; Dixon et al., 2002; Costa et al., 2003; Shadle et al., 2003).

Les ROS, déjà décrits pour leurs rôles dans la transduction précoce du signal éliciteur ou le renforcement pariétal, ont également une action toxique directe sur le micro-organisme. L'action des NADPH oxydases et des peroxydases entraîne de la génération d' $O_2^-$  et d' $H_2O_2$  aux niveaux cytoplasmique et pariétal. La réaction de Haber-Weiss entraîne la formation du radical le plus toxique, OH $\cdot$ , à partir de  $H_2O_2$  et de Fer (Baker et Orlandi, 1995).

### 3) La HR

Dans le cadre d'une interaction R/Avr directe ou non, cette reconnaissance spécifique peut aboutir à la mise en place d'un mécanisme de résistance appelé HR, en plus des autres événements décrits précédemment. C'est une réaction de défense locale caractérisée par un mécanisme de mort cellulaire programmée au point de pénétration de l'agent pathogène. Elle entraîne la formation d'une nécrose se développant rapidement autour de l'agent pathogène, limitant ainsi sa propagation (Jones et Dangl, 2006). Elle n'est pas un moyen de défense contre les agents pathogènes nécrotrophes, qui semblent se ravir au contraire d'être cernés par des cellules mortes (Spoel et Dong, 2008). La HR est un phénomène complexe s'accompagnant de nombreuses modifications physiologiques et biochimiques avec notamment la production de ROS et des perturbations de la perméabilité cellulaire. La mort cellulaire sert de signal déclenchant la synthèse d'éthylène, de phytoalexines et de SA (Staal et Dixel, 2009).

## III. Les bactéries pathogènes de plante

### A. Généralités

Les bactéries phytopathogènes sont responsables de pertes économiques et agronomiques importantes dans le monde entier. A présent, on reconnaît environ 350 bactéries, provoquant des maladies sur les végétaux appartenant à 21 genres différents. Les symptômes induits sont variés. Il s'agit principalement de nécroses (dessèchement localisé des tissus), de flétrissement, de pourritures dues aux sécrétions d'enzymes pectinolytiques détruisant les ciments pectiques qui donnent leur cohésion aux tissus végétaux, de tumeurs ou de modifications hyperplasiques. Ces dernières sont dues à des déséquilibres de phytohormones, qui peuvent être induits directement ou non par les bactéries. C'est à partir de ces bases que sont définis les trois grands types de comportements pathogènes des bactéries: nécrogènes (ex. *Erwinia amylovora*), macérogènes (ex. *Pectobacterium carotovorum*) ou oncogènes (ex. *A. tumefaciens*) (Paulin et al., 2001).

Les bactéries pathogènes de plante ont sélectionné au cours de l'évolution des outils adaptés à leurs stratégies d'infection puis d'invasion des tissus végétaux vivants, afin d'y

trouver leurs moyens de subsistance. Beaucoup d'entre elles ont la faculté de pouvoir vivre ou survivre dans le milieu naturel comme le sol ou l'eau (*A. tumefaciens*, *R. solanacearum*) ou en association avec leur hôte, sans processus infectieux déclaré. Cette phase peut-être épiphyte, comme avec les *Pseudomonas sp.* et certains *Xanthomonas sp.* ou endophyte, comme avec *Agrobacterium sp.* ou *Clavibacter xyli cynodontis* (Paulin et al., 2001). Pour beaucoup d'espèces bactériennes phytopathogènes (*Erwinia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Ralstonia sp.*, *Xanthomonas sp.*...), la compatibilité agent pathogène–plante s'établit à la suite de la sécrétion de protéines par le SST3. Elle est généralement suivie par la mort cellulaire végétale et la multiplication des bactéries dans l'apoplaste. Les symptômes qui apparaissent ensuite dépendent des métabolites bactériens mis en jeu (Paulin et al., 2001).

Le contrôle des bactérioses est difficile, notamment à cause de la grande adaptabilité conférée par la détention et le transfert de plasmides (Vivader et Lambrecht, 2004). Ce sont des séquences extrachromosomales d'ADN capables de répllication autonome dont la possession est quasi-exclusive des bactéries. L'acquisition de plasmide se fait généralement par transfert horizontal (conjugaison, transformation ou transduction). Leur contenu en gènes est dynamique et ils peuvent éventuellement s'insérer à l'ADN chromosomique pour être maintenus de manière stable par la bactérie. Ils permettent une flexibilité génomique qui contribue fortement aux capacités d'adaptation, d'évolution et au pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes (Vivian et al., 2001). On peut citer notamment l'importance du plasmide Ti dans le pouvoir pathogène d'*A. tumefaciens*, largement exploité en biotechnologie végétale (Zhu et al., 2000). Chez *P. syringae*, la famille des plasmides pPT23A regroupe des gènes codant pour des facteurs de virulence comme des effecteurs de type III, la production d'hormones ou la biosynthèse de la toxine coronatine (Sundin, 2007). Chez *R. solanacearum*, c'est un mégaplasmide qui porte les gènes permettant l'établissement et la fonctionnalité du SST3, déterminant pour son pouvoir pathogène (Genin et Boucher, 2004).

## **B. Les mécanismes de pénétration**

L'infection efficace d'un agent pathogène implique son déplacement vers la plante hôte, son attachement à sa surface, sa pénétration puis sa prolifération au sein des tissus végétaux. Les bactéries ne possèdent pas de structures spécialisées permettant la pénétration au sein de l'hôte comme l'appressorium des champignons ou l'haustorium des plantes

**Tableau 1. Exemples de voies d'entrée de bactéries phytopathogènes (D'après Huang et al., 1986, Corbaz et al., 1990).**

Bactérie	Tissus hôte	Voie de pénétration
<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	Tige de Tabac	blessure
<i>Corynebacterium michiganense</i>	Feuille de Tomate	trichome
<i>Erwinia amylovora</i>	Poirier	nectaire
<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	Tubercule de Pomme de terre	lenticelle
<i>Erwinia Chrysanthemi</i> pv. <i>Dieffenbachia</i>	Racine de <i>Dieffenbachia</i>	racine latérale
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Feuille de Laitue	stomate, trichome
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Feuille de Tomate	stomate, trichome
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Feuille de Concombre	stomate
<i>R. solanacearum</i>	Racine de Tomate	racine latérale
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	Feuille de Riz	hydathodes
<i>Xanthomonas campestris</i>	Feuille de Pommier	stomate

parasites. Cette étape est limitante pour la propagation des bactéries au sein des tissus végétaux car ses points d'entrée sont limités (Tableau 1) (Huang, 1986; Corbaz, 1990) :

**Ouvertures naturelles** : La plante possède des ouvertures naturelles physiologiques liées aux échanges gazeux (stomate ou lenticelle) ou à des organes de sécrétion (hydathode, nectaire). Ces portes d'entrée sont un lieu privilégié de pénétration bactérienne car elles sont très peu protégées, même si certaines plantes semblent avoir évolué dans ce sens. En effet, des études ont relié une résistance plus importante de *Citrus nobilis* à *X. campestris* à la présence d'une arête à l'entrée des stomates (Huang, 1986).

Des études plus récentes ont confirmé l'importance des stomates dans la pénétration des bactéries pathogènes et dans la défense des plantes. La régulation de l'ouverture des stomates se fait naturellement en fonction de différents stimuli environnementaux comme la lumière, l'humidité ou le taux de CO<sub>2</sub>. L'agent central de cette régulation est l'hormone acide abscissique (ABA). Ces portes d'entrée sont privilégiées des bactéries pathogènes foliaires mais la plante ne subit pas passivement leurs franchissements. La régulation de l'ouverture des stomates peut jouer un rôle actif dans la défense des plantes en limitant l'entrée de l'agent pathogène. Il a été montré qu'une fermeture des stomates était induite chez *Arabidopsis* par la présence de bactéries ou de PAMP purifiés et que cette régulation faisait intervenir la voie de signalisation des PAMP, le SA et l'ABA (Melotto et al., 2006; Underwood et al., 2007; Melotto et al., 2008).

Des agents pathogènes comme *P. syringae* DC3000 sont capables de contre-attaquer cette voie de défense en utilisant des facteurs de virulence comme la coronatine pour induire une ouverture des stomates (Melotto et al., 2008). *X. campestris* est également capable de renverser ce mécanisme de défense grâce à un cluster de gène *rpf* / DSF (diffusible signal factor) qui contrôle la synthèse d'un facteur important pour le pouvoir pathogène de la bactérie. Il semblerait que ce facteur ait des similitudes avec la coronatine précédemment citée. En effet, des extraits de *X. campestris* sont capables de restaurer la capacité infectieuse de mutants de *P. syringae* déficients pour la synthèse de coronatine (Gudesblat et al., 2009).

**Blessures** : Les blessures permettent la pénétration de la bactérie dans les tissus de la plante et les vaisseaux conducteurs, avant que les mécanismes de cicatrisation aient pu obstruer ces ouvertures (Huang, 1986). Les blessures peuvent être physiologiques (zone

d'émergence des racines secondaires) ou accidentelles. Parmi ces dernières, la cassure des trichomes, structures fragiles présentes en grand nombre à la surface des feuilles, est un point privilégié d'entrée et de prolifération bactérienne. La base des trichomes serait une niche écologique favorable aux bactéries en condition de sécheresse notamment. Elles s'y multiplieraient abondamment, entraînant une détérioration des tissus et créant ainsi une zone d'ouverture rendant accessible l'intérieur de la plante. Les causes de blessures accidentelles sont nombreuses, on peut citer en particulier les intempéries entraînant des ruptures d'organes ou les outillages qui peuvent blesser les racines. Les bactéries peuvent également se servir des portes d'entrée créées par d'autres parasites comme des insectes ou des nématodes.

**Franchissement de surfaces intactes** : C'est une opportunité rare chez les bactéries pathogènes. Nieves (Nieves-Brun, 1985) a mis en évidence la possibilité pour *Erwinia chrysanthemi* de pénétrer naturellement des racines intactes de *Dieffenbachia maculata* mais ces résultats sont remis en question par certains, le protocole d'inoculation ne semblant pas garantir l'intégrité des racines (Huang, 1986). En revanche, une étude de Loria (2003) montre la capacité de *Streptomyces scabies*, une bactérie filamenteuse, à pénétrer son hôte directement à travers l'épiderme de tubercule de Pomme de terre (Loria et al., 2003).

**Spécificité des bactéries pathogènes racinaires** (Loria et al., 2003) : Les bactéries sont présentes en abondance dans le sol et particulièrement au niveau de la rhizosphère. Cependant, en faisant l'inventaire des bactéries phytopathogènes, un constat est flagrant : celles pénétrant l'hôte par les racines sont rares. *Clavibacter michiganensis* et *R. solanacearum* entrent par les racines et induisent des symptômes au niveau foliaire. *Erwinia carotovora* attaque les racines des cultures mais est avant tout un agent pathogène après-récolte. *Rhizobium radiobacter* et *vitis* peuvent infecter des racines blessées mais ne sont pas spécialistes de cet organe. Le genre *Streptomyces sp.* fait partie des exceptions. Il semblerait que la toxine que de nombreuses espèces de ce genre produisent, la thaxtomine, aide à la pénétration des tissus végétaux en inhibant le développement de la paroi primaire.

Les zones d'ouvertures racinaires permettant l'infection des bactéries pathogènes sont plus limitées qu'au niveau foliaire. Certes, l'action de nématodes ou insectes ravageurs par exemple favorise la pénétration des bactéries, mais les blessures naturelles se résument à



Figure 5. Illustration des symptômes de flétrissement causés par *R. solanacearum* sur différents hôtes.

A. Bananier B. Tomate C. Géranium D. Poivron

l'émergence des racines latérales et les lenticelles. Il semblerait que la rareté des bactéries pathogènes racinaires soit liée aux faibles opportunités de pénétration dans cet organe (Loria et al., 2003).

#### IV. *R. solanacearum*, bactérie phytopathogène racinaire

##### A. Biologie et répartition de *R. solanacearum*

*R. solanacearum* (précédemment *Pseudomonas solanacearum*) est une bactérie phytopathogène du sol responsable du flétrissement bactérien. Cette bactérie, d'abord rencontrée dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées chaudes, s'étend désormais dans des régions plus tempérées d'Europe ou d'Amérique du nord. Depuis 1989, la propagation de la pourriture brune de la Pomme de terre causée par une souche de race 3 biovar 2 se propage en Europe, 9/15 pays de la communauté européenne, dont la France, sont touchés (Allen et al., 2005). *R. solanacearum* a plus de 200 espèces hôtes réparties à l'intérieur d'au moins 50 familles (Figure 5) (dont les Solanacées, les légumineuses...), comprenant aussi bien des monocotylédones que des dicotylédones, des plantes annuelles ou des ligneux. La différenciation entre espèces hôtes ou non-hôtes se fait sur la colonisation ou non des vaisseaux conducteurs. Les espèces sont dites tolérantes quand on retrouve de manière ponctuelle et restreinte des bactéries dans le xylème (Alvarez et al., 2008). Parmi les espèces hôtes, certaines ont une importance agronomique majeure comme la Tomate, le Manioc (*Manihot esculenta*) ou l'Arachide (*Arachis hypogea*), faisant de *R. solanacearum* une des bactéries phytopathogène les plus dévastatrices au monde (Genin et Boucher, 2004).

Son cycle infectieux passe généralement par un stade de survie en saprophyte dans le sol ou dans l'eau qui peut se prolonger pendant plusieurs années. Elle peut alors se nourrir de la matière organique des débris végétaux ou dans la rhizosphère de plantes adventices. Elle peut également constituer des réservoirs de population dans les tissus d'espèces adventices ou non-hôtes comme l'Orge, le Maïs (*Zea mays*) ou d'organes végétaux porteurs d'infections latentes comme les tubercules de Pomme de terre (Hayward, 1991; Alvarez et al., 2008). En présence d'une variété sensible d'une espèce hôte, elle va pouvoir démarrer le processus de colonisation par les racines, profitant de blessures (nématodes, outils agricoles...) ou d'ouvertures naturelles (émergence des racines secondaires,

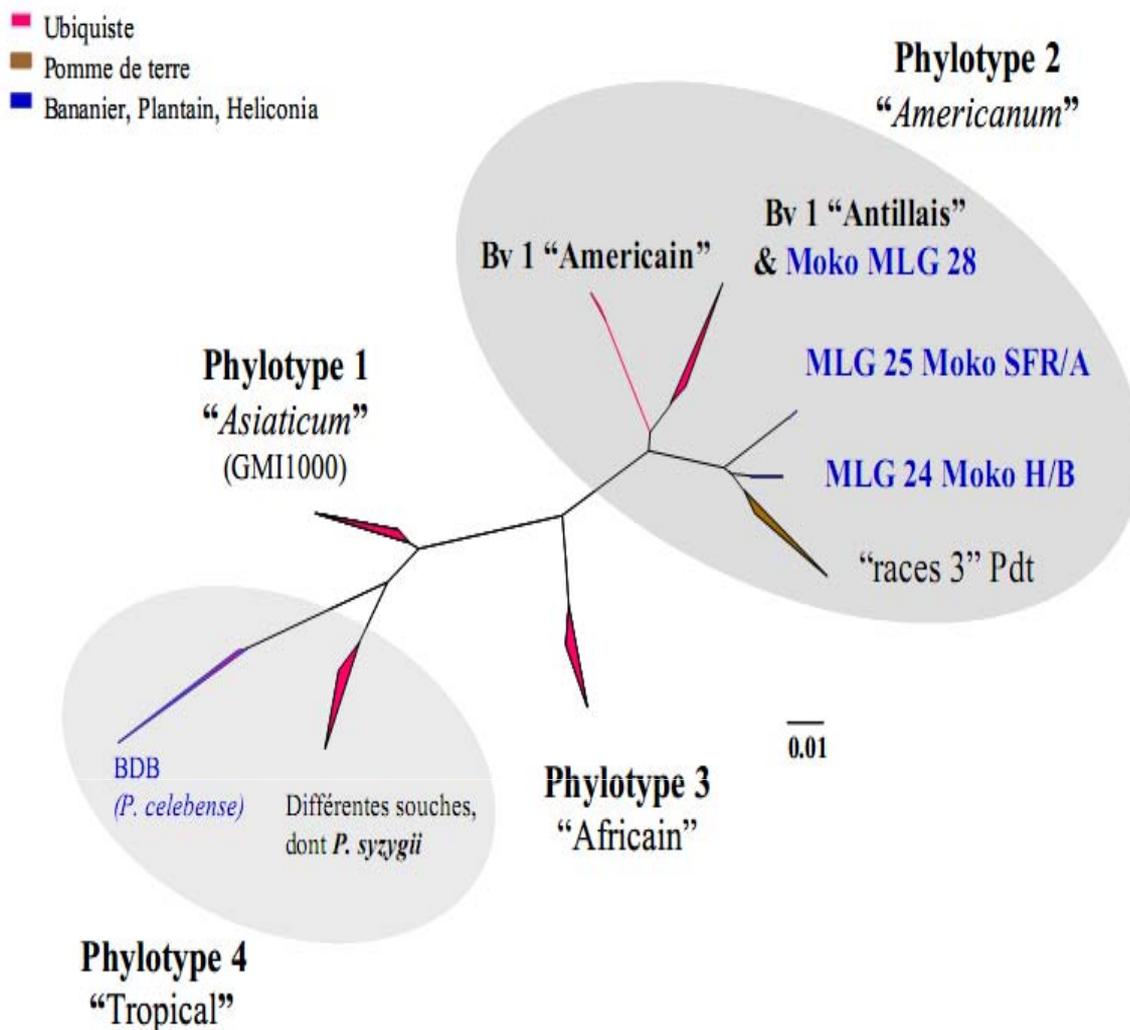


Figure 6. Diversité génétique et relations phylogénétiques entre les différentes souches du complexe d'espèce *R. solanacearum* (Prior et al., 2003).

Arbre établi sur la base du polymorphisme de séquence du gène de l'endoglucanase. Il existe quatre phylotypes répartis en quatre zones géographiques: *Asiaticum*, *Americanum*, Africain et Tropical.

lenticelles) pour pénétrer son hôte. Chez le Pétunia (*Petunia hybrida*), des laterals root structures (LRS) induites de manière SST3 dépendante peuvent être des sites privilégiés de multiplication et de colonisation bactérienne. Cependant, il ne semble pas y avoir de lien avec la colonisation vasculaire de la bactérie. Cette structure jouerait donc sûrement plus un rôle dans la phase saprophyte de la bactérie (Zolobowska et Van Gijsegem, 2006). Une fois l'hôte pénétré, les bactéries se propagent alors du cortex jusqu'au xylème où elles se multiplient et synthétisent des exopolysaccharides (EPS). Cela entraînera alors l'obstruction des vaisseaux conducteurs et la sève de la plante ne peut plus circuler. Son système aérien va alors jaunir de manière asymétrique puis flétrir, les tissus gorgés de bactéries vont exsuder des gouttelettes bactériennes (oozes) et la plante va finir par mourir.

L'étude de son mode d'infection et de son cycle infectieux amène à se poser la question du mode de vie de *R. solanacearum*. Elle est parfois considérée comme biotrophe avec une phase nécrotrophe ou comme nécrotrophe (Lepoivre, 2003; Van Loon et al., 2006). En effet, il semblerait que les premières phases de l'infection consistent en la dégradation des cellules corticales et du parenchyme vasculaire afin d'atteindre les vaisseaux du xylème, ce qui pourrait constituer une phase nécrotrophe. En revanche, une fois dans le xylème, la bactérie s'y multiplie en se nourrissant de la sève brute, ce qui pourrait constituer une phase biotrophe. Cependant, il a été mentionné que *R. solanacearum* survit dans les sols grâce à une phase saprophyte importante et l'évolution tend à faire disparaître cette phase chez les organismes biotrophes. De plus, le mode de vie biotrophe est souvent associé à un faible nombre d'hôtes, ce qui n'est pas le cas de *R. solanacearum* (Lepoivre, 2003). Il n'y a donc pas une réponse claire qui mette tout le monde d'accord sur le sujet.

## **B. La classification de *R. solanacearum***

*R. solanacearum* est une bactérie gram négative appartenant au groupe des  $\beta$ -protéobactéries regroupant d'autres bactéries pathogènes comme *Burkholderia sp.* C'est une espèce particulièrement hétérogène, état lié notamment à sa large gamme d'hôte et sa grande diversité géographique. Plusieurs modes de classification ont été mis en place, basés sur le spectre d'hôte (notion de race) ou les caractéristiques physiologiques ou métaboliques de la bactérie (notion de biovar). La plus récente et celle qui est maintenant utilisée se base sur ses caractéristiques génétiques : c'est la classification par phylotype qui distingue 4 régions géographiques d'origine des souches (Figure 6).

Cette classification a d'abord reposé sur l'étude de marqueurs Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Cook et al., 1989), qui a donné lieu à deux divisions majeures « asiaticum » et « americanum ». Des études plus récentes basées sur l'analyse du polymorphisme de séquence (acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S, Internal Transcribed Spacer (ITS) 16S-23S, gènes d'endoglucanase et de polygalacturonase) ont confirmé le bien fondé de ces deux divisions (Prior, 2003). Par la suite, l'analyse de marqueurs RFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) et de séquences 16s d'ARNr a permis d'ajouter une troisième division africaine (Poussier et al., 1999; Poussier et al., 2000). Une quatrième division tropicale ou indonésienne a ensuite été ajoutée suite à l'analyse de régions d'ITS, du gène d'endoglucanase *egl* et du gène *hrpB*. Une particularité de ce phylotype est qu'il contient d'autres espèces proches de *R. solanacearum* : *R. syzygii* et l'agent responsable de la « maladie du sang » du Bananier (Prior et Fegan, 2005; Wicker et al., 2007).

Une étude récente a permis d'identifier une liste de 2690 gènes communs présents dans les 17 souches testées et 2338 gènes variables. Le clustering hiérarchique des gènes variables est très cohérent avec cette classification (Guidot et al., 2007).

## **C. Les moyens de lutte**

Les pertes économiques varient en fonction de l'hôte, du climat, du type de sol etc. En Inde, le taux de mortalité des plants de Tomate infectés peut varier de 10 à 100%, avec une perte maximale quand les plantes sont infectées avant 60 jours et durant l'été. De nombreuses stratégies de lutte ont été développées à l'encontre de *R. solanacearum* mais leurs efficacités sont limitées et n'ont pas encore permis de réduire significativement son expansion et les pertes économiques engendrées par cette maladie.

**La lutte biologique** : Elle est basée sur la capacité d'un agent biologique à entrer en compétition avec un agent pathogène dans le but de limiter l'infection de ce dernier. Chez la Tomate, certaines souches avirulentes et productrices de bactériocine sont capables de réduire le flétrissement bactérien (Tsai et al., 1985). L'utilisation de souches de *R. solanacearum* avirulentes a permis d'observer une induction de la résistance chez l'Arachide (He et Kang, 1986). Les expérimentations en champ induisent un niveau de

protection limitée (Hayward, 1991) mais cette méthode reste prometteuse comme le montre une étude au Kenya sur la Pomme de terre (Smith et al., 2005).

**L'utilisation de produits chimiques (Saddler, 2005)**: Cette méthode a une efficacité limitée, notamment lié au fait que *R. solanacearum* est une bactérie tellurique colonisant ses hôtes au niveau racinaire et qu'elle a une grande capacité d'adaptation. De plus ces produits sont onéreux et nuisibles pour l'environnement.

**Les pratiques culturales** . L'utilisation de porte-greffes résistants ou la rotation des cultures avec des plantes non-hôtes se sont avérées efficaces. Au Pérou par exemple, l'alternance de la Pomme de terre avec le Maïs, non-hôte, a permis une réduction du développement de la maladie (Elphinstone et Aley, 1993).

**Le développement de cultivars résistants ou tolérants** : Cela reste le moyen de lutte le plus efficace à ce jour. Les nouvelles techniques de sélection et la découverte de sources de résistances permettent de progresser dans ce sens, comme on le voit notamment pour l'Arachide en Chine (Boshou, 2005; Boshou et al., 2005).

## **D. Les mécanismes de résistance à *R. solanacearum***

Jusqu'à présent, la résistance à *R. solanacearum* semble complexe et variable en fonction de l'interaction étudiée. Des études reportent des mécanismes d'interaction directe R/Avr et des résistances polygéniques et différentes voies de signalisation hormonale sont impliquées dans la mise en place de la défense. L'étude des bases génétiques de la résistance à *R. solanacearum* a été effectuée lors de son interaction avec trois hôtes, la Tomate, Arabidopsis et *M. truncatula*. Des études cytologiques sur la Tomate ont permis d'étudier la colonisation différentielle des bactéries chez des lignées sensibles et résistantes et d'observer des modifications pariétales semblant être impliquées dans le contrôle de la propagation bactérienne.

### **1) Bases génétiques de la résistance**

**Tomate** . La résistance de la Tomate à *R. solanacearum* semble être principalement polygénique et causée par différents locus en fonction des variétés des Tomates, des souches de *R. solanacearum* et des conditions environnementales (Hayward, 1991; Carmeille et al.,

2006). Par exemple, elle serait liée à un QTL majeur situé sur le chromosome 6 dans l'interaction entre le cultivar Hawaii 7996 et la souche Pss4 (Wang et al., 2000). Des études plus anciennes ont montré que la résistance pouvait aussi être monogénique dominante dans le cas d'une inoculation du cultivar Hawaii 7996 par la souche 8217 (Grimault et al., 1995).

**Arabidopsis** . L'étude de la lignée Nd-1 d'*Arabidopsis* a permis l'identification du premier gène de résistance à la souche GMI1000 de *R. solanacearum* cloné, *RRS1-R*. Des croisements entre les lignées Nd-1 (résistante) et Col-5 (sensible) ont montré que ce gène était récessif. Cependant, l'étude de plantes transgéniques pour ce gène montre qu'il se comporte comme un gène dominant. La résistance conférée par ce gène serait dépendante de la voie du SA (Deslandes et al., 1998; Deslandes et al., 2002; Deslandes et al., 2003). L'interaction entre *RRS1-R* et l'effecteur PopP2 est une des rares interactions R/Avr directe décrite (Deslandes et al., 2003). D'un autre côté, l'étude de la lignée résistante Col-0 en réponse à la souche 14.25 montre que la résistance serait polygénique et gouvernée par au moins trois locus qui expliquent 90% de la résistance, quantitative resistance to *R. solanacearum*1 (*QRS1*) et *QRS2* sur le chromosome 2 et *QRS3* sur le chromosome 5 (Godiard et al., 2003). Le gène *ERECTA* code pour un récepteur-like kinase à répétitions riches en leucines (LRR-RLK) et est connu pour jouer un rôle dans le développement des parties aériennes des plantes. Il se situe proche de *QRS1* et participerait à la résistance face à *R. solanacearum*. En effet, la transformation de la lignée sensible par ce gène lui confère une résistance accrue à la bactérie, montrant ainsi une interaction entre des voies régulant le développement et la défense des plantes (Godiard et al., 2003).

***M. truncatula***. La résistance de *M. truncatula* semble être polygénique. L'étude du flétrissement des parties aériennes de lignées recombinantes F7 issues du croisement entre les lignées F83005.5 et A17, a permis de mettre en évidence l'implication de 3 QTLs dans la résistance à *R. solanacearum* (Vailleau et al., 2007). L'étude de l'héritabilité de la résistance a révélé que plus de 75% de la variation phénotypique était due à des variations génétiques. Parmi les QTLs identifiés, un QTL majeur serait localisé sur le chromosome 5 et expliquerait 38,5% des variations phénotypiques. Les deux QTLs mineurs sont localisés sur les chromosomes 3 et 7 et expliqueraient respectivement 13,1 et 17,6% des variations phénotypiques observées.

## 2) Voies hormonales impliquées dans la mise en place de la défense

**Tomate**. Une étude protéomique sur la Tomate a été mise en place afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance. Neuf protéines ont été identifiées comme différentiellement induites entre les cultivars sensibles et résistants, dont une chaperonne et un antigène de membrane apicale qui sont régulés positivement chez le résistant. L'application de SA induit une accumulation de cette dernière. Cela suggère un rôle de l'antigène dans la résistance via l'induction de la voie SA (Afroz et al., 2009).

L'implication de SA dans la défense de la Tomate vis-à-vis de *R. solanacearum* a pu être également observée par l'analyse du silencing de *NPR1* chez une lignée résistante, incapable alors de transduire le signal SA. Le transformant présente une multiplication bactérienne plus importante qu'avec le sauvage et un plus grand nombre de plantes colonisées (Chen et al., 2009). Cette étude montre également une implication de la voie ET dans la défense des plantes. Un silencing de plusieurs gènes impliqués dans cette voie, *ACO1/3*, *ERF3* et *EIN2*, a été effectué chez la lignée résistante. Les transformants présentent une diminution de la résistance par rapport au sauvage, avec une multiplication bactérienne plus importante, même si ces mutants ne montraient pas de symptômes. Le gène *CTR1* étant un régulateur négatif de la voie ET, une mutation de *CTR1* entraîne une induction constitutive de la voie ET. Le silencing de ce gène chez la lignée sensible a entraîné une réduction du développement des symptômes, confirmant l'implication d'ET dans la résistance à *R. solanacearum* chez la Tomate (Chen et al., 2009).

**Arabidopsis**. Une étude transcriptomique durant l'interaction entre les lignées Nd-1 et Col-5 d'Arabidopsis et la souche GMI1000 de *R. solanacearum* a révélé que peu de gènes sont spécifiquement régulés positivement chez la lignée résistante. En revanche chez les plantes malades, des gènes impliqués dans la voie de l'ABA ou de la sénescence sont régulés positivement (Hu et al., 2008). Cette hormone étant impliquée dans la régulation du stress hydrique, il est possible que l'invasion massive du xylème, empêchant les flux hydriques, soit une des causes de l'induction massive de cette voie chez la lignée sensible. D'un autre côté, l'importance de l'ABA dans la résistance à *R. solanacearum* est de plus en plus documentée. Elle est notamment soutenue par le fait que des mutants insensibles à l'ABA (*abi1* et *abi2*) ou déficient pour cette hormone (*aba1*) ont une sensibilité accrue à cet agent pathogène. Réciproquement, l'expression constitutive de régulateurs de la

2006). Par exemple, elle serait liée à un QTL majeur situé sur le chromosome 6 dans l'interaction entre le cultivar Hawaii 7996 et la souche Pss4 (Wang et al., 2000). Des études plus anciennes ont montré que la résistance pouvait aussi être monogénique dominante dans le cas d'une inoculation du cultivar Hawaii 7996 par la souche 8217 (Grimault et al., 1995).

**Arabidopsis** . L'étude de la lignée Nd-1 d'*Arabidopsis* a permis l'identification du premier gène de résistance à la souche GMI1000 de *R. solanacearum* cloné, *RRS1-R*. Des croisements entre les lignées Nd-1 (résistante) et Col-5 (sensible) ont montré que ce gène était récessif. Cependant, l'étude de plantes transgéniques pour ce gène montre qu'il se comporte comme un gène dominant. La résistance conférée par ce gène serait dépendante de la voie du SA (Deslandes et al., 1998; Deslandes et al., 2002; Deslandes et al., 2003). L'interaction entre *RRS1-R* et l'effecteur PopP2 est une des rares interactions R/Avr directe décrite (Deslandes et al., 2003). D'un autre côté, l'étude de la lignée résistante Col-0 en réponse à la souche 14.25 montre que la résistance serait polygénique et gouvernée par au moins trois locus qui expliquent 90% de la résistance, quantitative resistance to *R. solanacearum*1 (*QRS1*) et *QRS2* sur le chromosome 2 et *QRS3* sur le chromosome 5 (Godiard et al., 2003). Le gène *ERECTA* code pour un récepteur-like kinase à répétitions riches en leucines (LRR-RLK) et est connu pour jouer un rôle dans le développement des parties aériennes des plantes. Il se situe proche de *QRS1* et participerait à la résistance face à *R. solanacearum*. En effet, la transformation de la lignée sensible par ce gène lui confère une résistance accrue à la bactérie, montrant ainsi une interaction entre des voies régulant le développement et la défense des plantes (Godiard et al., 2003).

***M. truncatula***. La résistance de *M. truncatula* semble être polygénique. L'étude du flétrissement des parties aériennes de lignées recombinantes F7 issues du croisement entre les lignées F83005.5 et A17, a permis de mettre en évidence l'implication de 3 QTLs dans la résistance à *R. solanacearum* (Vailleau et al., 2007). L'étude de l'héritabilité de la résistance a révélé que plus de 75% de la variation phénotypique était due à des variations génétiques. Parmi les QTLs identifiés, un QTL majeur serait localisé sur le chromosome 5 et expliquerait 38,5% des variations phénotypiques. Les deux QTLs mineurs sont localisés sur les chromosomes 3 et 7 et expliqueraient respectivement 13,1 et 17,6% des variations phénotypiques observées.

## 2) Voies hormonales impliquées dans la mise en place de la défense

**Tomate**. Une étude protéomique sur la Tomate a été mise en place afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance. Neuf protéines ont été identifiées comme différentiellement induites entre les cultivars sensibles et résistants, dont une chaperonne et un antigène de membrane apicale qui sont régulés positivement chez le résistant. L'application de SA induit une accumulation de cette dernière. Cela suggère un rôle de l'antigène dans la résistance via l'induction de la voie SA (Afroz et al., 2009).

L'implication de SA dans la défense de la Tomate vis-à-vis de *R. solanacearum* a pu être également observée par l'analyse du silencing de *NPR1* chez une lignée résistante, incapable alors de transduire le signal SA. Le transformant présente une multiplication bactérienne plus importante qu'avec le sauvage et un plus grand nombre de plantes colonisées (Chen et al., 2009). Cette étude montre également une implication de la voie ET dans la défense des plantes. Un silencing de plusieurs gènes impliqués dans cette voie, *ACO1/3*, *ERF3* et *EIN2*, a été effectué chez la lignée résistante. Les transformants présentent une diminution de la résistance par rapport au sauvage, avec une multiplication bactérienne plus importante, même si ces mutants ne montraient pas de symptômes. Le gène *CTR1* étant un régulateur négatif de la voie ET, une mutation de *CTR1* entraîne une induction constitutive de la voie ET. Le silencing de ce gène chez la lignée sensible a entraîné une réduction du développement des symptômes, confirmant l'implication d'ET dans la résistance à *R. solanacearum* chez la Tomate (Chen et al., 2009).

**Arabidopsis**. Une étude transcriptomique durant l'interaction entre les lignées Nd-1 et Col-5 d'Arabidopsis et la souche GMI1000 de *R. solanacearum* a révélé que peu de gènes sont spécifiquement régulés positivement chez la lignée résistante. En revanche chez les plantes malades, des gènes impliqués dans la voie de l'ABA ou de la sénescence sont régulés positivement (Hu et al., 2008). Cette hormone étant impliquée dans la régulation du stress hydrique, il est possible que l'invasion massive du xylème, empêchant les flux hydriques, soit une des causes de l'induction massive de cette voie chez la lignée sensible. D'un autre côté, l'importance de l'ABA dans la résistance à *R. solanacearum* est de plus en plus documentée. Elle est notamment soutenue par le fait que des mutants insensibles à l'ABA (*abi1* et *abi2*) ou déficient pour cette hormone (*aba1*) ont une sensibilité accrue à cet agent pathogène. Réciproquement, l'expression constitutive de régulateurs de la

signalisation ABA incluant ABI1 et ABI2 ont une résistance accrue à *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco et al., 2007).

### **3) Analyse cytologique de la colonisation bactérienne et mise en place de la défense**

Les études permettant de comprendre la propagation différentielle des bactéries chez les lignées sensible et résistante ainsi que les éventuels mécanismes physico-chimiques en cause ont majoritairement été faites sur la Tomate. Ce pathosystème permet en effet de suivre la propagation naturelle des bactéries sans avoir besoin de forcer leur pénétration en coupant les racines par exemple. Les études sur la Tomate ont montré que les bactéries se multiplient autour des extrémités racinaires et des aisselles des racines secondaires, mais ne pénètrent que par cette dernière porte. Les souches pathogènes envahissent ensuite le xylème en dégradant les parois cellulaires. La colonisation d'à peu près 25% des vaisseaux du xylème suffit à induire le flétrissement (Vasse et al., 1995). Dans d'autres cas, comme par exemple pour les variétés Hawaii 7996 ou Floradel inoculées par la souche 8217, la résistance, déterminée par l'absence de symptômes foliaires, s'accompagne d'une présence de la bactérie dans les tissus conducteurs. La multiplication des bactéries semble cependant limitée par rapport aux cultivars sensibles, sans que l'on puisse expliquer ce phénomène (Grimault et al., 1995).

L'endoderme, dont les parois cellulaires contiennent des composés phénoliques, est considéré comme une barrière physique et chimique autour des vaisseaux conducteurs. Il y a deux zones où cette couche cellulaire présente des « fragilités » dues au développement et à la croissance racinaire : la zone d'élongation racinaire, car l'endoderme n'est pas encore totalement différencié, et au niveau de l'émergence des racines secondaires, car leur émergence à partir du péricycle et à travers le cortex en modifie la structure (Vasse et al., 2005). Le cultivar Hawaii7996 de la Tomate est résistant à souche GMI1000. Parfois, des renforcements continus des parois du xylème par des dépôts de couches ressemblant à de la subérine ont été observés et les cellules ainsi modifiées ne sont jamais colonisées, suggérant un mécanisme de défense limitant la progression de l'agent pathogène. Au niveau des racines secondaires, il a été fréquemment observé une coloration brune des vaisseaux du xylème proches de la zone corticale colonisée. Des dépôts de composés au niveau des parois et la présence de matériel amorphe occupant le lumen du xylème ont été observés. Une

signalisation ABA incluant ABI1 et ABI2 ont une résistance accrue à *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco et al., 2007).

### **3) Analyse cytologique de la colonisation bactérienne et mise en place de la défense**

Les études permettant de comprendre la propagation différentielle des bactéries chez les lignées sensible et résistante ainsi que les éventuels mécanismes physico-chimiques en cause ont majoritairement été faites sur la Tomate. Ce pathosystème permet en effet de suivre la propagation naturelle des bactéries sans avoir besoin de forcer leur pénétration en coupant les racines par exemple. Les études sur la Tomate ont montré que les bactéries se multiplient autour des extrémités racinaires et des aisselles des racines secondaires, mais ne pénètrent que par cette dernière porte. Les souches pathogènes envahissent ensuite le xylème en dégradant les parois cellulaires. La colonisation d'à peu près 25% des vaisseaux du xylème suffit à induire le flétrissement (Vasse et al., 1995). Dans d'autres cas, comme par exemple pour les variétés Hawaii 7996 ou Floradel inoculées par la souche 8217, la résistance, déterminée par l'absence de symptômes foliaires, s'accompagne d'une présence de la bactérie dans les tissus conducteurs. La multiplication des bactéries semble cependant limitée par rapport aux cultivars sensibles, sans que l'on puisse expliquer ce phénomène (Grimault et al., 1995).

L'endoderme, dont les parois cellulaires contiennent des composés phénoliques, est considéré comme une barrière physique et chimique autour des vaisseaux conducteurs. Il y a deux zones où cette couche cellulaire présente des « fragilités » dues au développement et à la croissance racinaire : la zone d'élongation racinaire, car l'endoderme n'est pas encore totalement différencié, et au niveau de l'émergence des racines secondaires, car leur émergence à partir du péricycle et à travers le cortex en modifie la structure (Vasse et al., 2005). Le cultivar Hawaii7996 de la Tomate est résistant à souche GMI1000. Parfois, des renforcements continus des parois du xylème par des dépôts de couches ressemblant à de la subérine ont été observés et les cellules ainsi modifiées ne sont jamais colonisées, suggérant un mécanisme de défense limitant la progression de l'agent pathogène. Au niveau des racines secondaires, il a été fréquemment observé une coloration brune des vaisseaux du xylème proches de la zone corticale colonisée. Des dépôts de composés au niveau des parois et la présence de matériel amorphe occupant le lumen du xylème ont été observés. Une

densité électronique élevée et une coloration bleue foncée au bleu de toluidine et bleu de méthylène suggèrent une nature polyphénolique de ces matériaux. Ce mécanisme pourrait permettre de limiter l'infection de la bactérie dans ce cultivar résistant (Vasse et al., 2005). Cette étude n'a pas fait de comparaison avec un cultivar sensible et ne nous permet donc pas d'affirmer que c'est un mécanisme lié à la résistance. On voit cependant que les mécanismes de défense et la régulation de la progression de la bactérie peuvent intervenir à différentes étapes.

Une étude plus précise sur la comparaison de la composition pariétale des vaisseaux conducteurs de cultivars résistants et sensibles de Tomate a permis d'établir une relation claire entre ce paramètre et le degré de résistance (Wydra et Beri, 2006). Dans cette étude, il semblerait que *R. solanacearum* induise une diminution de la méthyle-estérification des homogalacturonanes plus importante chez les cultivars sensibles. Cela rendrait ainsi les propriétés physico-chimiques des parois de l'hôte plus favorables à sa propagation dans les vaisseaux. L'infection des lignées sensibles résulte généralement également en une ramification plus intense des rhamnogalacturonanes I, en comparaison avec les lignées résistantes.

## **E. La complexité du génome de *R. solanacearum***

**Un génome bipartite** : Le séquençage de la souche GMI1000 a permis une grande avancée dans l'analyse de la complexité moléculaire impliquée dans le pouvoir pathogène et la physiologie de *R. solanacearum* (Salanoubat et al., 2002). Son génome est bipartite, organisé en deux réplicons circulaires : un chromosome et un mégaplasme, de respectivement 3.7 et 2.1 mégabases. C'est un des premiers organismes décrit avec une telle organisation bipartite (Genin et Boucher, 2004). Le plus grand réplicon porte l'ensemble des gènes de ménage permettant la survie de la bactérie, incluant notamment les gènes requis pour la transcription, la réparation de l'ADN ou la division cellulaire. Le plus petit réplicon ne porte pas de gènes vitaux pour la bactérie qui ne sont pas également présent sur le chromosome. Toutefois, plusieurs enzymes contrôlant le métabolisme primaire incluant la synthèse de certains acides aminés et de co-facteurs sont uniquement codés par des gènes du mégaplasme. Ce dernier porte également des déterminants du pouvoir pathogène comme les gènes *hrp*, des constituants du flagelle et les gènes contrôlant la synthèse d'EPS (cf §V-D). Le mégaplasme aurait donc un rôle important dans l'adaptation de la bactérie et il

est clairement établi que les deux réplicons ont co-évolué depuis longtemps (Genin et Boucher, 2002, 2004; Guidot et al., 2007).

**Un génome d'une grande plasticité** : Une fraction majoritaire du génome de *R. solanacearum* présente une composition en base caractéristique de l'espèce et constitue ainsi son squelette génétique. Le reste du génome présente une composition différente en GC% ou un usage de codons atypiques. Son génome présente une complexité et une plasticité potentielle importantes, notamment dues au fait qu'elle a la capacité d'acquérir et de recombiner de l'ADN par transformation naturelle. Le séquençage de son génome a révélé un grand nombre d'éléments génétiques mobiles et de régions potentiellement acquises par des transferts horizontaux. Ces régions codent souvent pour des fonctions d'adaptation comme des voies métaboliques supplémentaires, des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence. La souche GMI1000 présente un grand nombre de séquences d'insertion et certaines régions présentent un usage de codon différent de celui trouvé dans l'ensemble du génome et ont été dénommées régions à usage de codon alternatif (ACUR). 93 ACURs allant de 1 à 20 Kb et représentant 7% du génome ont été identifiées. Ces régions sont souvent associées à des éléments génétiques mobiles ou à des gènes de virulence potentiels. 25% des effecteurs potentiels de *R. solanacearum* sont codés dans des ACURs (Salanoubat et al., 2002; Genin et Boucher, 2004). Les caractéristiques de son génome pourraient être à l'origine de la diversité génétique de l'espèce, permettant également la vaste étendue de son spectre d'hôte et de sa répartition géographique.

## **V. Les déterminants du pouvoir pathogène de**

### ***R. solanacearum***

#### **A. Généralités**

Les bases moléculaires qui déterminent le pouvoir pathogène du parasite sont définies par l'ensemble des gènes nécessaires à la colonisation, la survie et la multiplication de l'agent pathogène dans l'hôte et à ceux directement liés aux dommages causés à ce dernier. Plusieurs facteurs interviennent dans le pouvoir pathogène des bactéries, l'efficacité d'un agent pathogène repose notamment sur un contrôle global des mécanismes de

régulation de ces paramètres (Mole et al., 2007). Le pouvoir pathogène se détermine par la virulence et l'agressivité d'une souche particulière. La virulence est sa capacité à induire le développement de la maladie chez un hôte. L'agressivité se définit par l'intensité des symptômes provoqués, caractérisée notamment par la cinétique d'apparition et d'évolution du flétrissement et le degré de multiplication de la bactérie *in planta*.

## **B. Les systèmes d'exportation de protéines bactériennes**

L'exportation de protéines hors de la cellule bactérienne est nécessaire pour l'interaction du micro-organisme avec l'environnement physique et biologique extérieur. Les instruments de sécrétion sont nécessaires à la mise en place du pouvoir pathogène du parasite, incluant la mise en place d'organelles de surface (*pili*, flagelles), la libération d'enzymes, de toxines ou autres facteurs protéiques. On estime que *R. solanacearum* exporte des centaines de protéines à travers différents systèmes de sécrétion, tous les types de sécrétions majeurs décrits chez bactéries sont présents chez GMI1000 (Poueymiro et Genin, 2009). On distingue dans cette machinerie les appareils dépendants (systèmes de sécrétion de type II ou IV) ou non (systèmes de sécrétion de type I ou III) de la voie générale de sécrétion (GSP ou sec) (Hueck, 1998). Le SST2 participe au pouvoir pathogène de la bactérie notamment par la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi végétale ou d'EPS (Gonzalez et al., 2007). L'acteur principal du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* reste néanmoins le SST3, qui fera l'objet d'un paragraphe ultérieur.

## **C. Les enzymes extracellulaires**

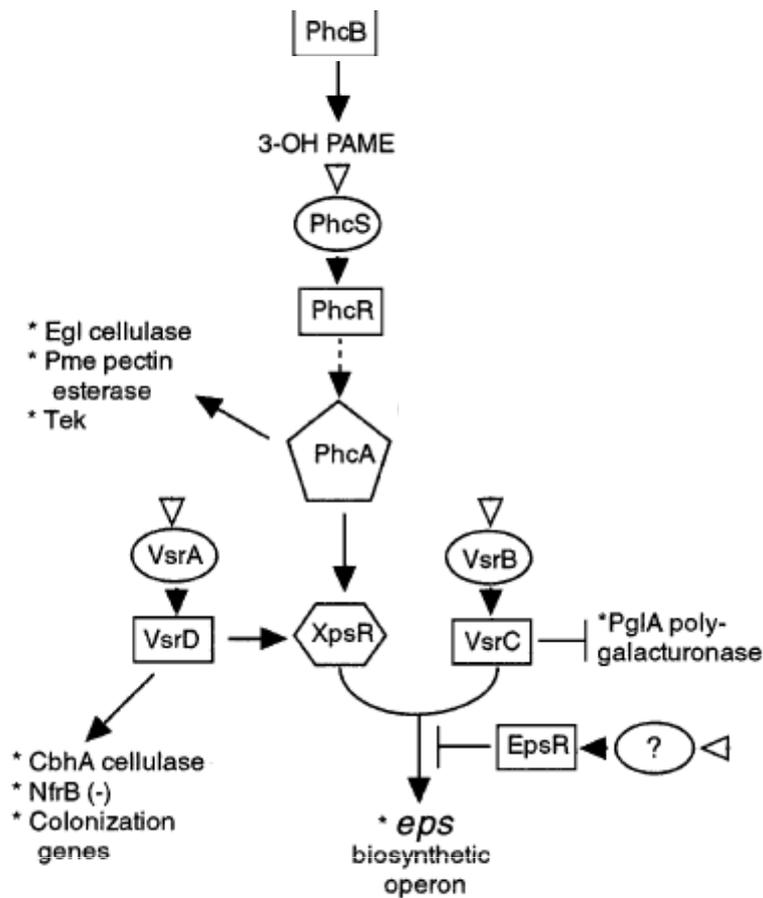
*R. solanacearum* sécrète des enzymes extracellulaires lui permettant notamment de dégrader la paroi pectocellulosique végétale. Les enzymes cellulolytiques et pectinolytiques de la bactérie interviennent dans un but nutritif et/ou invasif. En effet, la paroi végétale est une source importante de carbone et la première barrière empêchant la pénétration de l'agent pathogène. Chez *R. solanacearum*, des polygalacturonases et une endoglucanase ont été mises en évidence (Huang et Schell, 1990). Deux gènes codant pour des polygalacturonases ont été identifiés, *pglA* et *pehA*, des études ont pu confirmer leurs implications dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. Des expériences de mutagenèse de *pglA* montrent que cette enzyme contribue au pouvoir pathogène sans pour autant être essentielle, les mutants sont retardés dans l'induction de la maladie (Huang et Schell, 1990).

Du côté de *pehA*, des mutants pour ce gène conservent leur agressivité sur le Tabac mais ne peuvent plus provoquer le brunissement sur les cals de Pomme de terre (Allen et al., 1991).

Une étude récente sur le gène Rsc1524 vient alimenter la discussion sur le rôle des enzymes extracellulaires dans la virulence de *R. solanacearum* (Franks et al., 2008). La disruption de Rsc1524 entraîne une diminution de la virulence de l'agent pathogène sur Tomate et Arabidopsis. C'est un gène d'effecteur de *R. solanacearum* homologue de PA4753 de *Pseudomonas aeruginosa* qui coderait pour une putative protéine se liant à l'ARN. Sa mutation n'a pas d'effet sur la production d'endoglucanase (Egl) et de pectine méthylestérase (Pme) mais entraîne une augmentation du niveau de polygalacturonase (Peh). Nous sommes donc en présence d'un mutant qui a une virulence réduite mais un niveau de polygalacturonase plus élevé que la souche sauvage.

## **D. Les exopolysaccharides**

La virulence des bactéries phytopathogènes est souvent corrélée à la synthèse d'EPS (Denny, 1995). C'est chez *R. solanacearum* qu'ont été obtenues les données les plus convaincantes en faveur du rôle des EPS dans la pathogénie (Garg et al., 2000; Boucher et al., 2001). *R. solanacearum* produit un EPS majoritaire à caractère acide, l'EPS I. Des mutants affectés dans la production de ce composé sont affectés dans leur pouvoir pathogène. Des expériences sur Tomate ont montré que ces mutants sont capables d'infecter l'hôte et de se multiplier *in planta* mais n'induisent pas de flétrissement des parties aériennes (Denny et Baek, 1991). Dans cette expérience, les EPS semblent impliqués dans les stades tardifs de la maladie, jouant un rôle dans l'occlusion des vaisseaux conducteurs. D'autres études ont montré que l'implication des EPS dans la virulence de *R. solanacearum* ne se limite pas à l'occlusion des vaisseaux car des mutants de synthèse d'EPS inoculés sur racine intacte de Tomate sont incapables d'envahir le xylème et semblent induire des mécanismes de défense (Araud-Razou et al., 1998). Ils pourraient donc également jouer un rôle dans la virulence de la bactérie en dissimulant ses structures de surface élicitrices du système immunitaire des plantes ou en constituant une barrière physique contre certains composés antimicrobiens végétaux (Schell, 2000). Un système de régulation atypique et complexe permet le contrôle de la transcription des EPS. Au moins trois systèmes de transduction du signal sont impliqués : le système Phc (Phenotype conversion) composé de PhcA, un régulateur de



**Figure 7. Schéma simplifié des voies de régulation de la production d'EPSI (d'après Schell 2000).**

Les ellipses et les rectangles représentent des récepteurs kinases et leurs régulateurs de réponse respectivement. Les autres formes représentent différents types de régulateurs de transcription. Les têtes de flèches blanches représentent un signal putatif, les noires indiquent un transfert de phosphate qui intervient en réponse à ce signal. Les flèches pleines indiquent un contrôle transcriptionnel positif, les flèches arrêtées un contrôle négatif. Les flèches pointillées indiquent une répression de la synthèse de PhcA par un mécanisme inconnu. Phc: phenotype conversion; 3-OH Palmatic Acid Methyl Ester, molécule signal endogène dont la synthèse est régulée par PhcB.

transcription de type LysR et des produits de l'opéron *phcBSRQ* et deux systèmes à deux composants VsrA/VsrD et VsrB/VsrC (Huang et al., 1995; Schell, 2000) (Figure 7).

## E. La mobilité

La mobilité bactérienne engendrée par l'action de flagelles est nécessaire à la virulence de la bactérie, comme cela a été montré chez la Tomate (Tans-Kersten et al., 2001). Des études sur le chimiotactisme ont révélé que la bactérie est spécifiquement attirée par divers acides aminés ou acides organiques provenant des exsudats racinaires des plantes hôtes. Jusqu'à récemment, on ne savait pas si la mobilité était nécessaire à la virulence de la bactérie en tant que telle ou si c'était la mobilité dirigée par le chimiotactisme qui intervenait dans le pouvoir pathogène. L'utilisation de mutants non-mobiles et non-chimiotactiques a permis d'élucider cette question et a révélé l'importance d'une mobilité orientée et non aléatoire pour l'accomplissement du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* (Yao et Allen, 2006). Il est probable que la mobilité de la bactérie intervienne également dans la migration jusqu'aux vaisseaux conducteurs. Cependant, si elle joue un rôle fondamental dans les premières étapes de l'infection, il a été montré que les bactéries, une fois dans le xylème, n'étaient plus mobiles. La mobilité à partir de cette étape n'est d'ailleurs plus nécessaire au développement des symptômes. En effet, des mutants non-mobiles directement inoculés dans les vaisseaux conducteurs conservent leur pouvoir pathogène (Tans-Kersten et al., 2004).

## F. Le quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme de communication par lequel les bactéries évaluent leur densité de population, ce qui leur permet d'adopter de nouveaux comportements en fonction de la variation de ce paramètre (Loh et al., 2002; Von Bodman et al., 2003). Ce mécanisme engendre la régulation de l'expression de certains gènes bactériens et intervient notamment dans la mise en place de son pouvoir pathogène. Les bactéries qui utilisent le quorum sensing produisent en permanence des signaux moléculaires appelés auto-inducteurs. Ils sont sécrétés par les bactéries et diffusent alors librement dans le milieu. Lorsque la population devient plus importante, la concentration en auto-inducteur augmente et dépasse un seuil critique qui est alors perçu par les bactéries qui le produisent : le quorum est atteint. L'auto-inducteur va ensuite former un complexe avec un facteur de

transcription présent normalement dans la bactérie. Le complexe facteur de transcription/auto-inducteur formé va pouvoir moduler l'expression de gènes donnés qui vont conférer à la population de nouvelles propriétés. Parmi les signaux connus, on peut citer les N-acyl homosérine lactones (AHLs), les butyrolactones, des peptides cycliques tels ComX, ou l'autoinducteur 2 (AI-2).

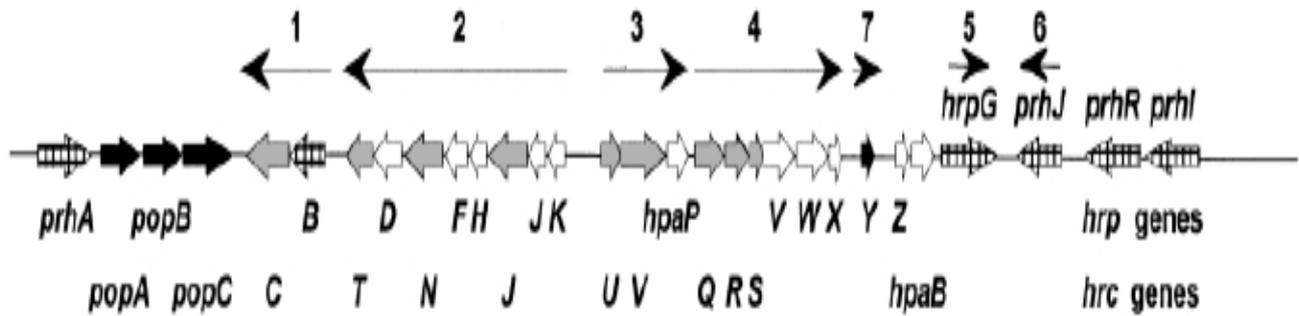
Le rôle du quorum sensing dans la pathogénicité a été bien illustré quelque soit l'hôte. Les bactéries pathogènes de l'homme comme *P. aeruginosa* peuvent croître dans l'organisme hôte sans effet pathogène jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine concentration. Elles deviennent alors agressives et leur nombre suffit à surmonter le système immunitaire de l'hôte (Bjarnsholt et Givskov, 2007). Le rôle du quorum sensing dans la virulence de *R. solanacearum* a notamment été montré car il intervient dans la régulation du gène *PhcA*, vu précédemment pour son rôle dans la synthèse d'EPS (Flavier et al., 1997).

Il a été trouvé dans des exsudats de Pois une substance semblant mimer des molécules-signal du quorum sensing, les AHLs. Cela pourrait être un moyen pour la plante de tromper la bactérie sur la taille de sa population effective, perturbant alors ses mécanismes de virulence (Teplitski et al., 2000).

## **VI. L'appareil de sécrétion de type III**

### **A. Généralités**

Le SST3 constitue un déterminant indispensable au pouvoir pathogène des principales bactéries pathogènes gram-négatives. Il leur permet d'injecter dans la cellule de l'hôte une batterie de protéines dites effecteurs de type III (ET3), dont les fonctions et cibles sont multiples (cf §VII). Cette structure spécialisée est fortement conservée au sein des bactéries pathogènes malgré leurs diversités taxonomiques, que leurs hôtes soient des animaux ou des végétaux. La conservation de cet appareillage semble donc être un déterminant majeur dans l'évolution des bactéries pathogènes. Le SST3 est utilisé de plusieurs manières en fonction des différentes bactéries, liées aux variations de leurs processus infectieux. Dans certains cas par exemple, notamment pour les agents pathogènes de plantes, l'appareil permet la sécrétion de protéines de virulence, qui engendrent la



**Figure 8. Organisation génétique du cluster *hrp* de *R. solanacearum*** (Van Gijsegem et al., 2002).

Les flèches fines indiquent les unités transcriptionnelles. Les flèches pleines indiquent les différents gènes, en gris pour les gènes conservés *hrc*, en noir pour les protéines sécrétées et en hachuré pour les gènes régulateurs.

libération de nutriments dans l'espace extracellulaire. En revanche, dans le cas d'agents pathogènes intracellulaires animaux comme *Salmonella* sp. ou *Shigella* sp., le SST3 sert directement à l'invasion de la cellule de l'hôte, en induisant notamment une réorganisation du cytosquelette (Galan et Wolf-Watz, 2006; McCann et Guttman, 2008).

Parmi les principales bactéries phytopathogènes dotées du SST3, on peut citer *P. syringae*, *Xanthomonas* sp., et bien sûr *R. solanacearum*. *E. chrysanthemi* fait partie des rares exceptions à ce jour identifiées parmi les bactéries dotées d'un SST3, car sa virulence dépend principalement de la production massive d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (He, 1998; Hueck, 1998; Cornelis et Van Gijsegem, 2000).

Le SST3 permet l'adhésion de la bactérie à la surface eucaryote dans de nombreux cas d'agents pathogènes d'animaux comme *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli*. Cependant, il ne semble pas que cela soit le cas chez *R. solanacearum*, l'adhésion étant plutôt liée à des composés polaires, notamment des polysaccharides (Cornelis et Van Gijsegem, 2000).

## **B. Mise en place de la structure et organisation génétique**

**Origine de la structure.** La structure du SST3 présente de nombreux composants ayant des homologies avec des protéines de structure du flagelle. Le filament du flagelle est constitué de nombreuses copies de la protéine flagelline, tout comme la partie extracellulaire du SST3 est assemblée par une polymérisation d'une protéine particulière, la piline. La mise en place même des deux structures présente également des similitudes, il semble donc que le SST3 dérive d'un ancêtre de flagelle commun aux deux structures (Van Gijsegem et al., 1995; Tampakaki et al., 2004).

**Organisation en cluster :** Le SST3 se compose d'une vingtaine de protéines codées par des gènes regroupés en cluster organisé en sept unités transcriptionnelles. De part son rôle fondamental dans le pouvoir pathogène des bactéries qui le possèdent et le rôle des effecteurs dans le déclenchement de la HR (voir paragraphe VII), ce cluster a été nommé *hrp* pour hypersensitive response et pathogenicity. Chez *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp. et *Erwinia* sp., le cluster *hrp* est chromosomal (Alfano et Collmer, 1997). En revanche, chez

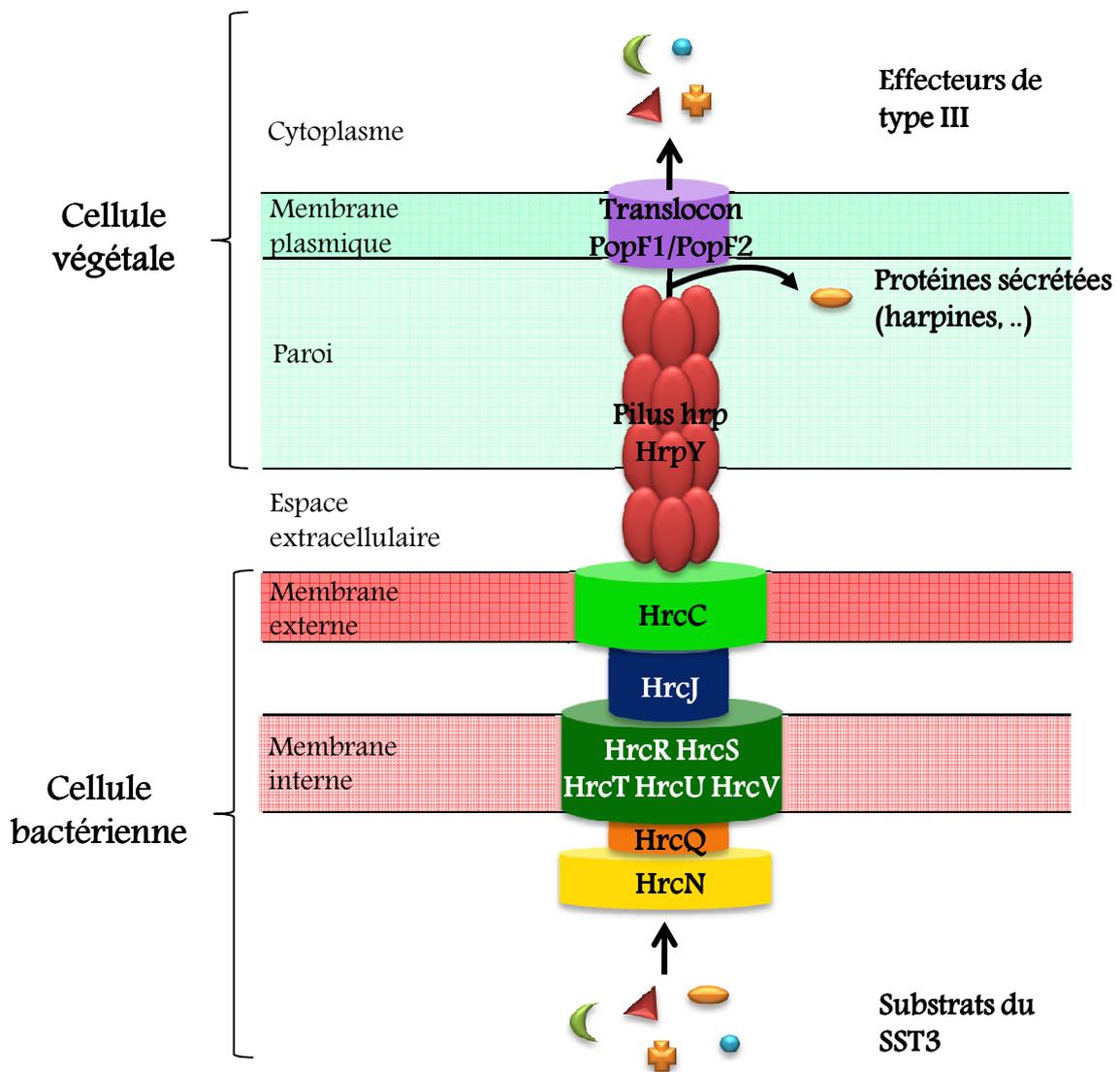


Figure 9. Schéma simplifié de l'appareil de sécrétion de type III (SST3) de *R. solanacearum* (d'après Van Gijsegem et al., 2002).

La partie basale, enchâssée dans la double membrane de la cellule bactérienne est principalement constituée de protéines conservées Hrc. Elle est prolongée dans le milieu extracellulaire par le pilus Hrp, principalement constitué de la protéine HrpY, qui va pénétrer la paroi végétale. Des protéines pourront être sécrétées à ce niveau (harpines) ou dans le cytoplasme de la cellule végétale (effecteurs) à l'aide du translocon, enchâssé dans la membrane plasmique de l'hôte.

*R. solanacearum*, le cluster de 23 Kb est situé sur le mégaplasme (Figure 8) (Salanoubat et al., 2002; Genin et Boucher, 2004). Parmi les gènes qui constituent le cluster, neuf sont conservés chez la grande majorité des bactéries dotées d'un SST3 et ont ainsi été nommés *hrc* (*hrp* conservés) (Bogdanove et al., 1996).

**Structure du SST3** (Figure 9). La partie basale du SST3, ancrée dans l'enveloppe bactérienne, est majoritairement constituée des protéines Hrc. La partie extracellulaire qui va pénétrer l'hôte est dénommée « pilus *hrp* » et la piline qui la constitue diffère en fonction des bactéries, c'est HrpA chez *P. syringae* ou HrpY chez *R. solanacearum* par exemple. La longueur du pilus fait partie des variations rencontrées entre les agents pathogènes de plantes et d'animaux. En effet, la longueur plus importante du pilus des agents pathogènes de plante serait liée à l'épaisseur de la paroi végétale à traverser (Romantschuk et Taira, 2001). A l'extrémité de ce pilus, on retrouve un translocon, assemblage protéique qui permettrait l'injection des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte, constitué notamment de popF1 et popF2 chez *R. solanacearum* (Buttner et Bonas, 2002; Meyer et al., 2006). Le contact avec la cellule végétale semble induire la translocation d'effecteurs de la bactérie vers la cellule végétale (Aldon et al., 2000).

### **C. La régulation des gènes *hrp***

La régulation du SST3 et des effecteurs diffère entre *P. syringae*, *Erwinia sp.* et *Pantthoea sp.* d'une part, et *R. solanacearum* et *Xanthomonas sp.* d'autre part. Dans les deux cas, une cascade de régulation est déclenchée lorsque la bactérie entre en contact avec la cellule hôte et aboutit à l'expression de gènes de structure du SST3 et des gènes codant pour les effecteurs. La différence se fait au niveau des constituants qui interviennent dans cette régulation (Buttner et Bonas, 2006). La voie de signalisation et de régulation impliquée chez *R. solanacearum* est bien connue (Figure 10) (Schell, 2000; Brito et al., 2002; Cunnac et al., 2004; Occhialini et al., 2005; Valls et al., 2006). Un signal émis par la plante est perçu par le récepteur, PrhA. Cela déclenche alors la cascade de transduction complexe faisant intervenir dans l'ordre PrhR, PrhL (un facteur sigma de type ECF), les régulateurs PrhJ, HrpG et pour finir HrpB. Le signal émis par la plante serait un composant de la paroi végétale, ce qui permettrait l'injection d'effecteurs à l'endroit et au moment précis où ils sont nécessaires (Aldon et al., 2000). HrpG contrôle l'expression de HrpB mais également la transcription d'un grand nombre de gènes indépendants de ce dernier, comprenant entre autres des

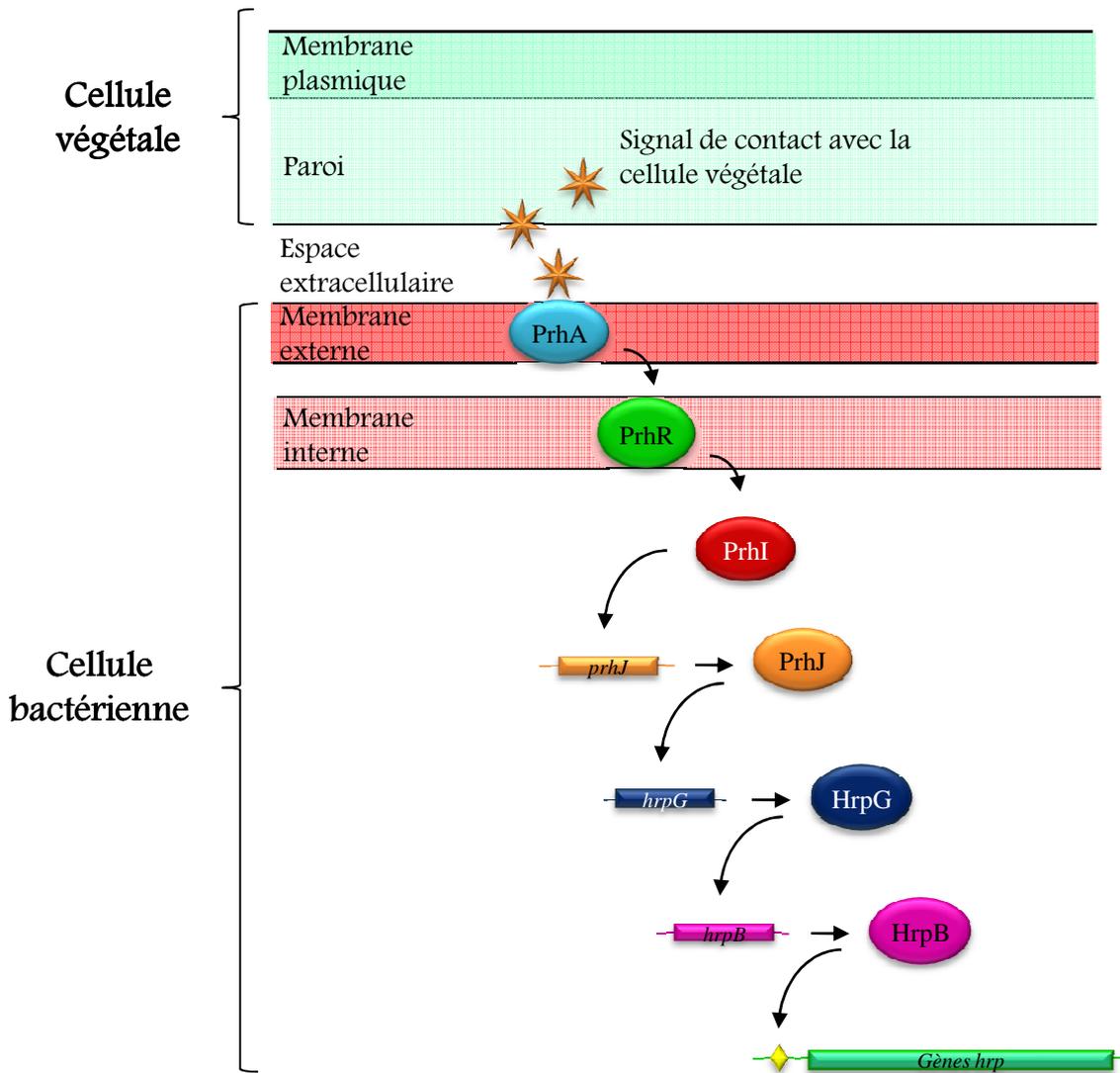


Figure 10. Représentation schématique de la régulation des gènes *hrp* de *R. solanacearum* (d'après Buttner et Bonas 2006).

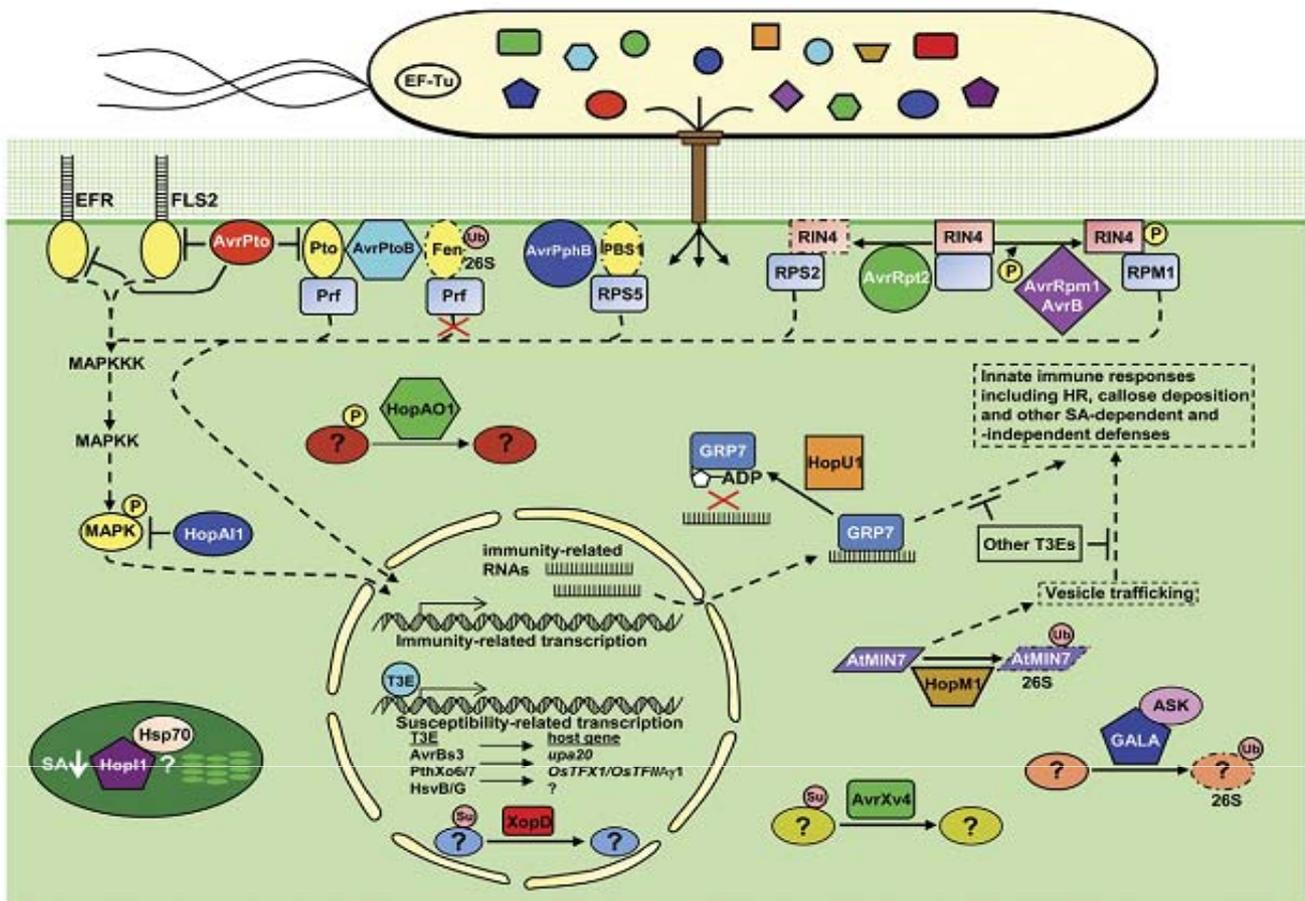
La protéine membranaire PrhA agit comme récepteur du signal de contact avec la paroi végétale et transmet le signal à une cascade de régulation, qui inclue la protéine membranaire PrhR et les activateurs transcriptionnels PrhI, PrhJ, HrpG et HrpB. HrpB se lie à un élément conservé du promoteur des gènes *hrp*, la *hrpII*box (losange jaune) afin d'activer l'expression d'un régulon comprenant les gènes de structure du SST3 et les gènes codants pour les effecteurs.

enzymes de synthèse de phytohormones et enzymes de dégradation de la paroi végétale. HrpB est un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes de structure de l'appareil ainsi que ceux codant pour les effecteurs.

## D. La translocation des effecteurs

La régulation et la dynamique de la mise en place de la structure et de l'injection des effecteurs ne sont pas encore entièrement élucidées (Aldridge et Hughes, 2001). Durant les étapes précoces de la mise en place de la structure, il semblerait que l'extrémité du canal reste fermée et que l'addition du translocon soit assez tardive. Des études ont permis de mieux comprendre la régulation de la longueur de la seringue permettant l'injection des effecteurs (Thomas et Finlay, 2004), mais on ne sait toujours pas concrètement comment la sécrétion est déclenchée. On ne connaît d'ailleurs pas non plus la nature du signal d'injection des effecteurs. Parmi les hypothèses actuelles, celles qui sont privilégiées sont: une séquence d'acide aminé terminale spécifique ou un système de sécrétion faisant intervenir des protéines chaperonnes. Ces dernières semblent jouer un rôle très important dans l'injection des effecteurs en jouant le rôle de garde du corps, de pilote ou en hiérarchisant la sécrétion. Leurs rôles précis restent à élucider (Cornelis et Van Gijsegem, 2000).

L'export de protéines a d'abord été démontré par détection immunologique des protéines dans les surnageants de cultures bactériennes (Michiels et al., 1990). Une autre approche, biochimique, basée sur la détection de l'activité de l'adénylate cyclase (production d'AMPC à partir d'ATP) d'un fragment de la toxine de *Bordetella pertussis* (Cya') a permis de faire progresser les connaissances dans la sécrétion des protéines et notamment chez *R. solanacearum* (Cunnac et al., 2004). Cette méthode repose sur le fait que le fragment Cya' de la toxine n'est biochimiquement actif qu'en présence de calmoduline, une protéine eucaryote strictement intracellulaire. Elle permet donc la détection des effecteurs préalablement additionnés de ce fragment lorsqu'ils sont dans le milieu intracellulaire eucaryote, de part la production d'AMPC générée par l'activité adénylate cyclase.



**Figure 11. Cibles végétales et activités de PAMPs et d'effecteurs de type III (ET3s) des bactéries phytopathogènes** (Block et al., 2008).

L'activité de ces ET3s peut-être reconnue de manière directe ou indirecte par des protéines R comme RPM1, RPS5, RPS2 ou Prf, ce qui induit l'ETI. Des récepteurs kinases de plante comme EFR ou FLS2 peuvent enclencher la PTI suite à la reconnaissance de PAMPs. Les ET3s ont de nombreuses cibles végétales et peuvent intervenir à tous les niveaux dans la régulation des mécanismes cellulaires de l'hôte.

## VII. Les effecteurs de type III des bactéries pathogènes

### A. Diversité des effecteurs

Comme nous l'avons vu précédemment, le SST3 est un instrument complexe fondamental du pouvoir pathogène des bactéries grâce à l'injection intracellulaire de protéines particulières, les effecteurs. Chaque agent pathogène a une batterie particulière de protéines effectrices qui aboutit à une spécificité dans son pouvoir pathogène et son spectre d'hôte. Ces effecteurs ont des natures, des cibles moléculaires et des fonctions variées. La complexité de la compréhension du rôle des effecteurs vient notamment du fait qu'ils peuvent avoir plusieurs rôles chez un même hôte, des fonctions différentes en fonction de l'hôte et qu'ils peuvent agir de concert pour induire un phénotype. Un criblage de mutants de la souche Pss190 de *R. solanacearum* basé sur leurs pertes de virulence sur Tomate n'a révélé aucun effecteur type III. Cela corrobore le fait qu'ils agiraient rarement seuls (Lin et al., 2008).

Plusieurs exemples concrets ainsi que des revues récentes sur les effecteurs des principales bactéries pathogènes étudiées, *P. syringae* (Cunnac et al., 2009), *R. solanacearum* (Poueymiro et al., 2009) et *Xanthomonas sp.* (Kay et Bonas, 2009), illustrent bien cette complexité (Figure 11). Parmi ces effecteurs, on retrouve une grande variété de fonction non exclusives l'une de l'autre : suppression de la voie des miARN, suppression de la PTI ou de la ETI, modulations positives ou négatives de voies hormonales (SA, JA, ET, acide abscissique (ABA) ou auxine), élévation de mort cellulaire, toxicité, extraction de nutriments ou déstructuration de constituants cellulaires de l'hôte. On ne connaît pas encore les mécanismes d'actions de tous les effecteurs. Il semble qu'une stratégie largement utilisée par la bactérie soit de détourner les voies intracellulaires de l'hôte, en mimant l'action de protéines hôtes, en induisant des modifications post-traductionnelles, la relocalisation cellulaire de cibles végétales ou une reprogrammation transcriptionnelle (Nimchuk et al., 2000; Desveaux et al., 2006; Grant et al., 2006; Block et al., 2008; Zhou et Chai, 2008).

On distingue notamment deux fonctions qui peuvent sembler contradictoires. D'un côté, ces effecteurs jouent un rôle dans la virulence de l'agent pathogène en déjouant le système immunitaire de l'hôte et en induisant le développement de symptômes. D'un autre

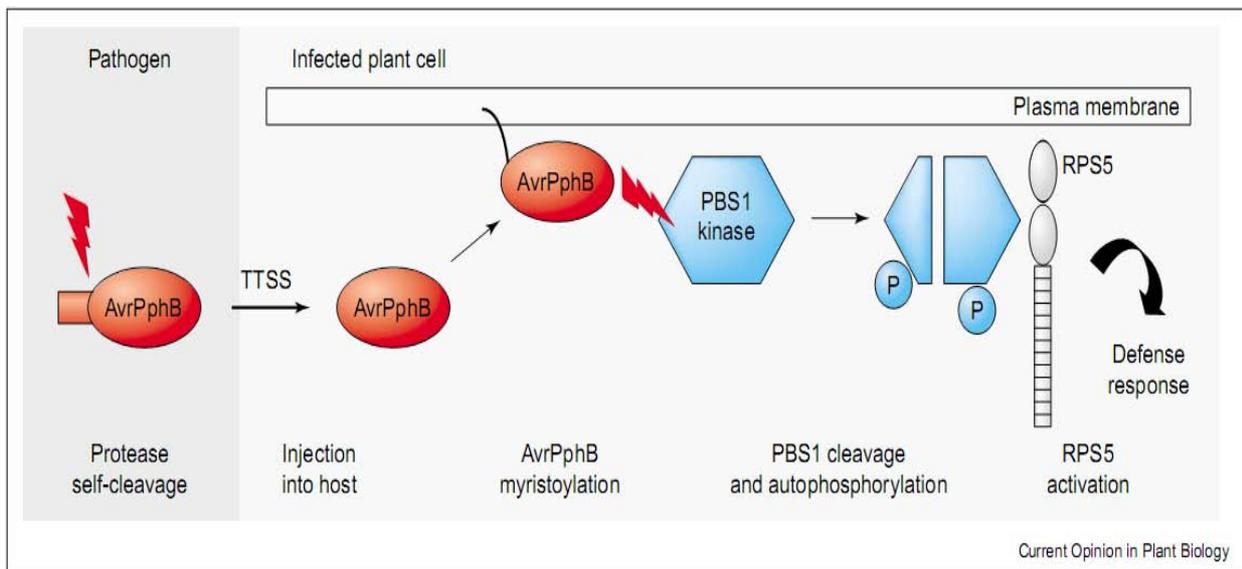
côté, ces effecteurs peuvent trahir la présence de l'agent pathogène. Il est alors reconnu à ses dépens par la plante qui peut alors activer son système de défense pour contrecarrer l'attaque, entraînant alors un échec de l'infection. Si l'avirulence était leur seule finalité, ces gènes désavantageux auraient dû disparaître. La pérennité des gènes Avr réside dans le fait qu'ils peuvent aussi agir comme facteurs de virulence ou être nécessaire pour la survie ou la multiplication (Kjemtrup et al., 2000; Nimchuk et al., 2003). En l'absence de la reconnaissance Avr/R, ces mêmes effecteurs peuvent déstabiliser la défense basale de l'hôte et entraîner un relarguage de nutriments de l'hôte, permettant alors la prolifération de l'agent pathogène et le développement de la maladie (Day et Graham, 2007; Stavrinides et al., 2008)

La majorité des effecteurs identifiés à ce jour ont été décrits comme des facteurs soit de virulence, soit d'avirulence. Cependant, les connaissances pour chaque effecteur sont partielles et on ne connaît pas pour chacun le rôle, la fonction, la localisation et le mode d'action sur l'ensemble des espèces. On peut donc envisager que sur le long terme la recherche permette de se rendre compte que tous les effecteurs peuvent jouer le rôle d'agents doubles (Alfano et Collmer, 2004; Bent et Mackey, 2007). A l'heure actuelle, les exemples d'AvrPto et AvrPtoB, détaillés plus loin, en sont les exemples les mieux caractérisés.

## **B. Facteurs d'avirulence**

**AvrA.** AvrA est un gène d'avirulence de *R. solanacearum*, responsable de l'élicitation de la HR chez le Tabac, mais sa disruption n'induit pas pour autant le développement de la maladie (Carney et Denny, 1990; Robertson et al., 2004). Une étude récente a permis de mieux comprendre la structure de cet effecteur. Elle a tout d'abord montré que les premiers 58 acides-aminés N-terminaux sont suffisants pour son injection dans la cellule végétale. De plus, une région de 18 acides aminés, qui contient des insertions de nombre variable de répétitions en tandem (VNTR), est spécifiquement impliquée dans l'élicitation de la HR sur *N. benthamiana* (Poueymiro et al., 2009).

**PopP1.** Des mutants de *R. solanacearum* déficients pour ce gène deviennent pathogènes sur Pétunia, qui est résistant à la souche sauvage. Ce gène se comporte donc typiquement comme un gène d'avirulence. Il a la particularité d'avoir une expression constitutive et donc de ne pas être co-régulé avec la transcription des gènes *hryp* (Lavie et al.,



**Figure 12. Modèle d'action de la protéase AvrPphB dans une plante d'Arabidopsis exprimant la protéine de résistance RPS5 infectée par *P. syringae* (Hotson et al., 2004).**

L'effecteur AvrPphB s'autoclive avant d'être délivré dans la cellule végétale par le SST3. *In planta*, l'effecteur AvrPphB est acétylé et adressé vers la membrane plasmique. PBS1 est alors clivé par AvrPphB. Le clivage et l'auto-phosphorylation de PBS1 sont tout deux requis pour l'activation des réponses de défense médiées par RPS5.

2002). Concernant le Tabac, seule la double inactivation de *popP1* et *avrA* de la souche GMI1000 peut induire son flétrissement (Poueymiro et al., 2009).

**PopP2.** PopP2 (Pseudomonas outer protein P2) est un effecteur de *R. solanacearum* qui interagit avec le gène de résistance d'Arabidopsis RRS1. RD19 est une cystéine protéase qui interagit avec PopP2. Son expression est induite par l'inoculation avec *R. solanacearum* et est requise pour la résistance médiée par RRS1. RD19 est normalement localisée dans des compartiments associés à la vacuole. Suite à l'expression de PopP2, elle est spécifiquement relocalisée au niveau du noyau où les deux protéines vont alors physiquement interagir, permettant alors l'activation de la résistance (Deslandes et al., 2003; Bernoux et al., 2008).

**AvrPphB :** De nombreux effecteurs avec une fonction cystéine protéase ont été identifiés chez les différentes bactéries pathogènes étudiées. Des travaux ont permis de mettre en évidence que la protéolyse de substrats hôtes était une stratégie déployée par les bactéries pathogènes pour altérer la physiologie de leurs hôtes par divers mécanismes. Les cystéines protéases seraient impliquées dans la virulence des agents pathogènes mais également dans l'induction du système immunitaire de l'hôte. Parmi elles, on peut citer notamment AvrPphB de *P. syringae*, qui induit la HR dans les plantes d'Arabidopsis possédant la protéine de résistance RPS5 (Figure 12) (Simonich et Innes, 1995). L'activité de RPS5 requiert la présence de PBS1, qui possède une activité autophosphorylase (Swiderski et Innes, 2001). Les trois partenaires présentent des motifs de myristoylation potentielle, ce qui laisse penser à une localisation au niveau de la membrane plasmique (Strecker et al., 2006). AvrPphB s'autocliverait dans la cellule bactérienne avant son injection, puis il cliverait PBS1 au niveau de la membrane plasmique, relarguant un fragment possiblement phosphorylé. Ce fragment activerait alors la résistance dépendante de RPS5 (Shao et al., 2003).

## **C. Facteurs de virulence**

Les ET3s sont largement recensés dans leurs rôles de promotion de la virulence des bactéries pathogènes. Les bactéries sont capables d'affecter une grande variété de cibles potentiels et de mécanismes cellulaires de l'hôte. La perturbation des fonctions cellulaires de l'hôte pourra permettre la multiplication bactérienne, la mise en place de la maladie et la suppression de l'immunité de l'hôte. Plusieurs exemples sont illustrés ici.

### ➤ Différentes localisations cellulaires

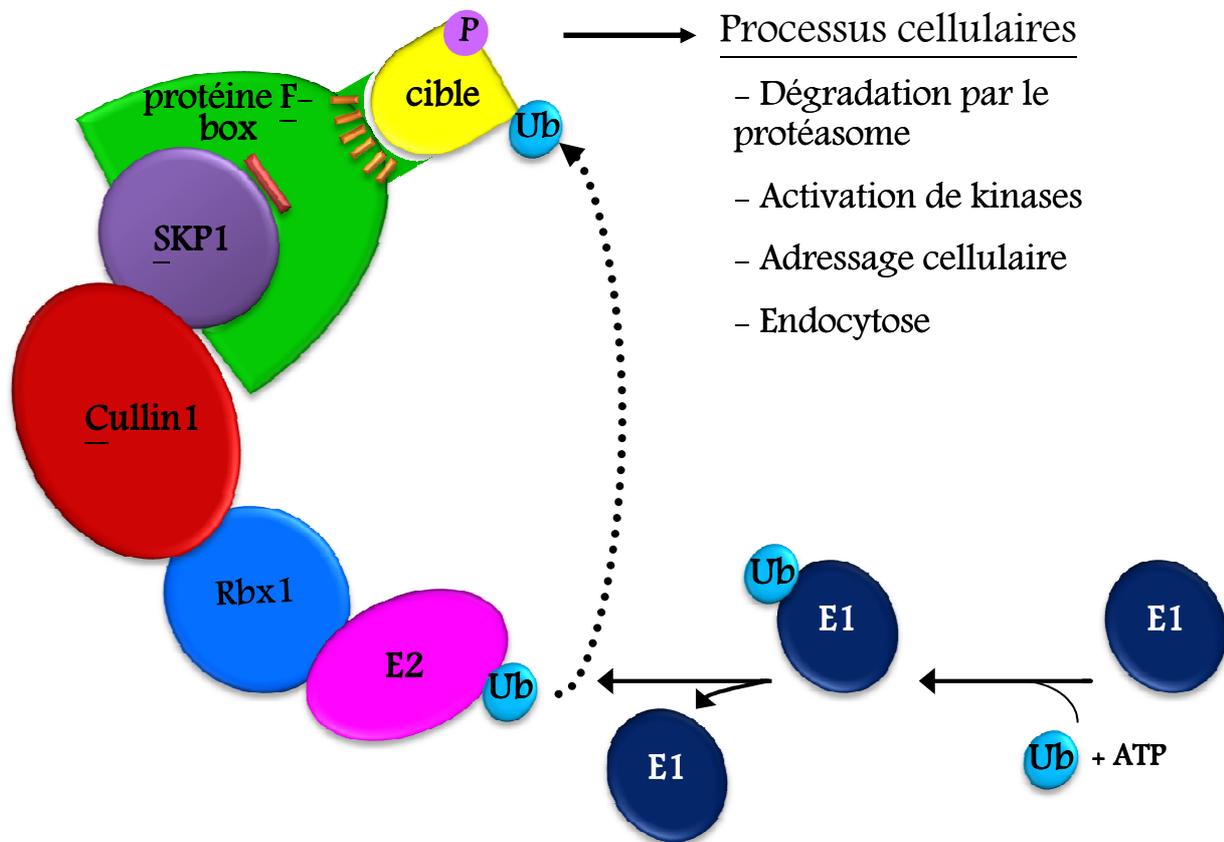
La localisation subcellulaire des effecteurs après injection est variable. On peut les retrouver au niveau de la membrane plasmique ou de différents organites. Elle est nécessaire pour permettre la pleine virulence de l'agent pathogène et nous donne des indices sur les fonctions potentielles des effecteurs chez l'hôte.

**HopI1.** Une grande partie des effecteurs de *P. syringae* a une localisation prédite au niveau du chloroplaste ou de la mitochondrie (Guttman et al., 2002). L'effecteur de *P. syringae* HopI1, par exemple, présente une localisation potentielle au niveau du chloroplaste, site de biosynthèse du SA, où il y activerait une Heat Shock Protéine de 70 KDa (HSP70). HopI1 causerait un remodelage dans la structure thylakoidienne et supprimerait l'accumulation de SA, permettant ainsi la mise en place de la maladie chez le Tabac (Jelenska et al., 2007).

**La famille AvrBs3 :** Des signaux d'adressage nucléaire ont été identifiés chez plusieurs effecteurs. Les membres de la famille AvrBs3 présentent en région C-terminale un tel signal. Cette localisation est nécessaire à la fonctionnalité des protéines de cette famille. Elles possèdent un domaine d'activation acide caractéristique des activateurs transcriptionnels eucaryotes et pourraient donc avoir un rôle de modulateur d'expression des gènes de la cellule hôte. La virulence de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur Riz est fortement dépendante de cette classe particulière d'effecteur (Yang et al., 2000; Yang et White, 2004).

### ➤ Utilisation de modifications post-traductionnelles pour détourner des voies de l'hôte :

Les modifications post-traductionnelles incluant la myristoylation, la sumoylation, la phosphorylation ou l'ubiquitination sont des outils régulant la stabilité, l'activité ou la localisation des protéines. Ce sont des mécanismes rapides, réversibles, contrôlés et très spécifiques qui sont impliqués dans la régulation fine des mécanismes cellulaires. Ce sont donc des cibles privilégiées pour les effecteurs qui peuvent détourner ces procédés, permettant alors le développement de la maladie (Stulemeijer et Joosten, 2008).



**Figure 13. Le processus d'ubiquitination par le complexe SCF (d'après Angot et al., 2007).**

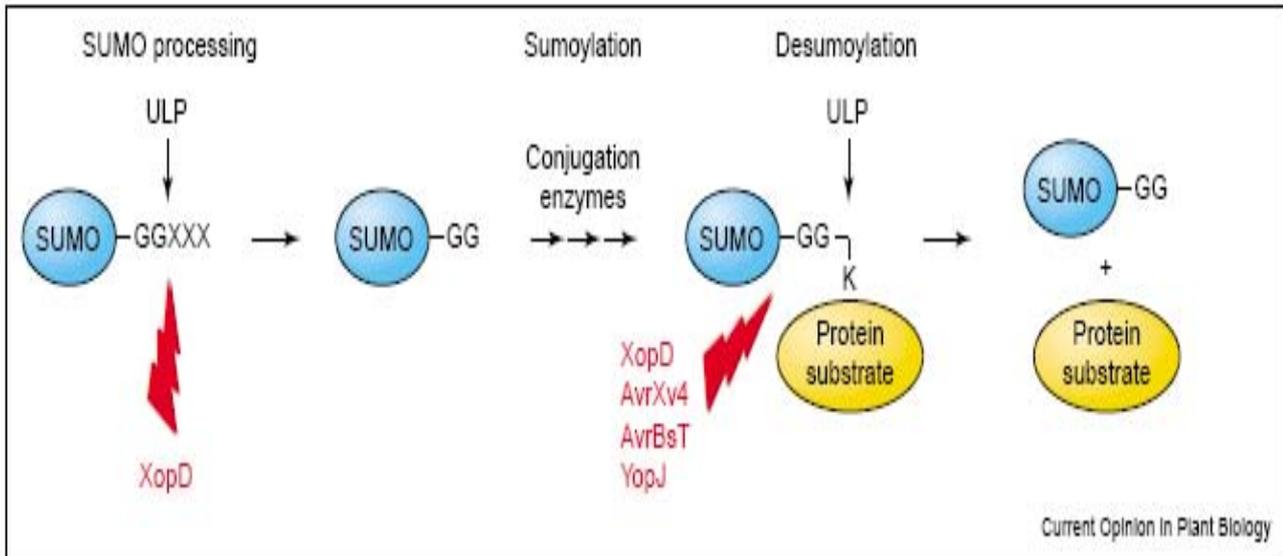
L'ubiquitination d'une protéine cible nécessite l'intervention successive de trois enzymes, E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison) et une ligase E3 (le complexe multimérique avec SKP1, Cullin1 et protéine F-box (SCF)). La protéine Rbx1 à domaine RING permet d'associer le complexe SCF avec l'enzyme de conjugaison E2. La protéine F-box se lie à SKP1 par le domaine F-box situé à l'extrémité N-terminale (rectangle rouge) et elle reconnaît la protéine cible phosphorylée (P) grâce à son extrémité C-terminale possédant un motif d'interaction protéine-protéine (rectangles orange). L'attachement de l'ubiquitine à la protéine cible se réalise entre le résidu glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine cible. D'autres ubiquitines peuvent se rajouter sur un résidu lysine de l'ubiquitine précédente. En fonction du résidu lysine ubiquitiné de la protéine cible, la modification pourra entraîner différents processus cellulaires dont le principal est la dégradation par le protéasome.

**L'ubiquitination** : C'est un processus cellulaire eucaryote complexe qui consiste en l'addition covalente d'ubiquitine sur les protéines cibles par un complexe protéique désigné. C'est un signal de dégradation via le protéasome, mais en fonction de la topologie de la polyubiquitination, cela peut aussi résulter en un changement de propriété de la protéine cible. Ce procédé joue un rôle primordial dans le turn-over des protéines, la régulation transcriptionnelle ou la signalisation hormonale. Il est donc la cible de beaucoup d'effecteurs. Certaines protéines effectrices GALA de *R. solanacearum* sont capables de détourner ce processus en interagissant avec la protéine de plante SKP1-like qui fait partie du complexe ubiquitine ligase de type SCF (Figure 13). Le recrutement des GALAs engendrerait alors l'ubiquitination de protéines cibles qui seraient alors dégradées ou verraient leurs fonctions modifiées. On ne connaît pas encore les cibles de ce mécanisme mais cela pourrait aussi bien être des protéines de l'hôte permettant la mise en place de la maladie, ou de la bactérie car la régulation du turn-over des effecteurs est très importante pour l'agent pathogène (Angot et al., 2006; Angot et al., 2007; Zhou et Chai, 2008).

Les membres de la famille d'effecteurs YopJ ont comme substrat des molécules ubiquitine-like très conservées, qui sont additionnées de manière covalente à de nombreuses protéines régulatrices. Cette famille d'effecteurs exerce son pouvoir pathogène sur les cellules en perturbant cette modification post-traductionnelle (Orth et al., 2000; Orth, 2002).

**Myristoylation**. Nimchuk *et al.* (2000) ont démontré que plusieurs effecteurs de type III de *P. syringae* ont pour cible la membrane plasmique de la cellule et que cette localisation est nécessaire pour que leur activité soit complète. La localisation efficace des effecteurs AvrB, AvrRpm1 et AvrPto de *P. syringae* requiert des sites consensus de myristoylation afin qu'ils puissent être myristoylés dans la cellule hôte. Ces effecteurs utilisent donc des modifications post-traductionnelles spécifiques des eucaryotes pour accomplir leurs fonctions (Nimchuk et al., 2000).

**Sumoylation** : Parmi les cystéines protéases déjà mentionnées, on peut également citer les effecteurs Yop J (Orth et al., 2000), XopD (Hotson et al., 2003), AvrXv4 (Roden et al., 2004) et AvrBsT (Orth et al., 2000), qui ont des similitudes avec des protéases ubiquitin-like (ULP) et qui sont soupçonnés de mimer leurs actions dans la cellule hôte (Hotson et Mudgett, 2004). Les ULPs participent à la dynamique de sumoylation/désomoylation (Figure



**Figure 14. Représentation de la voie de sumoylation des eucaryotes et de l'action d'effecteurs de type III (Hotson et al., 2004).**

SUMO, le régulateur ubiquitine-like, est lié post-traductionnellement à une protéine par un système de conjugaison analogue au système ubiquitine. La sumoylation est un processus réversible qui est contrôlé par les peptidases ULPs. Ces dernières clivent un précurseur SUMO inactif pour générer un régulateur qui a un résidu glycine en extrémité C-terminale. Ce résidu glycine se lie à un résidu lysine (K) de la protéine substrat. Les ULPs sont ensuite capables de désuimoyer le conjugué protéine-SUMO par clivage. Les effecteurs XopD, AvrXv4 et AvrBsT de *Xanthomonas* et YopJ de *Yersinia* miment l'activité enzymatique ULP et perturbent donc la voie de régulation de la sumoylation.

14) qui intervient dans divers processus comme le transport nucléaire, la régulation de l'activité enzymatique ou transcriptionnelle. Le contrôle de cette voie par l'agent pathogène lui confère un avantage indéniable face à son hôte, en permettant de détourner nombre de ses fonctions cellulaires.

### ➤ Suppression de l'immunité de l'hôte

Une des finalités du détournement du métabolisme de l'hôte est la suppression de ses défenses, qui est une étape fondamentale pour le développement de la maladie. Une grande partie des effecteurs agit donc dans ce but, en ciblant divers mécanismes incluant la HR, la défense pariétale ou la signalisation hormonale (Abramovitch et Martin, 2004; Gohre et Robatzek, 2008; Spoel et Dong, 2008; Zhou et Chai, 2008).

**HopM1** : C'est un effecteur conservé de *P. syringae* qui joue un rôle dans sa virulence. Il a pour cible une protéine d'Arabidopsis associée à son système immunitaire, AtMIN7. HopM1 exploite le protéasome de l'hôte pour dégrader sa cible, court-circuitant alors la mise en place de la défense (Nomura et al., 2005; Nomura et al., 2006).

**Modulation de la voie JA par des effecteurs** : Le pouvoir pathogène de la souche DC3000 de *P. syringae* dépend des effecteurs injectés et de la phytotoxine coronatine, que l'on soupçonne de mimer l'action du JA. L'inoculation par cette souche active la transcription chez Arabidopsis d'un facteur de réponse à l'éthylène, RAP2.6. Cette induction est nécessaire à la mise en place de la maladie et dépend du gène COI1, impliqué dans la signalisation du JA. La coronatine et au moins 5 effecteurs seraient impliqués dans cette induction : AvrB, AvrRpt2, AvrPphB, HopPtoK, et AvrPphEPTo. Comme nous l'avons vu, cela pourrait permettre à la bactérie de perturber les voies de signalisation hormonale impliquées dans la mise en place des défenses (Zhao et al., 2003; Abramovitch et Martin, 2004; He et al., 2004).

## **D. Des agents doubles : AvrPto et AvrPtoB**

Avr Pto et AvrPtoB sont des effecteurs de *P. syringae* connus pour avoir un double rôle en fonction des interactions avec l'hôte. D'une part, ils vont induire le système immunitaire des plantes portant le gène de résistance Pto correspondant en modulant son activité kinase. D'autre part, ils vont induire le développement des symptômes sur les hôtes

sensibles (Xing et al., 2007; Zipfel et Rathjen, 2008). Ces deux effecteurs ont peu d'homologies de séquence, si ce n'est les acides aminés nécessaires à l'interaction avec Pto (Kim et al., 2002). Une étude a montré que ces deux effecteurs agissent en amont de la cascade de MAPK impliquée dans la PTI afin de l'inhiber (He et al., 2006). Une autre étude a montré que ces deux effecteurs induisent le développement de la maladie sur feuille de Tomate en provoquant une régulation positive de *LeACO1* et *LeACO1*, deux gènes impliqués dans la production d'éthylène (Cohn et Martin, 2005).

**AvrPto** : Des travaux récents ont montré qu'AvrPto pouvait se lier à des récepteurs kinases de la plante, incluant FLS2 et AFR d'Arabidopsis et LeFLS2 de la Tomate, afin de bloquer les réponses immunitaires de l'hôte. Pto et FLS2 ont des homologies de séquences et seraient en compétition pour la liaison avec AvrPto (Xiang et al., 2008). Une autre étude sur Arabidopsis a montré que l'expression transgénique de cet effecteur réprime un set spécifique de gènes et compromet la défense pariétale de l'hôte. Cet effecteur serait responsable du dépôt de callose pariétal impliqué dans un mécanisme de défense indépendant du SA (Hauck et al., 2003).

**AvrPtoB** : Ce serait une E3 ligase pouvant interagir avec une kinase de l'hôte impliquée dans la mise en place de son système immunitaire, Fen. AvrPtoB induirait l'ubiquitination de cette protéine entraînant alors sa dégradation par le protéasome, permettant la mise en place de la maladie (Rosebrock et al., 2007).

## **E. Cas particulier des harpines**

Ce sont les premières protéines de bactéries phytopathogènes sécrétées par le SST3 à avoir été identifiées, avec HrpN d'*E. amylovora* (Wei et al., 1992), HrpZ de *P. syringae* (He et al., 1993) et PopA de *R. solanacearum* (Arlat et al., 1994). Bien que ne présentant pas d'homologies dans leurs séquences primaires, ces protéines ont plusieurs caractères en commun. Ce sont des protéines riches en glycine et pauvres en cystéine, capables d'induire une réaction nécrotique de type HR après infiltration dans le parenchyme foliaire de Tabac et qui gardent leurs activités après un traitement à 100°C (Boucher et al., 2001). Le rôle précis de ces protéines reste encore à élucider. HrpN d'*E. amylovora* semble être impliquée dans l'agrégation cellulaire (Yap et al., 2006), induirait la production de ROS (Baker et al., 1993) et des mutants déficients de cette harpine sont altérés dans leur pouvoir pathogène

(Bauer et al., 1995). En revanche, les mutants de *R. solanacearum* déficients pour PopA ne semblent pas altérés dans leur pouvoir pathogène sur Pétunia (Arlat et al., 1994). On sait aussi que HrpZ de *P. syringae* peut s'insérer spontanément dans une bicouche lipidique pour former des canaux ioniques (Tampakaki et Panopoulos, 2000; Lee et al., 2001; Lee et al., 2001). Ces données suggèrent une implication potentielle des harpines dans la mise en place d'un pore au niveau de la membrane plasmique de l'hôte. On peut aussi penser que leurs rôles seraient de faciliter la pénétration du *pilus* en modifiant la porosité de la paroi ou que les pores formés aient un rôle trophique en permettant l'efflux de nutriments.

Des harpines ont été identifiées dans toutes les subdivisions taxonomiques des bactéries pathogènes dotées d'un SST3 (Alfano et Collmer, 1997; Ahmad et al., 2001). Ces protéines se distinguent des autres protéines sécrétées par le SST3 car leurs rôles dans le pouvoir pathogène et le spectre d'hôte ne sont pas encore clairement établis et elles sont actives à l'extérieur de la cellule hôte (Tampakaki et Panopoulos, 2000). C'est pour ces raisons qu'elles ne sont pas classées dans la catégorie des ET3s *stricto sensu*.

## F. Les effecteurs de *R. solanacearum*

Les effecteurs de *R. solanacearum* ont été identifiés en majorité grâce à la connaissance de la régulation du SST3 par HrpB. Il a tout d'abord été défini un motif d'ADN conservé de 25 nucléotides (*hrpII box*) conférant une activation dépendante de *hrpB* (Cunnac et al., 2004). Ce motif, ainsi que l'analyse de motifs prédisant une fonction potentielle dans la cellule eucaryote ou de séquences signal d'export dans partie N-terminale a permis l'identification de nombreux candidats (Cunnac et al., 2004). Par la suite, l'analyse du profil transcriptomique de mutant *hrpB* (Occhialini et al., 2005) et le criblage génétique de gènes régulés par *hrpB* (Mukaihara et al., 2004), ont permis de recenser un total de 74 effecteurs potentiels dans la souche GMI1000 dont 34 sont conservés parmi les souches de *R. solanacearum* (Poueymiro et Genin, 2009). La démonstration de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire ou de leur translocation dans la cellule végétale a été faite pour 28 d'entre eux (Poueymiro et al., 2009).

Toutes les disruptions testées ont entraîné pas ou peu de réduction de la virulence sur Tomate et Arabidopsis. Seuls 2 mutants d'effecteurs (AR2 et un homologue d'AvrPphD) présentent des symptômes retardés sur Tomate. Cela conforte l'idée selon laquelle il y aurait

de nombreuses redondances de structure ou de fonction parmi les ET3s, afin notamment de déjouer plus facilement la défense de l'hôte. Cette redondance est illustrée par plusieurs familles multigéniques parmi les effecteurs, dont la famille des GALAs (Cunnac et al., 2004). Il faut une disruption des 7 membres de la famille pour pouvoir observer une réduction de la virulence de *R. solanacearum* sur Tomate et une abolition des symptômes sur Arabidopsis (Angot et al., 2006). Seul GALA7 s'est révélé être un facteur hôte spécifique de *M. truncatula*, sa mutation engendrant une réduction du développement des symptômes (Angot et al., 2006). A l'heure actuelle, aucun rôle de suppression de défense a été clairement établi chez *R. solanacearum*, même si le SST3 supprimerait la formation de HR au niveau des vaisseaux de la Tomate (Vasse et al., 2000).

## **VIII. Etude de la pathologie des légumineuses**

### **A. L'importance des légumineuses**

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont une famille de plante d'une grande importance au niveau agronomique, écologique et nutritif (Cook, 1999). Cette famille regroupe plus de 720 genres et 20000 espèces, qui comprennent de nombreuses plantes de grande culture comme le Soja (*Glycine max*), le Haricot (*Phaseolus Vulgaris*) ou la Luzerne. Elles représentent 12 à 15% des terres cultivables dans le monde et 27% de la production mondiale des cultures (Graham et Vance, 2003). Une caractéristique qui les rend particulièrement intéressante est la mise en place de la symbiose nodulante avec des bactéries, les rhizobia. Ces dernières sont capables de fixer l'azote atmosphérique lorsqu'elles sont au sein des nodules. Elles permettent ainsi une autonomie de la plante en matière de nutrition azotée, qui fournit en échange à la bactérie une nutrition carbonée issue de la photosynthèse. Il en résulte une abondance en azote dans l'ensemble de la plante qui lui confère une richesse en protéine. Les légumineuses sont principalement cultivées pour leurs graines et/ou leurs propriétés fourragères et ont un grand intérêt nutritif pour l'alimentation humaine et animale. Grace à la nodulation, non seulement la plante n'a plus besoin d'apport d'engrais azotés, mais sa culture permet même un enrichissement du sol. La culture et la rotation culturale avec des légumineuses sont donc très intéressantes au niveau

écologique et économique. Pour l'ensemble de ces raisons, la nodulation est un caractère que les agronomes et sélectionneurs ont toujours cherché à favoriser.

Comme nous l'avons vu, la plante retire de grands bénéfices de cette interaction. Elle doit néanmoins contrôler la propagation des bactéries à différentes étapes du processus afin de ne pas épuiser ses ressources. L'étude approfondie de la nodulation depuis des décennies a permis de fortement progresser dans la compréhension de la mise en place et de la régulation de ce processus (Gage, 2004; Mitra et al., 2004; Soto et al., 2009). Par exemple, le nombre de cordons d'infections initiés excède généralement le nombre de nodules formés. Chez *M. truncatula*, 95% des infections sont abortives et la production de ROS et de mécanismes de type HR pourraient être impliqués dans cette régulation (Vasse, 1993; Penmetsa et Cook, 1997; Santos et al., 2001). Une autre étude montre également un contrôle du nombre de primordia nodulaires formés par la plante, qui semble impliquer la voie du SA (Van Spronsen et al., 2003). Ensuite, la formation des nodules est également finement régulée par le partenaire végétal. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la voie de biosynthèse de l'éthylène ou du mutant de transduction de cette hormone (*sk1*) semble indiquer qu'elle serait impliquée dans le contrôle du nombre de nodules formés (Penmetsa et Cook, 1997; Oldroyd et al., 2001) et leur localisation (Heidstra et al., 1997).

L'implication des ROS, de lésions de type HR, du SA ou de ET indique qu'il pourrait y avoir un parallèle entre la régulation de ce processus et la mise en place du système immunitaire des plantes face à un agent pathogène. Il est d'ailleurs intéressant de constater que certains Rhizobia possèdent un SST3 comparable à ceux des bactéries pathogènes et que sa mutation peut avoir des conséquences sur la mise en place de la nodulation et la spécificité d'hôte. Des gènes *nodulation outer protein (NOP)* présentant des homologies avec des gènes d'avidité injectés par des SST3 ou SST4 de bactéries pathogènes ont également été mis en évidence chez plusieurs Rhizobia (Marie et al., 2001; Deakin et Broughton, 2009).

Les différents résultats sur les mécanismes de contrôle du processus symbiotique ont amené une question émergente depuis une dizaine d'années, la plante utilise-t-elle ou non les mêmes voies pour contrôler la propagation des deux types de micro-organismes (Mithofer, 2002; Shaw et Long, 2003; Soto et al., 2006; Soto et al., 2009) ? La

réponse à cette question est capitale en agronomie car l'amélioration des capacités nodulantes ne doit pas se faire à la faveur de la prolifération des maladies et inversement.

## **B. Etude de *M. truncatula***

### **1) *M. truncatula*, plante modèle des légumineuses**

Parmi les légumineuses étudiées, deux plantes modèles se distinguent, *M. truncatula* et le Lotier (*Lotus japonicus*). Il était nécessaire de développer des modèles dans cette famille car la plante modèle Arabidopsis ne peut pas mettre en place de symbiose. Les deux légumineuses modèles représentent les deux types majeurs de développement nodulaire, *M. truncatula* formant des nodules indéterminés et le Lotier des nodules déterminés. La plante étudiée au cours de cette thèse est *M. truncatula*. Cette espèce présente un grand intérêt, notamment car elle est très proche de la légumineuse fourragère cultivée *M. sativa*. *M. truncatula* est une espèce diploïde, ce qui rend son étude plus aisée que sa cousine tétraploïde. *M. truncatula* est une espèce de petite taille, autogame, dotée d'un petit génome (moins de 500 Mpb), avec un court temps de génération (6 mois de graine à graine) et une relativement bonne capacité à être transformée. Ces caractéristiques ont fait d'elle un outil avantageux pour les études génétiques ou génomiques et elle est maintenant entièrement séquencée (Cook, 1999; Chabaud et al., 2003; Young et al., 2005; Crane et al., 2006). On dispose maintenant d'une carte physique et génétique de grande densité, d'une large collection de mutants et de protocoles permettant des études transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. Tous ces outils ouvrent de grandes perspectives pour la recherche fondamentale et l'application de ces recherches en agronomie sur des légumineuses cultivées (Choi et al., 2004; Mudge et al., 2005; Young et Udvardi, 2009).

### **2) *M. truncatula*, plante modèle des légumineuses pour la pathologie racinaire**

Si *M. truncatula* est une plante largement étudiée pour ses capacités nodulantes, la compréhension des mécanismes de défense de cette espèce est primordiale. En effet, les légumineuses subissent de nombreuses attaques d'agents pathogènes et *M. truncatula* est utilisée comme modèle dans de nombreux pathosystèmes (Tivoli et al., 2006). Ces derniers impliquent aussi bien des agents pathogènes foliaires fongiques comme par exemple

*C. trifolii* (Torregrosa et al., 2004) ou *Phoma medicagenis* (Ellwood et al., 2006) que bactériens comme *P. syringae* (Bozso et al., 2009). Les mécanismes de résistance de *M. truncatula* aux insectes comme le puceron du Pois *Acyrtosiphon pisum* sont également étudiés (Gao et al., 2008). L'interaction symbiotique nodulante se déroulant au niveau des racines, il est également intéressant de développer des pathosystèmes avec des agents pathogènes racinaires dont nous verrons ici les principaux étudiés à l'heure actuelle.

***Aphanomyces euteiches*** : Cet oomycète est l'agent responsable de la pourriture racinaire sur de nombreuses légumineuses dont le Pois et la Luzerne. *M. truncatula* sert de modèle pour la compréhension des mécanismes d'infection et de défense mis en jeu au cours de l'interaction. L'agent pathogène pénètre son hôte par les racines primaires et latérales, qu'il va coloniser de manière principalement extracellulaire. Ces racines vont ensuite brunir ainsi que l'hypocotyle, entraînant le mort de l'individu colonisé (Gaulin et al., 2007). Des études protéomiques ont permis de mieux comprendre la mise en place des défenses par *M. truncatula* et on retrouve des mécanismes décrits précédemment chez *Arabidopsis* comme l'induction de protéines PR (Nyamsuren, 2003; Colditz et al., 2004; Colditz et al., 2005; Pilet-Nayel et al., 2009). Un gène majeur conférant la résistance de *M. truncatula* à *A. euteiches*, *AER1*, a récemment été identifié (Pilet-Nayel et al., 2009).

***Orobanche crenata*** : *M. truncatula* est également une plante modèle pour l'étude de l'interaction entre *O. crenata* et les hôtes spécifiques de cette espèce, les légumineuses. L'Orobanche est une plante parasite qui s'attaque aux racines de ses hôtes et cause des dommages sur de nombreuses espèces dans le monde. Ce sont des holoparasites qui se connectent aux tissus conducteurs de leurs hôtes pour permettre un échange d'eau, de nutriments, de toxines, d'hormones etc. Les mécanismes de résistance mis en évidence à ce jour sont notamment des renforcements pariétaux des tissus conducteurs avec des composés phénoliques proches des zones d'envahissement du parasite (Lozano-Baena et al., 2007; Perez-de-Luque et al., 2007).

**Nématodes** : il existe chez ces vers ronds des parasites racinaires de plante, répartis notamment en deux sous-groupes, les nématodes à kyste (par ex. *Heterodera sp.*) et les nématodes à galle (par ex. *Meloidogyne sp.*). Ils causent des dégâts annuels considérables et *M. truncatula* est une espèce utilisée pour l'étude de ses mécanismes d'infection et les mécanismes de défense mis en œuvre par ses hôtes. Des études ont montré que la résistance

à ces agents pathogènes n'implique pas de HR. Les nématodes sont capables de pénétrer à proximité de l'extrémité racinaire, de la même manière chez les variétés sensibles ou résistantes. Pourtant, moins que 5% des populations de nématode complètent leurs cycles de vie dans les hôtes résistants. Ils se développent en mâle ou meurent à l'intérieur des racines à l'état de larve non développée. Les mécanismes permettant la mise en place de cette résistance restent à élucider. Cependant, une étude récente a révélé que chez DZA045, un seul gène semblait être responsable de la résistance à *Meloidogyne, SPC* (Dhandaydham et al., 2008).

### **3) Le pathosystème *M. truncatula/R. solanacearum***

Les études précédentes ont permis de faire progresser la compréhension du système immunitaire des légumineuses et les éventuelles spécificités d'une interaction pathogène au niveau racinaire. Cependant, dans l'optique d'une étude de l'éventuelle interaction entre mécanismes de défense et symbiotique, une compréhension plus fine des mécanismes de défense des légumineuses face à une bactérie pathogène racinaire est nécessaire. Dans cette optique, un pathosystème comprenant *M. truncatula* et la bactérie pathogène racinaire *R. solanacearum* a été mis en place au laboratoire (Vaillau et al., 2007).

28 souches de *R. solanacearum* ont été inoculées sur racine coupée des lignées Jemalong A17 et F83005.5 cultivées en Jiffys®. Le suivi d'apparition du flétrissement des parties aériennes a permis de mettre en évidence des interactions différentielles. Le pathosystème impliquant les lignées A17 et F83005.5, respectivement sensible et résistante à la souche GMI1000 a été défini. Des études quantitatives ont montré une réduction de  $10^5$  cfu/ml chez la lignée résistante. Le développement des symptômes de la lignée sensible A17 s'est révélé être dépendant d'un SST3 fonctionnel. Comme vu précédemment, ces études ont également permis de révéler la présence d'un QTL de résistance majeur sur le chromosome 5. Le pathosystème a également été étudié en condition *in vitro* suite à une inoculation sur racine coupée et l'interaction différentielle entre les lignées A17 et F83005.5 avec la souche GMI1000 a également été observée.

## IX. Projet de thèse

Les résultats publiés ont permis de montrer qu'une bactérie pathogène racinaire, *R. solanacearum*, était capable d'infecter *M. truncatula* (Vailleau et al., 2007). Ce pathosystème ouvre donc des portes à l'étude des éventuelles interactions croisées entre système immunitaire et régulation du processus symbiotique. Les rhizobia envahissent leurs hôtes par les poils absorbants situés dans la zone d'élongation de la racine, mais cette zone est excisée lors de l'inoculation telle qu'elle a été publiée. Afin de pouvoir dresser d'éventuels parallèles dans la régulation de la pénétration et de la propagation des deux types de bactéries, il était important de pouvoir étudier une interaction pathogène sur racine intacte.

Le pathosystème impliquant les lignées A17 et F83005.5 avec la souche GMI1000 a donc été étudié en laissant les racines intactes au cours de l'inoculation. La condition *in vitro* a été privilégiée car elle nous permet d'avoir accès au système racinaire et de faire ainsi des études cytologiques fines. Le même différentiel a été obtenu et le pathosystème comprenant les lignées A17 et F83005.5 a donc servi à l'étude des mécanismes de pénétration de *R. solanacearum* chez *M. truncatula*.

L'étude du processus infectieux de *R. solanacearum* chez *M. truncatula* nous a permis de mettre en évidence une zone clé de cette interaction, l'extrémité racinaire. En effet, c'est le lieu de pénétration de la bactérie et du développement de symptômes racinaires. Dans un premier temps, une étude fine de ces symptômes racinaires a été réalisée. Cette analyse a permis l'identification de deux ET3s impliqués dans la mise en place des symptômes racinaires et la colonisation bactérienne, et a fait l'objet d'une publication dans *Plant Physiology* qui sera présentée dans une première partie de ce manuscrit. Afin d'affiner et d'enrichir l'étude de ce pathosystème, l'interaction sera ensuite présentée du côté du partenaire bactérien. La mise en évidence de l'implication de SST3 et des effecteurs bactériens dans la mise en place des symptômes racinaires et de la colonisation bactérienne sera détaillée ainsi que les cribles qui ont permis de mieux comprendre les différentes étapes de la colonisation bactérienne. Pour finir, l'interaction sera observée du côté du partenaire végétal. L'implication de l'éthylène à différentes étapes du processus infectieux sera tout d'abord examinée. Ensuite l'étude des modifications cellulaires se déroulant à l'extrémité de la racine suite à l'infection par *R. solanacearum* sera présentée. Nos résultats montrent que

parmi les modifications observées, certaines semblent liées à la sensibilité et l'infection de la bactérie, alors que d'autres semblent liées à la résistance de la plante.

# RESULTATS

# RESULTATS

Les résultats présentés dans cette thèse retracent l'étude de l'interaction entre *R. solanacearum* et *M. truncatula*. Dans une première partie, nos travaux publiés dans Plant Physiology seront présentés. Cette publication expose l'identification de symptômes racinaires communs aux lignées F83005.5 et A17, respectivement résistante et sensible à la souche GMI1000. Le processus infectieux de cette souche et la mise en évidence de deux effecteurs bactériens impliqués à différentes étapes de l'infection chez la lignée sensible y sont également décrits. Les données présentées ensuite viendront préciser et enrichir la compréhension de l'interaction pathogène étudiée. Dans une seconde partie, nous détaillerons la mise en place des symptômes racinaires suite à l'inoculation par *R. solanacearum*. Dans une troisième partie, nous nous placerons du côté du partenaire bactérien. Dans ce cadre, nous étudierons l'implication du SST3 dans l'interaction. Nous verrons ensuite la capacité de la bactérie à coloniser des racines intactes ou coupées. Cette dernière condition permet à la bactérie de s'affranchir de l'étape de pénétration à travers l'épiderme puis le cortex de l'extrémité racinaire, pour atteindre directement les vaisseaux conducteurs. Dans la dernière partie, nous nous placerons du côté du partenaire végétal. Nous examinerons tout d'abord l'implication de l'éthylène au cours de l'interaction. Nous analyserons ensuite les modifications cellulaires liées à l'infection par *R. solanacearum* et notamment le rôle de son SST3.

**I. Publication “ Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development”**  
**publiée dans Plant physiology**

# Dissection of Bacterial Wilt on *Medicago truncatula* Revealed Two Type III Secretion System Effectors Acting on Root Infection Process and Disease Development<sup>[C][W][OA]</sup>

Marie Turner, Alain Jauneau, Stéphane Genin, Marie-José Tavella, Fabienne Vaillau, Laurent Gentzbittel, and Marie-Françoise Jardinaud\*

Université de Toulouse, INPT, Laboratoire Symbiose et Pathologie des Plantes, ENSAT, BP 31607 Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France (M.T., M.-J.T., F.V., L.G., M.-F.J.); Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, UPS-CNRS UMR 5546, 31326 Castanet-Tolosan, France (A.J.); and Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes, INRA/CNRS UMR 441/2594, 31326 Castanet-Tolosan, France (S.G.)

*Ralstonia solanacearum* is the causal agent of the devastating bacterial wilt disease, which colonizes susceptible *Medicago truncatula* via the intact root tip. Infection involves four steps: appearance of root tip symptoms, root tip cortical cell invasion, vessel colonization, and foliar wilting. We examined this pathosystem by in vitro inoculation of intact roots of susceptible or resistant *M. truncatula* with the pathogenic strain GMI1000. The infection process was type III secretion system dependent and required two type III effectors, Gala7 and AvrA, which were shown to be involved at different stages of infection. Both effectors were involved in development of root tip symptoms, and Gala7 was the main determinant for bacterial invasion of cortical cells. Vessel invasion depended on the host genetic background and was never observed in the resistant line. The invasion of the root tip vasculature in the susceptible line caused foliar wilting. The *avrA* mutant showed reduced aggressiveness in all steps of the infection process, suggesting a global role in *R. solanacearum* pathogenicity. The roles of these two effectors in subsequent stages were studied using an assay that bypassed the penetration step; with this assay, the *avrA* mutant showed no effect compared with the GMI1000 strain, indicating that AvrA is important in early stages of infection. However, later disease symptoms were reduced in the *gala7* mutant, indicating a key role in later stages of infection.

Very few phytopathogenic bacteria colonize intact plant roots, even if the local soil provides a favorable environment for bacterial growth. Penetration seems to be the limiting step, as most bacteria need natural openings or wounds to invade their hosts and there are few opportunities in roots (Loria et al., 2003). *Ralstonia solanacearum*, a gram-negative soil-borne pathogen responsible for bacterial wilt, naturally invades plants through axils of secondary roots. *R. solanacearum* has to attach to the root, find nutrients, multiply, migrate into plant tissues, and penetrate the xylem in order to cause disease (Vasse, 1995). It has a wide and still-expanding host range that includes several hundred susceptible species in at least 50 different plant families, which include economically

important hosts such as potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), peanut (*Arachis hypogaea*), banana (*Musa* spp.), pepper (*Capsicum annuum*), eggplant (*Solanum melongena*), and tobacco (*Nicotiana tabacum*; Hayward, 1991). The high incidence of plant mortality and the lack of effective control methods make *R. solanacearum* one of the world's most destructive plant pathogens (Prior et al., 1998). This bacterium is a model organism extensively studied by genetic, molecular, and biochemical techniques in order to develop strategies for the control of bacterial wilt.

*R. solanacearum* virulence responds to several environmental stimuli and involves the production of multiple virulence factors (Schell, 2000; Genin and Boucher, 2002). For example, Exopolysaccharide I (EPS I), a large nitrogen-rich acidic exopolysaccharide (Orgambide et al., 1991), is thought to be an important virulence factor. Produced in large amounts by the bacteria, EPS I enhances the speed and extent of stem colonization (Saile et al., 1997) and is presumed to cause wilting by restricting water flow through xylem vessels (Garg et al., 2000). In addition to EPS I, *R. solanacearum* secretes plant cell wall-degrading enzymes through the type II secretion system (T2SS). Pectinolytic enzymes fragment pectin into oligomers, which act as substrates for the bacterial growth (Tans-Kersten et al., 1998); the breakdown of pectin

\* Corresponding author; e-mail [jardinaud@ensat.fr](mailto:jardinaud@ensat.fr).

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Marie-Françoise Jardinaud ([jardinaud@ensat.fr](mailto:jardinaud@ensat.fr)).

<sup>[C]</sup> Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OA]</sup> Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.141523](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.141523)

enhances virulence by facilitating movements through pectin-rich regions such as vascular bundles (Gonzalez and Allen, 2003). Cellulytic enzymes also facilitate invasion of roots and/or penetration of xylem vessels by degrading cellulosic glucans in the cell wall (Liu et al., 2005).

Like many other pathogenic bacteria, *R. solanacearum* possesses a type III secretion system (T3SS), encoded by the *hypersensitive response and pathogenicity (hrp)* genes. In contrast to T2SS, which secretes degrading enzymes, the T3SS allows the injection of effector proteins directly into the plant cell through the hrp pili. The T3SS is essential for pathogenicity, since *R. solanacearum hrp* mutants cannot induce disease in many susceptible plants such as tobacco, tomato, petunia (*Petunia hybrida*), and *Medicago* (Vasse et al., 2000; Kanda et al., 2003; Zolobowska and Van Gijsegem, 2006; Vaillau et al., 2007). All effectors are presumed to facilitate virulence, but on some host cultivars they can be recognized by a cognate resistance protein, thereby triggering host defenses (Stavrinos et al., 2008). Thus, when the cognate resistance protein is present in the host plant, the effectors act as avirulence factors. This recognition response is associated with effector-triggered immunity, which results in a fast and intense plant defense response known as the hypersensitive response (HR). The HR is characterized by localized programmed cell death that helps to limit the infection to the area of initial contact (Jones and Dangl, 2006). In *R. solanacearum* strain GMI1000, 74 T3SS effectors (T3Es) have been identified (Poueymiro and Genin, 2009). To date, three of them have been reported to act as avirulence factors: AvrA is responsible for eliciting an HR in tobacco (Carney and Denny, 1990; Poueymiro et al., 2009); PopP1 acts as a host-specificity determinant toward tobacco (Poueymiro et al., 2009) and petunia (Lavie et al., 2002); and PopP2 interacts with the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) RESISTANT TO RALSTONIA SOLANACEARUM1-R resistance protein (Deslandes et al., 2003).

Some T3Es are virulence factors: they promote pathogenic functions of the bacteria and disrupt defense responses of the host immune system. Several mechanisms by which T3Es suppress plant defense have been described, including the inhibition of plant signaling components and the alteration of host transcription or posttranscriptional processes. Some T3Es are proteases that can degrade defense components through the host ubiquitination machinery and the 26S proteasome (Block et al., 2008). To date, only a few effectors from *R. solanacearum* have been shown to have pathogenicity functions. Gala T3Es are the best characterized; they have an F-box and a Leu-rich repeat domain and interact with ASK (for Arabidopsis SKP1-like) proteins in Arabidopsis (Angot et al., 2006). F-box and ASK proteins are part of ubiquitin E3 ligase complexes that attach ubiquitin to specific proteins, which are subsequently degraded by the 26S proteasome.

This work aims to study the sequence of events related to the T3SS-dependent infection process of *R.*

*solanacearum* on intact plant roots. Many previous studies of plant-*R. solanacearum* interaction involved bacteria delivered directly into the vascular system through artificially wounded roots, in order to increase penetration potential (Deslandes et al., 1998; Vaillau et al., 2007). However, these inoculation procedures bypassed normal infection routes and potential resistance mechanisms. This study focuses on the early steps of the *R. solanacearum* infection process on intact roots. In previous work, the *R. solanacearum* strain GMI1000 was shown to infect the model legume plant *Medicago truncatula* (Vaillau et al., 2007) in an in vitro wounded root system, and susceptible (Jemalong A17) and resistant (F83005.5) lines were identified. In this work, the in vitro inoculation procedure was adapted for intact *M. truncatula* roots, thereby enabling us to study the sequence of events related to the T3SS-dependent infection process. Screening of loss-of-function T3E mutants in the GMI1000 strain on intact roots of the susceptible *M. truncatula* line led to the identification of two virulence effectors, Gala7 and AvrA. We investigated the role of these effectors in various stages of the infection process.

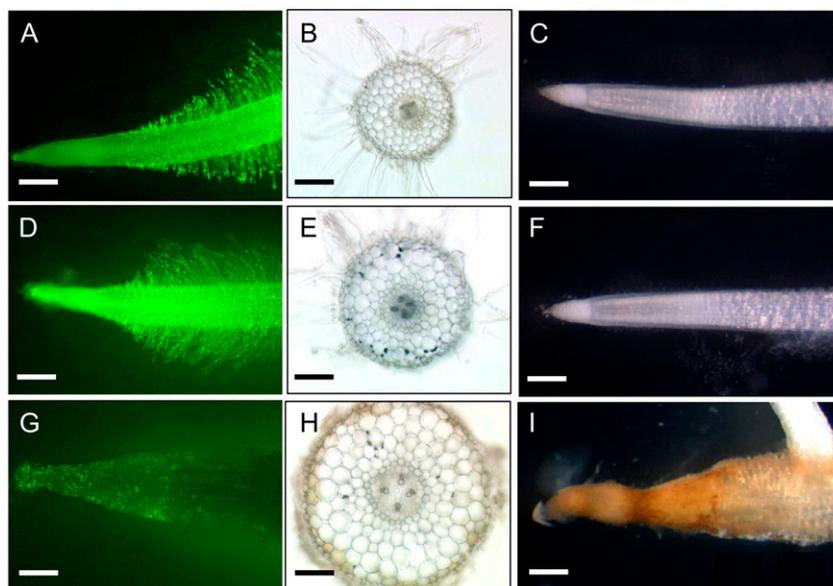
## RESULTS

### The Interaction between *R. solanacearum* and *M. truncatula* Leads to T3SS-Dependent Root Symptoms

In order to study the infection process of *R. solanacearum* in *M. truncatula*, we used an in vitro inoculation procedure of intact roots adapted from Vaillau et al. (2007). It enabled us to observe root symptoms resulting from the interaction between *R. solanacearum* GMI1000 strain and either susceptible (A17) or resistant (F83005.5) lines of *M. truncatula*. The first root symptoms observed, in both susceptible and resistant lines, were an arrest of root hair elongation 18 h post inoculation (hpi) and a substantial reduction in root growth (Student's *t* test,  $P = 2e-16$ ), with no growth occurring after 24 hpi.

Viability of the epidermis and root hairs was monitored by fluorescein diacetate (FDA), which stains living cells (Fig. 1, A, D, and G). The epidermis of the mock inoculation control was viable, as evidenced by green fluorescence. Also, root hair initiation and elongation occurred (Fig. 1, A–C). After inoculation with GMI1000, a loss of fluorescence was first observed at 24 hpi and was complete at 72 hpi, indicating a loss of viability of the root tip epidermis (the root tip was considered the first 2–3 mm of the root; Fig. 1G). In addition, no root hair initiation or elongation was detected, and root tip browning and swelling were observed (Fig. 1, H and I). Root growth arrest, root tip swelling, browning, and epidermis loss of viability will be subsequently referred to “root symptoms.”

Despite the similarity in the root symptoms between resistant and susceptible lines, foliar symptoms were only observed in the susceptible line (A17). The chlo-



**Figure 1.** Symptoms of infection of intact root tips from a susceptible cultivar. *M. truncatula* A17 root symptoms after mock (A–C), T3SS-defective mutant (D–F), or GMI1000 (G–I) inoculation. A, D, and G, Root tip epidermis viability at 3 dpi. Tissues were stained with FDA, which produces bright green fluorescence in living cells. A and D, In the control conditions, the epidermis was intact and showed root hair differentiation and elongation. G, With GMI1000 inoculation, the epidermis showed drastic loss of viability and no root hair differentiation could be observed. Bars = 100 mm. B, E, and H, Root tip transverse sections at 3 dpi (1–2 mm from the root tip). Following GMI1000 inoculation, the root tip was enlarged compared with control conditions. Bars = 70 mm. C, F, and I, Root tip at 7 dpi. Compared with control conditions, roots inoculated with GMI1000 strain showed epidermal browning and root tip deformation. Bars = 100 mm.

rosis and wilting of leaves and cotyledons led to the death of an average of 50% of A17 plants when the experiment was terminated 28 d post inoculation (dpi).

Infection with *R. solanacearum* strains carrying mutations in the regulatory *hrpB* gene (GMI1525) or in the structural T3SS gene *hrcS* (GMI1402) resulted in the absence of root growth arrest at 24 hpi, an intact root tip epidermis at 72 hpi, no swelling and browning at 7 dpi (Fig. 1, D–F), and no wilting of the shoots up to 28 dpi. Root and foliar symptoms, therefore, were dependent on a functional T3SS. Bacterial mutants defective in EPS or T2SS biosynthesis were altered in their ability to induce foliar symptoms but induced root symptoms similar to those caused by GMI1000 (data not shown). Therefore, root symptoms were specifically dependent on T3SS.

#### The Infection of *M. truncatula* by *R. solanacearum* Strain GMI1000 Involves Two Distinct Root Colonization Steps

The bacterial distribution and the internal structure of the root tip were observed at 3 and 7 dpi on the susceptible line using semithin resin sections (Fig. 2). After mock inoculation, the root tip was typically organized (Fig. 2A; Groot et al., 2004). At 3 dpi with GMI1000, bacteria adhered to the epidermis surface (Fig. 2C) and started to colonize the inner root tip, where they were detected in cortical cells and extracellular spaces (Fig. 2D). The root tip (the first 2–3 mm of the root) was the only penetration site detected, with no preferential point of entry in that area. Colonization through axils of lateral roots was never observed. Concomitantly, the root tip structure was altered: the epidermal layer exhibited severe cell damage (as illustrated by the FDA test), enlarged cortical cells were highly vacuolated, supernumerary vessels

were differentiated, and the disorganized meristematic zone showed unconventional vacuolated cells (Fig. 2). At 7 dpi, the cortex was heavily colonized, showing enlarged cells containing numerous bacteria. *R. solanacearum* started to penetrate and proliferate in the vessels of the susceptible line (Fig. 2, E and F) but not in the resistant line.

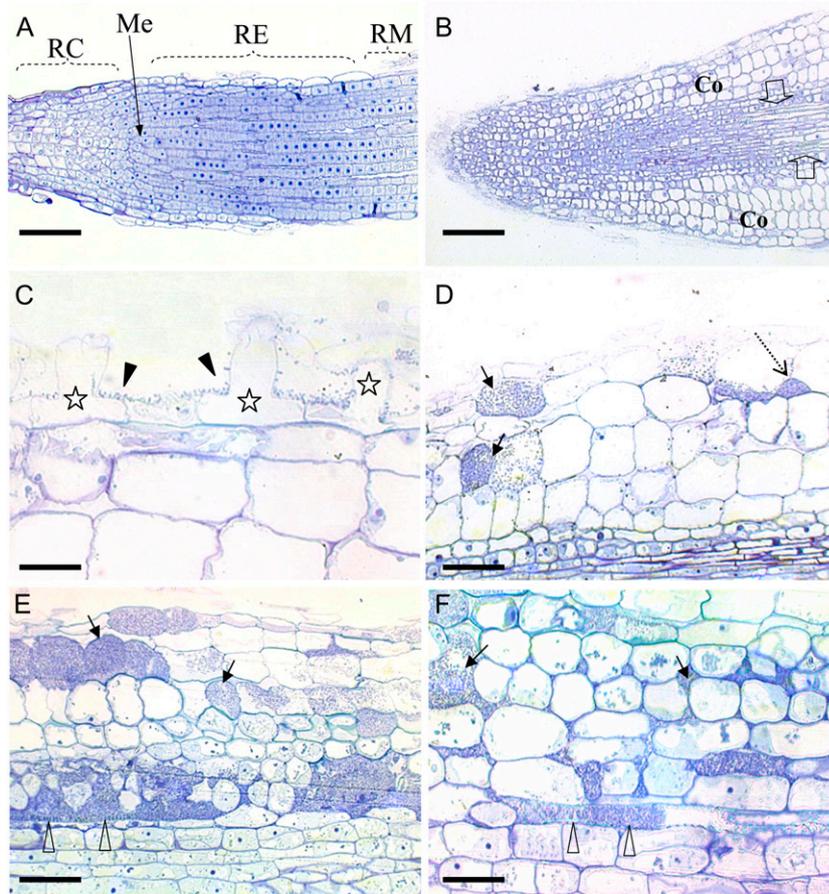
In order to quantify the differential bacteria colonization, infections were conducted using a *R. solanacearum* strain transformed with a constitutive GUS construct (GMI1559; Etchebar et al., 1998). The GUS activity was revealed in planta, and the observations were performed with a stereomicroscope. At 14 dpi, bacteria had crossed the epidermis and colonized the cortical root tip cells of 45% of the F83005.5 plants and 85% of the A17 plants. Bacteria were never observed in the vessels of F83005.5, whereas 55% of the A17 plants had their vessels colonized at 14 dpi.

Thus, two stages in the infection process were clearly identified. The first one, common to the susceptible and the resistant lines, was the bacterial colonization of the root tip cortical cells. Interestingly, a restriction of bacterial propagation was found in the resistant line F83005.5, indicating the possible onset of resistance. The second stage, specific to the susceptible line, was the colonization of the vascular bundles, leading to plant death.

#### The Resistant F83005.5 Line Showed a Higher Cell Wall Autofluorescence and Earlier Endodermis Lignification Than the Susceptible Line A17 after Inoculation with *R. solanacearum* GMI1000

To identify potential cell wall modifications in response to infection, cytological studies were performed on transverse root tip sections of the susceptible and resistant lines after pathogen infection.

**Figure 2.** Root tip structure and bacterial colonization of infected roots. A17 and F83005.5 roots were mock (A) or GMI1000 strain (B–F) inoculated. Longitudinal sections were made at 3 dpi (A–D) and 7 dpi (E and F) and stained with toluidine blue, which stains cytoplasm. A, In the mock inoculation control, the root tip was normally organized, with root cap (RC), meristematic zone (Me), region of elongation (RE), and region of maturation (RM), with maturing cortical cells showing vacuolization. Bar = 70  $\mu$ m. B, After GMI1000 inoculation, root tip structure was altered: cortical cells (Co) were enlarged and highly vacuolized, and numerous mature vessels were seen (large open arrows). Bar = 70  $\mu$ m. C, Bacteria (arrowheads) were located on the surface of root hair cells (stars). Bar = 20  $\mu$ m. D, Bacteria started to colonize the root and were observed in cortical cells (arrows) and intercellular spaces (dotted arrow). Bar = 35  $\mu$ m. E and F, Bacteria multiplied in the cortex (arrows) and were found in the vessels (open arrowheads). Bars = 35  $\mu$ m in E and 20  $\mu$ m in F. [See online article for color version of this figure.]



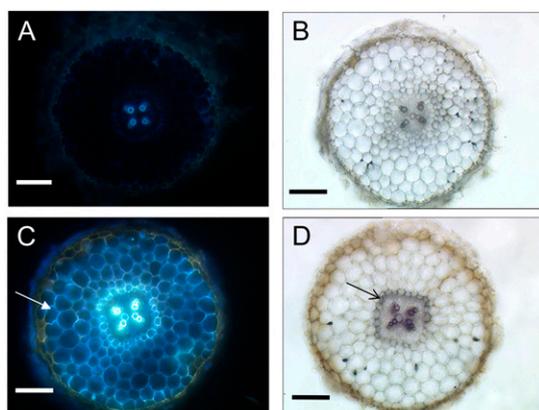
Autofluorescence of the inner root tip and callose, suberin, and lignin deposits were observed 3 and 7 dpi in both A17 and F83005.5 lines after GMI1000 (Fig. 3) or mock (data not shown) inoculation. Autofluorescence of the cell wall of the cortical cells was observed only after inoculation (Fig. 3). Sections with (Fig. 3A) or without (Fig. 3B) cell wall autofluorescence were observed in both resistant and susceptible roots; however, at 7 dpi, roots of the resistant line showed cell wall autofluorescence at a significantly higher proportion than was observed in the susceptible line (frequency test,  $P = 0.027$ ).

Callose and suberin accumulations were observed equally in susceptible and resistant lines (data not shown). Lignin deposits were observed in the endodermis of the two lines only after inoculation with the GMI1000 strain (Fig. 3). Sections with (Fig. 3C) or without (Fig. 3D) endodermis lignifications were observed in the inoculated roots, but at 3 dpi, F83005.5 roots showed lignin deposits on the endodermis, at a significantly higher frequency (frequency test,  $P = 0.011$ ) than did A17 roots. Interestingly, at 7 dpi, A17 and F83005.5 root tip endodermis were lignified to a similar extent (frequency test,  $P = 0.366$ ), indicating that rapid lignification may be important in resistance.

### Root Symptom Development in the Susceptible A17 Line Depends on Two T3Es

As seen previously, root symptoms were specifically dependent on the presence of the T3SS. To identify bacterial molecules involved in the development of these root symptoms in the susceptible line, we used FDA staining to screen a collection of 67 loss-of-function T3E mutants in the GMI1000 background (Supplemental Fig. S1; Poueymiro et al., 2009). Because the analysis of root tip epidermis viability revealed intermediate phenotypes, we established a scale, ranking from a score of 0 (intact root tip epidermis after mock or T3SS-defective control inoculation) to 4 (complete loss of viability of the root tip epidermis as observed after inoculation with GMI1000). The screening revealed two mutants that were partially impaired in their capacity to induce epidermal cell death, *gala7* and *avrA*. Inoculation of A17 with *gala7* and *avrA* mutants led to median scores of 3 and 3.5, respectively (Fig. 4). Root growth arrest at 24 hpi and root tip swelling were reduced after infection with the two mutant strains compared with GMI1000 but were more pronounced than after mock or T3SS-defective control inoculation.

In order to uncover a potential additive effect of the two effectors on the root symptom, an *avrA* and *gala7* double mutant strain was generated. The FDA test



E	Autofluorescence		Lignification	
	7 dpi		3 dpi	7 dpi
A17	55		20	80
F83005.5	88		88	74

**Figure 3.** Autofluorescence and lignin deposition during infection. Transverse root tip section after inoculation with GMI1000. A and C, Natural autofluorescence observed under UV light at 7 dpi. A, Root showing no cell wall autofluorescence. C, Root revealing cortical cell wall autofluorescence (arrow). B and D, Lignin deposits are highlighted in purple after phloroglucinol staining. B, Root showing no endodermis lignification. D, Root with endodermis lignification (arrow). Bars = 70  $\mu$ m. E, Percentage of roots of A17 (susceptible cultivar) or F83005.5 (resistant cultivar), for which at least one section showed autofluorescence or lignification at different time points after infection. [See online article for color version of this figure.]

revealed a median score of 2, showing an additive effect on epidermal cell death (Wilcoxon rank sum test,  $P = 2.10^{-4}$ ; Fig. 4). Root growth measurements showed high variability, and no additive effect could be demonstrated.

Among the effector mutants showing a minor effect (Supplemental Fig. S1), two of them were selected: GRS118 (GMI1000  $\Delta$ RSp0846-RSp0847) and GRS230 (GMI1000  $\Delta$ RSp0842; Cunnac et al., 2004). Two triple mutants were constructed with *avrA* and *gala7*. They were both assayed with the FDA test, and no significant difference could be observed with the double mutant. Thus, in our conditions and from among this group of effectors, *avrA* and *gala7* seem to be the main determinants of root symptom development. However, it is likely that other effectors have lesser individual effects.

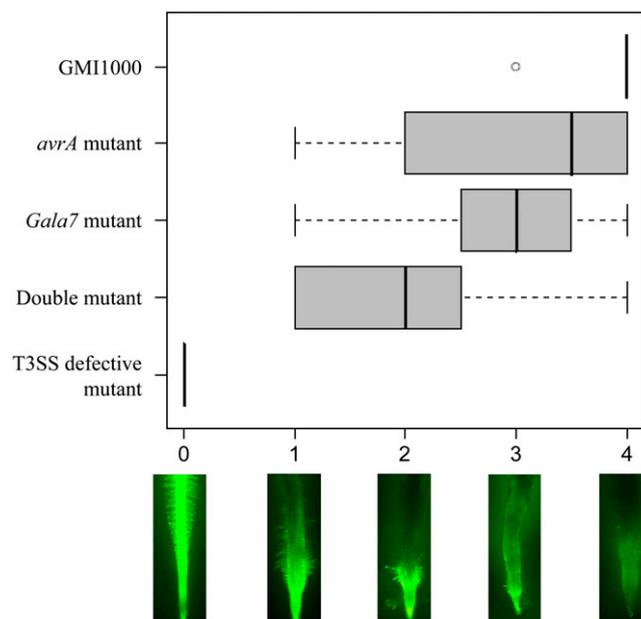
### Gala7 and AvrA T3Es Have Distinct Roles in the Two-Step Root Colonization Process of Susceptible *M. truncatula*

After observing the involvement of AvrA and Gala7 in root symptom development after *R. solanacearum* inoculation, we characterized their roles in root bacterial colonization and the development of foliar symptoms. At 14 dpi, the *gala7* mutant was never detected

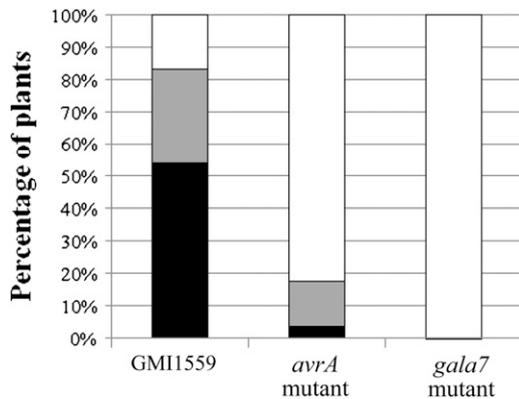
in the root tip cortex and therefore did not colonize the vascular system (Fig. 5), nor did it induce wilting of the A17 plant (Fig. 6). This indicated that Gala7 was necessary for the bacterial penetration into the root of the susceptible *M. truncatula* line.

At 14 dpi, the *avrA* mutant strain was found in the root tip cortex of 18% of the plants and in the vascular system of 4% of the plants, in comparison with GMI1000, which was found in the root tip cortex of 85% of inoculated plants and in the vascular system of 55% (Fig. 5). The plant wilting rate was also 5 times lower following inoculation with *avrA* compared with GMI1000 (Fig. 6). At 28 dpi, unwilted plants did not show any sign of infection. Therefore, the *avrA* mutant was not delayed in the induction of wilting symptoms but showed a reduced aggressiveness in comparison with GMI1000 strain. All wilted plants inoculated with the *avrA* mutant showed root growth arrest similar to that found after GMI1000 inoculation. Therefore, AvrA appears to be not essential for the root penetration of the susceptible *M. truncatula* line, but it does play a positive role in this process.

In conclusion, the effectors Gala7 and AvrA are involved in the appearance of root symptoms and also play roles in root colonization and disease development. Gala7 was necessary for bacterial penetration of



**Figure 4.** Mutations in two bacterial effectors alter the development of root symptoms. Box plot of root tip epidermal viability scored 3 d after inoculation with GMI1000 or the indicated effector mutants. Score 0 was attributed to intact epidermis, as seen with mock or T3SS-defective mutant controls, and score 4 corresponded to a fully altered epidermis observed with GMI1000. Three biological repeats included 10 individual plants per repeat. The median is indicated by a dark vertical line, and the gray box encompasses 1 SD. Dashed lines flanked by thin vertical lines indicate the distribution of all data points. An outlier is indicated as a small circle. [See online article for color version of this figure.]



**Figure 5.** Mutations in two bacterial effectors alter the ability of the pathogen to colonize root tissues. Bacterial repartition in the root tip of the susceptible A17 line at 14 dpi. Roots were inoculated with a GMI1000 derivative containing a construct that gave constitutive GUS expression (GMI1559). The GUS reporter fusion from strain GMI1559 was recombined into the T3E mutant strains to allow detection of the resulting strain, and inoculated plants were assayed for the location of the infecting bacteria. White bars indicate no bacterial penetration in the root tip, gray bars indicate detection in cortex, and black bars indicate detection in vessels. No penetration in the root tip could be observed with the *gala7* mutant. Bacteria were found in the cortex and the vessels of A17 inoculated with GMI1000 and *avrA* mutant but to a lesser extent with the bacterial mutant. Values are means of three biological repeats (10 individual plants per repeat).

root cells, whereas AvrA was partially required for root colonization.

#### AvrA and Gala7 Are Differentially Involved in Bacterial Propagation in Vessels and Wilting Symptom Development

After showing the involvement of the two effectors in root penetration, it was interesting to assay their role in the subsequent steps of vascular propagation and wilting development. Therefore, we used an inoculation procedure that bypassed root penetration using root tips that were cut just before the bacterial inoculation (Vailleau et al., 2007). Using this procedure, 100% death of susceptible plants was observed at 14 dpi with either GMI1000 or the *avrA* mutant. Only 40% of plants died after inoculation with the *gala7* mutant, and a similar death rate was observed with the double mutant strain, which showed 30% of wilted plants (Fig. 7). This suggested that AvrA is not necessary for bacterial propagation in the vessels and wilting development, whereas Gala7 is involved in those steps.

## DISCUSSION

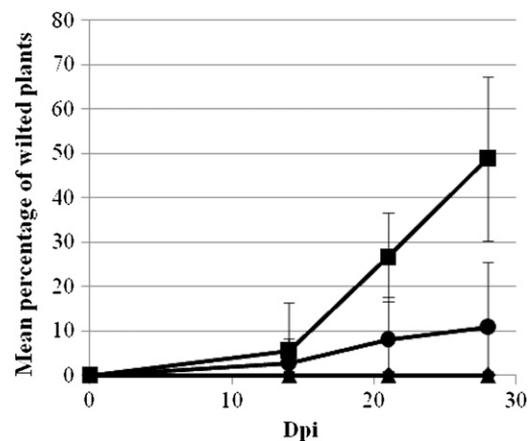
In order to study the root infection process of the devastating pathogen *R. solanacearum*, we developed an *in vitro* inoculation procedure using intact *M. truncatula* roots. The root tip was identified as the key site for T3SS-dependent root symptom development and root penetration of *R. solanacearum*. The

pathosystem consisted of susceptible and resistant *M. truncatula* lines infected with the *R. solanacearum* strain GMI1000. Examination of this pathosystem allowed the dissection of sequential stages of pathogen infection and the identification of two effectors important in this process.

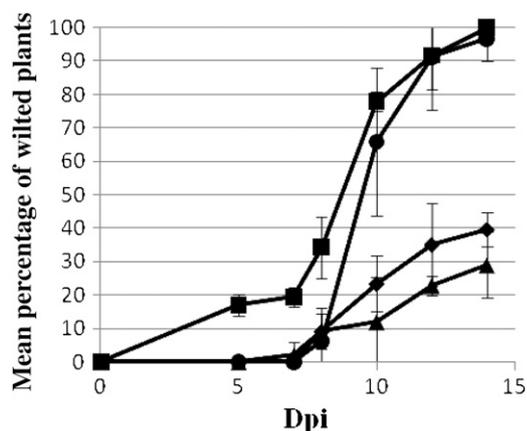
#### Root Symptom Development in Response to Infection Is Genetically Controlled by the Bacteria

The first step in the infection (Fig. 8) was the development of root symptoms, which included root growth arrest, root tip swelling and browning, and epidermal cell death. These root symptoms were not dependent on the plant genetic background, as they were common to both susceptible and resistant lines. They were also observed on other *M. truncatula* lines infected with *R. solanacearum*, four resistant (TN7.22, TN3.17, TN6.17, and DZA315.16) and three susceptible (TN1.21, TN9.1, and TN6.2) lines. They appeared to be the first step in bacterial infection, but they were not always associated with the wilting of the plant. The progression of early steps of the infection processes is not always associated with resistance, as described in other systems (Dita et al., 2007). Indeed, specific recognition leading to defense mechanisms may initiate after penetration of the pathogen into the host tissues (Freytag et al., 1994).

*R. solanacearum* infection processes in intact roots have been described in tomato (Vasse, 1995) and petunia (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). No tomato root symptoms were mentioned. However, in petunia, Zolobowska and Van Gijsegem (2006) ob-



**Figure 6.** Mutations in two bacterial effectors alter the ability of the pathogen to cause foliar symptoms when inoculated on intact roots. Percentage of wilted A17 plants after GMI1000 (squares), *avrA* mutant (diamonds), *gala7* mutant (triangles), or double mutant strain (circles) inoculation on intact root tips. GMI1000 inoculation led to 50% wilted plants at 28 dpi. This rate was 5 times lower with the *avrA* mutant. The *gala7* mutant and double mutant strain inoculations led to no wilting symptoms. Values are means of three biological repeats (10 individual plants per repeat), and error bars represent the confidence interval at 95%.



**Figure 7.** Bypassing the root penetration step shows a requirement for *Gala7* at later stages of infection. Percentage of wilted A17 plants after inoculation on cut root tips. Inoculation with GMI1000 (squares) and *avrA* mutant (circles) led to 100% wilted plants at 14 dpi. The *gala7* mutant (diamonds) and double mutant (triangles) inoculations showed a lower rate of wilted plants (40% and 30%, respectively). No statistical difference could be detected comparing these two last mutants. Values are means of three biological repeats (10 individual plants per repeat), and error bars represent the confidence interval at 95%.

served swelling of the root tip, reduced elongation of main and lateral roots, inhibition of lateral root development, and formation of root lateral structures. Similarly, we found *M. truncatula* root growth arrest, which could result from the disruption of the root meristem structure that was observed. At the same time, internal cell maturation may still occur, as illustrated by the enlarged vacuolated cells and supernumerous mature vessels normally encountered farther from the root tip (Fig. 2B). However, root alterations may not be a specific virulence mechanism but may just be a consequence of infection.

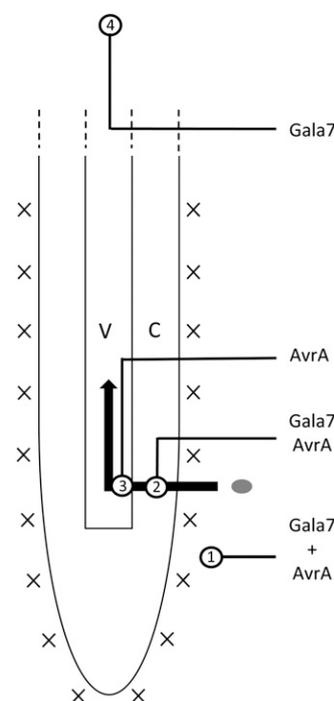
Root tip epidermal cell death, caused by effectors secreted by the bacteria, could be beneficial to *R. solanacearum*. It could lead to the release of specific attractant compounds, as chemotaxis has been described to play a role in fitness and virulence (Yao and Allen, 2006). The release of nutrients may also contribute to the ability of the bacteria to grow and therefore participate in the quorum-sensing mechanism (Von Bodman et al., 2003). Root tip epidermal cell death could also be directly linked to the invasion of the bacteria. The cell death could be induced before bacterial penetration, or bacteria could invade still intact cells as described for the bacterium *Streptomyces scabies* in potato (Loria et al., 2003).

The specific requirement of a functional T3SS for root symptom development led us to test a panel of T3E mutants for their ability to cause epidermal cell death. This screen resulted in the identification of two effectors: *Gala7* and *AvrA*. These two effectors were involved in epidermal cell death and had an additive effect. Other effectors may be involved to a lesser extent, as the root tip epidermis was still partially

altered after infection with the double mutant strain. The two effectors were also involved in root growth arrest, but no significant additive effect could be measured due to the variability of root growth. These effectors were both demonstrated to be translocated into plant cells by the T3SS (Angot et al., 2006; Poueymiro et al., 2009), so they may modulate host pathways, for example, acting on the host proteasome pathway in the case of *Gala7* (Angot et al., 2006).

***R. solanacearum*, a Pathogenic Bacterium Able to Penetrate *M. truncatula* through Intact Root Tip Epidermis**

The second step in the infection process (Fig. 8) was the bacterial invasion of root tip cortical cells. The root



**Figure 8.** Dissection of the *R. solanacearum* GMI1000 T3SS-dependent infection process on *M. truncatula*. Step 1, Root symptom development. Root growth arrest, root tip swelling, and epidermal cell death were common to resistant F83005.5 and susceptible A17 lines. A cumulative effect of *AvrA* and *Gala7* on epidermal cell death was seen. Step 2, Bacterial cortex colonization. Bacterial invasion of the cortex was observed in the susceptible and resistant lines, but to a lesser extent in the resistant line. The *gala7* mutant was never detected in the cortex of the A17 line, and the *avrA* mutant presence was strongly reduced compared with GMI1000. Step 3, Bacterial vessel colonization. Plant genetic background was predominant, as the GMI1000 strain was never detected in the vessels of the resistant F83005.5 line. Invasion of the *avrA* mutant into the A17 line was strongly reduced compared with GMI1000. Step 4, Wilting symptom development on wounded roots. Inoculation on A17 wounded roots revealed no difference in wilting symptom development after inoculation with the *avrA* mutant or GMI1000. Inoculation with the *gala7* mutant revealed a strong reduction of wilting symptoms. Symbols are as follows: X, root symptoms; C, cortex; V, vessels; gray oval, bacteria.

tip was the only zone where we found that the bacteria could penetrate into *M. truncatula* through intact root tissue and not through induced or natural wounds, like axils of secondary roots on tomato (Vasse, 1995). To date, *Streptomyces* species and *Erwinia chrysanthemi* were the only pathogenic bacteria described as being able to penetrate intact root tissues (Nieves-Brun, 1985; Loria et al., 2003).

Cortical cell invasions occurred in both *M. truncatula* lines but were reduced in the resistant line. The cell wall is the primary interface for pathogen interactions and therefore is an important site of potential defense mechanisms, such as cell wall deposition and strengthening (Cano-Delgado et al., 2003). Autofluorescent phenolic compounds are mainly implicated in cell wall strengthening; an autofluorescence assay, therefore, allows a general view of potential defense mechanisms (Carver et al., 1998; Torregrosa et al., 2004). Stronger autofluorescence was detected in F83005.5 cortical cell walls and could be linked with the reduced bacterial penetration in the root.

At this stage, the bacterial effectors were the major determinants of infection, as the *gala7* mutant was never detected in cortical cells of line A17 and *avrA* mutant presence was strongly reduced. Our inoculation procedure highlights a new role for Gala7 as a determinant of bacterial penetration.

#### ***M. truncatula* Defenses Can Prevent Root Tip Vessel Invasion, Providing a Key Resistance Mechanism against *R. solanacearum***

The third step in the infection process (Fig. 8) was bacterial propagation in the vascular tissue. The *avrA* mutant was detected in vessels of A17 plants, but at a much lower rate than GMI1000, showing bacterial determination at that stage. Plant genetic background was also important at that stage, as GMI1000 was never detected in the vascular tissue of F83005.5 plants. As seen previously, we detected autofluorescent cell wall cortical cells, suggesting the presence of phenolic compounds. Therefore, we assayed for the presence of lignin, a phenylpropanoid known to strengthen the cell wall and inhibit further pathogen ingress (Hijwegen, 1963; Cano-Delgado et al., 2003). Earlier lignification of the F83005.5 root tip endodermis was observed and could constitute a barrier preventing bacterial propagation in the vessels.

This third stage was tightly linked to the next step (wilting development; Fig. 8). No wilting was observed when bacteria did not reach the vessels. This suggests that foliar symptom development depends on the bacterium's ability to penetrate the root tip vasculature in *M. truncatula*, which was not described before in other systems. Indeed, bacteria could be detected in the vascular system of resistant tomato plants, but at a low level that does not induce plant wilting (Grimault et al., 1995).

The *avrA* mutant strain was able to reach the same stages as GMI1000, but to a lesser extent at each step;

therefore, it had a reduced pathogenicity on *M. truncatula*. Although the *AvrA* gene is widely distributed in *R. solanacearum*, disruption of *avrA* in GMI1000 strain did not lead to a reduced pathogenicity on susceptible hosts such as tomato and Arabidopsis (Poueymiro et al., 2009). This report shows that *avrA* is required during the infection process as an important determinant of disease development in *M. truncatula*. It is often hypothesized that avirulence genes may have been conserved through evolution because the encoded protein may promote disease in another pathosystem (Stavrinos et al., 2008). The demonstration of a role for *avrA* in disease development on *M. truncatula* supports this hypothesis.

#### **AvrA and Gala7, Different Effects in Steps of the Infection Process**

The *gala7* mutant never colonized intact roots and therefore never induced foliar wilting, whereas the *avrA* mutant showed reduced aggressiveness. Therefore, we wondered if those two effectors were also involved in the virulence of *R. solanacearum* after xylem invasion and wilting symptom development. Invasion of the bacteria was made possible by cutting the root tip at the time of inoculation. In this condition, the *avrA* mutation did not affect disease development. In contrast, the *gala7* mutation led to a reduction of wilting symptoms. These results suggested that the two effectors have different roles in *R. solanacearum* virulence, with AvrA only involved in the penetration steps.

The effects of the two T3Es have been studied on both root symptom development and disease development of leaves of the susceptible line, and two different mechanisms were revealed. The involvement of the two T3Es differed between early and later stages in infection: they had additive effects on root tip epidermal cell death, whereas disease development in vascular tissues involved *gala7* but not *avrA*. Root penetration likely requires a large number of molecules, consistent with the fact that the development of root symptoms involves a nonspecific mechanism, observed on both resistant and susceptible lines and, at least partially, on petunia (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). Bacterial colonization and disease development seemed to require host-specific signaling pathways and therefore likely require highly specific bacterial effectors.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial Strains and Culture Conditions**

The wild-type strain GMI1000 of *Ralstonia solanacearum* and *hrp* mutant derivatives (GMI1525, a *hrpB* regulatory mutant, and GMI1402, a *hrcS* T3SS structural mutant) were described previously (Cunnac et al., 2004). Mutant strains carrying disruptions of the global virulence regulator *phcA* (GMI1610; Genin et al., 2005) and the T2SS (*gspD gspN* deletion mutant strain GRS465) were also used. GMI1559 is a GMI1000 derivative carrying a constitutively expressed GUS (*uidA*) fusion, and GMI1560 is a *hrcV* mutant also carrying this

uidA reporter fusion (Vaillau et al., 2007). A collection of 67 T3E disruption mutants generated in GMI1000 (Cunnac et al., 2004; Occhialini et al., 2005) was used for screening with the *Medicago truncatula* root symptom assay. Conditions for routine culture of *R. solanacearum* were as described (Cunnac et al., 2004). When required, antibiotics were used at the following concentrations: gentamycin (Gm; 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), spectinomycin (Spec; 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and tetracycline (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### Construction of an *avrA-gala7* Double Mutant Strain

An *avrA* deletion mutant strain was generated by inserting the interposon carrying a spectinomycin resistance gene (Prentki and Krisch, 1984) in a single *EcoRI* restriction site engineered between upstream and downstream DNA fragments flanking the *avrA* coding sequence. These fragments were PCR amplified using the following primers: 5'-AAGCTTCCTGACGTG-GCACACCG-3' and 5'-GAATTCTCATCTCAATCTCCTGA-3' (upstream fragment) and 5'-TCT-AGATGGCTTCGGCCGACACG-3' (downstream fragment). This *avrA*:: deletion was introduced into GMI1000 by natural transformation as described previously (Cunnac et al., 2004). As expected, the resulting strain, GMI1758, was unable to induce HR on tobacco (*Nicotiana tabacum*; Poueymiro et al., 2009). In order to generate a double mutant strain carrying mutations in both *avrA* and *gala7*, total genomic DNA from strain GRS138 (a *gala7* disruption mutant; Angot et al., 2006) was used to transform strain GMI1758. The resulting strain, GRS469, therefore carried both *avrA*::(Spec<sup>r</sup>) and *gala7*::pCZ367 (Gm<sup>r</sup>) mutations. The structure of the deleted loci was checked by DNA gel-blot analysis. For complementation analyses of the *gala7* and *avrA* mutations, plasmids pNP221 (Angot et al., 2006) and pSC222 (Poueymiro et al., 2009) were used, respectively.

### Plant Material and Inoculation Procedure

Seeds were surface sterilized, vernalized, and germinated according to Boisson-Dernier et al. (2001). Twenty-four-hour germinating seeds were grown on Fahraeus medium (Fahraeus, 1957) covered with filter paper in square petri dishes at 25°C (day/night, 12 h). Roots were kept in the dark with a mask on the petri dish made of craft paper and aluminum foil.

Inoculation was performed as described previously (Vaillau et al., 2007). Bacterial concentration was set at 10<sup>7</sup> colony-forming units mL<sup>-1</sup> for the inoculation on cut root tips and on intact root tips. For the inoculation on cut root tips, 1 cm was excised from the root tip right before applying the bacteria. Mock treatment was carried out using the same procedure with water. Inoculation with the T3SS-defective GMI1000 mutant (GMI1402) is referred to herein as the T3SS-defective control condition. Each experiment consisted of three biological replicates.

### Macroscopic Infection Process Studies

Roots were measured every 24 h up to 15 dpi with 10 plants per treatment. Root tip browning and deformation were observed using a stereomicroscope (Leica MZ75 equipped with a CCD camera [Leica DCF320]).

GUS staining was performed on 10 plants per sample as described by Jefferson (1987). Wilting symptoms were evaluated during 14 d for the cut root tip condition and 28 d for the intact root condition (10 plants per treatment). Plant death was defined as full chlorosis of cotyledons and leaves.

### Microscopic Infection Process Experiments

The FDA viability test was performed as described previously (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). Ten plants were observed per biological repeat.

For semithin sections, fresh material was fixed in 0.1 M sodium cacodylate and 2.5% glutaraldehyde, dehydrated twice for 1 h each time in 20%, 40%, 60%, 75%, 80%, 90%, and 100% ethanol, progressively infiltrated in medium-grade LR white resin (48 h in 1:3 LR white resin and 2:3 ethanol, 48 h in 1:2 LR white resin and 1:2 ethanol, 48 h in 2:3 LR white resin and 1:3 ethanol, and 48 h in pure LR white resin), and encapsulated for resin polymerization for 12 h at 65°C. Sections of 1  $\mu\text{m}$  were made with Ultracut E (Reichert-Jung) and stained during 30 s at 65°C with 0.1% toluidine blue in 2.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> at pH 11. Three roots were sectioned per biological replicate.

Root tip swelling and cell wall modifications were assayed on fresh material included in 5% low-melting agar (agarose type I; Sigma) and sectioned with a vibratom (Leica VT 1000S). Phloroglucinol (hydrochloric solution; VWR Prolabo) coloration (10 min) was used to detect lignin (violet) and suberin (pink) deposits; callose detection was performed using 0.1% aniline blue in 0.15% K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 12.4 (10 min), adapted from Pérez-de-Luque et al. (2007). Seven plants were sectioned for each biological replicate.

All images were obtained using an inverted microscope (Leica DMIRBE), and images were acquired with a CCD camera (color cooled view; Photonic Science). For the FDA test, fluorescence was obtained using excitation range 450 to 490 nm, dichroic mirror 510 nm, and long-pass emission filter 515 nm. For the autofluorescence test and callose detection, excitation range 340 to 380 nm, dichroic mirror 400 nm, and long-pass emission filter 425 nm were used.

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** A17 root tip epidermal viability scored after inoculation with GMI1000 and all tested T3E mutants at 3 dpi.

### ACKNOWLEDGMENTS

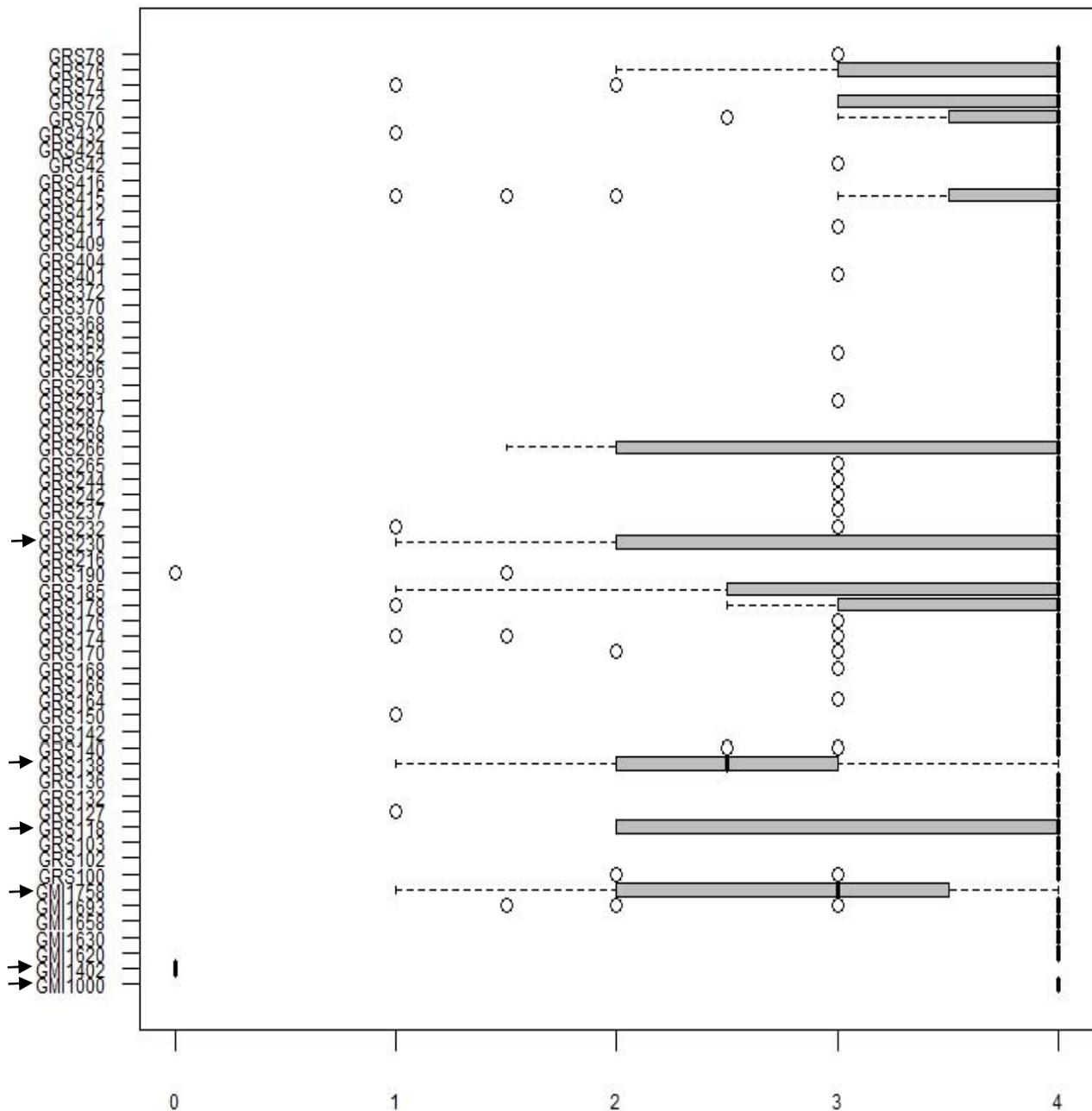
We thank Jean Greenberg, Jennifer Mach, and Marc Ellis for reading and comments on the manuscript, Jean-Marie Prospéri for providing A17 and F83005.5 seeds, and the IFR40 RIO platform for microscopy experiments.

Received May 15, 2009; accepted May 28, 2009; published June 3, 2009.

### LITERATURE CITED

- Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14620–14625
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396–403
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 695–700
- Cano-Delgado A, Penfield S, Smith C, Catley M, Bevan M (2003) Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **34**: 351–362
- Carney BF, Denny TP (1990) A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level. *J Bacteriol* **172**: 4836–4843
- Carver TL, Robbins MP, Thomas BJ, Troth K, Raistrick N, Zeyen RJ (1998) Silicon deprivation enhances localized autofluorescent responses and phenylalanine ammonia-lyase activity in oat attacked by *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **52**: 245–257
- Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**: 115–128
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounloham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8024–8029
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Ariat M, Marco Y (1998) Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 659–667
- Dita MA, Brommonschenkel SH, Matsuoka K, Mizubuti ESG (2007) Histopathological study of the *Alternaria solani* infection process in potato cultivars with different levels of early blight resistance. *J Phytopathol* **155**: 462–469
- Etchebar C, Trigalet-Demery D, Van Gijsegem F, Vasse J, Trigalet A (1998)

- Xylem colonization by an *hrcV*- mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 869–877
- Fahraeus G (1957) The infection of white clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique. *J Gen Microbiol* **16**: 374–381
- Freytag S, Arabatzis N, Hahlbrock K, Schmelzer E (1994) Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interaction. *Planta* **194**: 123–135
- Garg RP, Huang J, Yindeeyoungyeon W, Denny TP, Schell MA (2000) Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **182**: 6659–6666
- Genin S, Boucher C (2002) *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Mol Plant Pathol* **3**: 111–118
- Genin S, Brito B, Denny TP, Boucher C (2005) Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (*hrp*) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett* **579**: 2077–2081
- Gonzalez ET, Allen C (2003) Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 536–544
- Grimault V, Prior P, Anais G (1995) A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *J Phytopathol* **143**: 349–352
- Groot EP, Doyle JA, Nichol SA, Rost TL (2004) Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms. *Int J Plant Sci* **165**: 97–105
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**: 65–87
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol* **45**: 115–120
- Hijweggen T (1963) Lignification, a possible mechanism of active resistance against pathogens. *Neth J Plant Pathol* **69**: 314–317
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**: 387–405
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kanda A, Yasukohchi M, Ohnishi K, Kiba A, Okuno T, Hikichi Y (2003) Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 447–455
- Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, Grimsley N, Boucher C (2002) PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1058–1068
- Liu H, Zhang S, Schell MA, Denny TP (2005) Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1296–1305
- Loria R, Coombs J, Yoshida M, Kers J, Bukhalid R (2003) A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**: 65–72
- Nieves-Brun C (1985) Infection of roots of *Dieffenbachia maculata* by the foliar blight and soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol* **34**: 139–145
- Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 938–949
- Orgambide G, Montrozier H, Servin P, Roussel J, Trigalet-Demery D, Trigalet A (1991) High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *J Biol Chem* **266**: 8312–8321
- Pérez-de-Luque A, Lozano MD, Moreno MT, Testillano PS, Rubiales D (2007) Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. *Ann Appl Biol* **151**: 89–98
- Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel AC, Boucher C, Genin S (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 538–550
- Poueymiro M, Genin S (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* **12**: 44–52
- Prentki P, Krisch HM (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303–313
- Prior P, Allen C, Elphinstone J (1998) Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer-Verlag, Berlin
- Saile E, McGarvey JA, Schell MA, Denny TP (1997) Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**: 1264–1271
- Schell MA (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 263–292
- Stavrinides J, McCann HC, Guttman DS (2008) Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell Microbiol* **10**: 285–292
- Tans-Kersten J, Guan Y, Allen C (1998) *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4918–4923
- Torregrosa C, Cluzet S, Fournier J, Huguet T, Gamas P, Prosperi JM, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B, Jacquet C (2004) Cytological, genetic, and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 909–920
- Vailleau F, Sartorel E, Jardinaud MF, Chardon F, Genin S, Huguet T, Gentzbittel L, Petitprez M (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 159–167
- Vasse J (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 241–251
- Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B (2000) The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 259–267
- Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455–482
- Yao J, Allen C (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **188**: 3697–3708
- Zolobowska L, Van Gijsegem F (2006) Induction of lateral root structure formation on petunia roots: a novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in *hrp* mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 597–606



**Supplemental data.**

**Figure 1.** A17 root tip epidermal viability scored after inoculation with GMI1000 and all tested *T3Es* mutants at 3 dpi. Score 0 was attributed to intact epidermis seen T3SS defective mutant controls (GMI1402) and score 4 corresponded to a fully altered epidermis observed with GMI1000. *avrA* (GMI1758) and *gala7* (GRS138) mutants showed a median score of 3 and 2,5 respectively. Root tip epidermis cell death seemed to imply other T3Es having minor effects on the phenotype. Three biological repeats included 10 individual plants per repeat.

## **II. Mise en évidence de symptômes racinaires induit par *R. solanacearum* lors de son interaction avec *M. truncatula***

Les symptômes décrits dans la publication sont un arrêt de croissance racinaire 24hpi, un brunissement et une mortalité de l'épiderme de l'extrémité racinaire 3jpi, chez toutes les lignées sensible et résistante testées. L'infection de *M. truncatula* par *R. solanacearum* est également corrélée avec une émission de racines secondaires importante par la plante, que nous avons considérée comme faisant partie des symptômes racinaires induit par la bactérie. Afin de préciser la mise en place des symptômes racinaires, nous nous sommes focalisés sur l'induction de la mortalité épidermique. Nous avons estimé la viabilité épidermique de l'extrémité racinaire avec un test fluorescéine di-acétate (FDA), en faisant varier la concentration d'inoculation, les souches, les lignées ou les espèces observées.

### **1) Emission de racines secondaires**

En parallèle à la mortalité épidermique de l'extrémité racinaire, l'inoculation par la souche GMI1000 a entraîné une émission importante de racines secondaires, en comparaison avec une inoculation par de l'eau. 14 jpi, respectivement 10 et 15 % de plantes des lignées A17 et F83005.5 inoculées avec de l'eau ont présenté des racines secondaires. Chez les plantes en ayant formé, nous avons pu en dénombrer en moyenne 1,2 et 1,3 par racine respectivement chez les deux lignées. En revanche, suite à l'inoculation par la souche GMI1000, 88 et 93% des plantes ont présenté des racines secondaires chez les lignées A17 et F83005.5 respectivement, avec une moyenne de 3,8 et 4,2 racines secondaires par plante.

Que ce soit dans la condition témoin ou suite à l'inoculation par la souche GMI1000, l'émission de racines secondaires a été observée de manière très similaire chez les deux lignées. Ce phénotype pourrait être spécifiquement induit par la bactérie ou être une conséquence développementale de l'altération de l'extrémité racinaire liée au mécanisme de dominance apicale.

**Tableau 2. Viabilité des extrémités racinaires suite à l'inoculation de la souche GMI1000 sur différentes espèces hôtes et non-hôtes de *R. solanacearum* (basé sur un test FDA).**

Les observations ont été effectuées 3 et 7 jpi, sur 3 répétitions biologiques avec 10 plantes par répétition.

Groupe	Ordre	Espèce	Interaction avec <i>R. solanacearum</i>	Viabilité racinaire
<b>Monocotylédones</b>	Poacées	Riz	Non hôte	-
<b>Dicotylédones</b>	Brassicacées	Arabidopsis	Hôte	-
	Fabacées	Lentille	Hôte	-
		Pois chiche	Hôte	-
		Haricot	Hôte	-
		Luzerne	Hôte	-
	Solanacées	Tabac	Hôte	-
		Tomate	Hôte	-
		Aubergine	Hôte	-
	Composées	Tournesol	Hôte	-

## **2) Induction de la mort de l'épiderme par une faible concentration bactérienne**

Nous avons procédé à un test FDA sur racine des lignées de *M. truncatula* A17 (sensible) et F83005.5 (résistante) après inoculation par la souche GMI1000 de *R. solanacearum*. Cela nous a permis de mettre en évidence une induction de la mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire, quelque soit la nature compatible ou non de l'interaction. Cet effet a été visible dès 24 heures post-inoculation (hpi) et complet à 3 jours post-inoculation (jpi). La viabilité de l'épiderme a ensuite été estimée suite à l'inoculation des deux lignées par une gamme de concentration bactérienne allant de  $10^8$  cfu/ml à 0 cfu/ml. Les résultats ont montré que 3jpi, une concentration de 10 bactéries par ml est suffisante pour induire la mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire chez les deux lignées, ce qui correspond à une inoculation théorique de trois bactéries par racine. La mort de l'épiderme est donc provoquée rapidement sur toute l'extrémité racinaire, suite à une inoculation avec une très faible concentration bactérienne.

## **3) Effet ubiquitaire de la souche GMI1000**

Le test FDA a révélé que l'induction de la mort de l'épiderme par la souche GMI1000 n'est pas limitée aux lignées A17 et F83005.5, mais également aux 7 autres lignées résistantes ou sensibles testées (cf. nos travaux publiés). Nous nous sommes donc intéressés à ce phénotype chez d'autres espèces hôtes ou non-hôtes de *R. solanacearum* (Tableau 2). Les résultats ont révélé que la souche GMI1000 est capable d'induire ce phénotype sur une large gamme d'espèce de différentes familles, hôtes ou non-hôtes. Il semble donc que l'induction par la souche GMI1000 de la mortalité épidermique de l'extrémité racinaire soit ubiquitaire, puisque toutes les espèces testées ont présenté ce phénotype. Un arrêt de croissance racinaire et une émission de racines secondaires ont également été observés. Cependant, la cinétique de croissance racinaire et le dénombrement de racines secondaires n'ont pas été effectués avec précision.

## **4) Effet non spécifique à la souche GMI1000**

Jusqu'à présent, l'induction de la mort de l'épiderme racinaire par la souche GMI1000 s'est révélée être un mécanisme largement ubiquitaire. Nous nous sommes donc

**Tableau 3. Viabilité épidermique des extrémités racinaires des lignées A17 et F83005.5, suite à l'inoculation par différentes souches de *R. solanacearum* (basé sur un test FDA).**

3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition.

\*conditions intermédiaires discutées dans le texte.

Souches de <i>R. solanacearum</i>	Viabilité racinaire	
	A17	F83005.5
GMI1000	-	-
GMI8128	-	-
GMI8080	-	-
GMI8086	-	-
GMI8084	-	-
JS940	-	-
JS763	-	-
Molk2	+*	-*
UW551	-	-

demandé si cette capacité à induire une mortalité épidermique est restreinte à la souche GMI1000 ou si ce mécanisme est répandu au sein de l'espèce. 8 souches de *R. solanacearum* ont donc été inoculées sur les lignées A17 et F83005.5, dont la viabilité épidermique racinaire a ensuite été estimée par FDA 3 jpi (Tableau 3). Les résultats ont montré que l'induction de la mort de l'épiderme racinaire par *R. solanacearum* n'est pas limitée à la souche GMI1000, elle est également rencontrée suite à l'inoculation par 7 autres souches testées. Une exception cependant a été mise en évidence, la souche Molk2.

### ➤ Cas de la souche Molk2

Dans cette étude, la souche Molk2 se distingue des autres car même si elle était capable d'induire la mort de l'épiderme des deux lignées, les résultats sont très variables. En effet, avec la lignée F83005.5, l'épiderme était préservé dans 15% des racines testées 3jpi. Avec la lignée A17, 85% des racines étaient intactes 3 jpi.

Les symptômes racinaires induits par la souche GMI1000 comprenant également l'arrêt de la croissance racinaire, ce paramètre a été évalué suite à l'inoculation par la souche Molk2. Dans l'ensemble, la croissance racinaire de la lignée A17 n'est pas arrêtée mais ralentie. Seule 1 racine sur 30 a arrêté de croître. En revanche, chez la lignée F83005.5, 90% des plantes ont présenté un arrêt de croissance racinaire.

Concernant le développement des symptômes foliaires, les deux lignées semblent être résistantes à la souche Molk2. Il faut cependant noter que la plante pour laquelle la croissance racinaire était abolie chez la lignée A17 a développé des symptômes de flétrissement des parties aériennes 28jpi.

Il semble y avoir une corrélation entre la mortalité épidermique et l'arrêt de croissance racinaire. En effet, chez la lignée A17, la souche n'induisait pas d'arrêt de croissance racinaire systématique comme la souche GMI1000, mais plutôt un ralentissement, et l'épiderme était préservé en grande majorité. Chez la lignée F83005.5, la grande majorité des racines avait une croissance arrêtée et un épiderme altéré. Le développement des symptômes racinaires n'était pas lié au développement ultérieur de symptômes de flétrissement puisque les deux lignées étaient résistantes vis-à-vis de cette souche.

### **5) L'induction de la mortalité épidermique semble spécifique à *R. solanacearum***

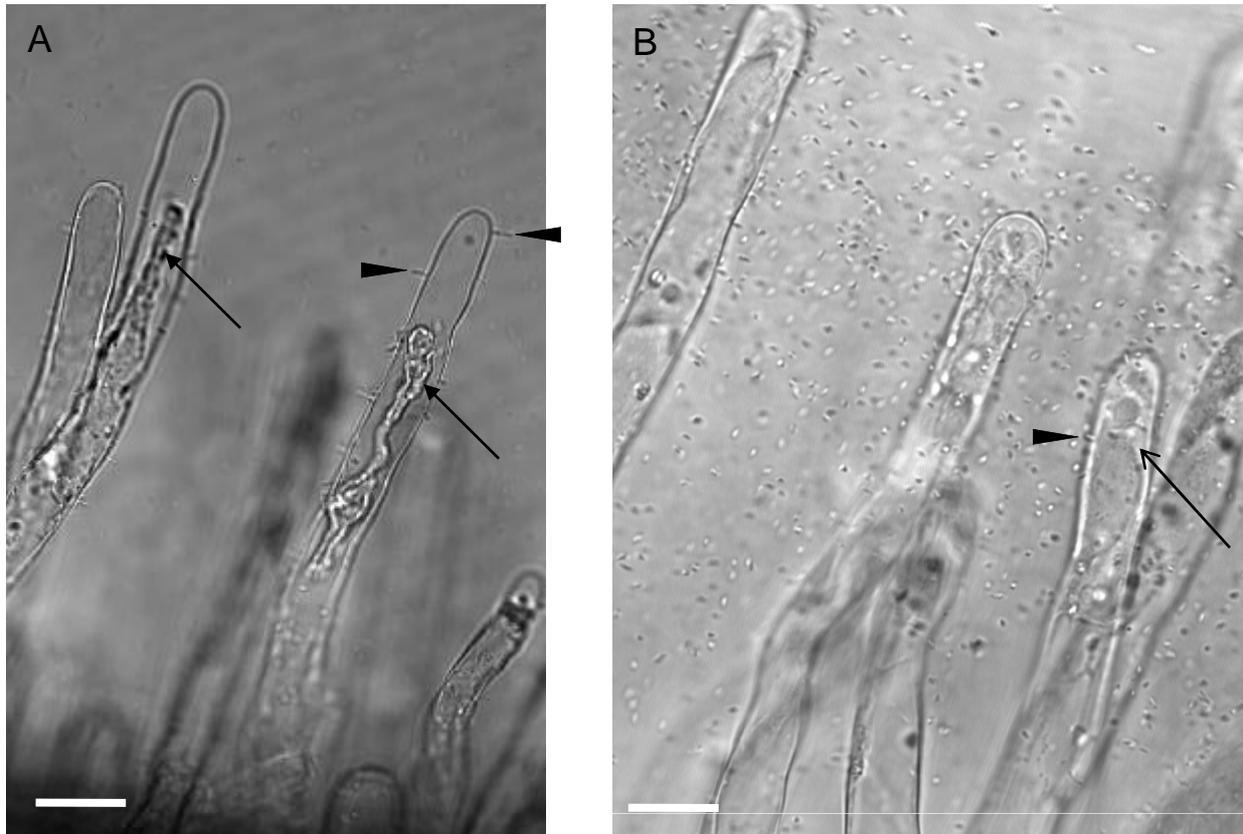
Afin de s'assurer que le phénotype de mort de l'épiderme racinaire n'est pas dû à la simple présence de bactéries au niveau racinaire, d'autres espèces de micro-organismes ont été inoculés sur les lignées A17 et F83005.5. Parmi les espèces à notre disposition, nous avons pu tester des micro-organismes pathogènes fongiques (*Fusarium oxysporum*) ou bactériens (*Agrobacterium tumefaciens*), des bactéries symbiotiques (*Sinorhizobium meliloti* et *Ralstonia taiwanensis*) ou n'ayant pas d'interaction connue avec les plantes (*Escherichia coli*). Aucun des micro-organismes testés n'a induit d'altération de la viabilité racinaire chez les lignées A17 ou F83005.5 3jpi. Ce phénotype n'a pas été mis en évidence avec d'autres micro-organismes et semble donc spécifique à *R. solanacearum*.

## **III. L'interaction évaluée du côté du partenaire bactérien**

Afin d'approfondir la compréhension de l'interaction pathogène étudiée, nous avons tout d'abord cherché à comprendre quelles étaient les molécules bactériennes impliquées dans l'induction des symptômes racinaires. Nous décrirons ensuite le processus infectieux de la souche GMI1000 en comparant la colonisation des deux lignées respectivement sensible et résistante. Dans un premier temps l'inoculation a été effectuée sur racine intacte afin d'observer les étapes de pénétration *in planta*. Ensuite les racines ont été coupées lors de l'inoculation, afin d'amener directement les bactéries au niveau des vaisseaux conducteurs.

### **A. Quelles sont les molécules bactériennes impliquées dans le développement des symptômes racinaires?**

Les résultats présentés dans la publication retracent la mise en évidence de symptômes racinaires décrits comme un brunissement et une déformation de l'extrémité racinaire dont l'épiderme est mort 3 jpi, ainsi qu'un arrêt de croissance racinaire dès 24hpi. L'analyse de mutants bactériens a permis d'identifier deux ET3s qui joueraient un rôle dans l'induction de ces symptômes chez la lignée sensible, AvrA et Gala7. En effet, les mutants



**Figure 15. Morphologie des poils absorbants suite à l'inoculation de la lignée A17 par les souches GMI1000 (A) ou GMI1000 *hrp*- (B).**

**A.** Les bactéries (tête de flèche) semblent « attachées » à la surface des poils absorbants, qui présentent des figures de plasmolyse (flèche pleine). **B.** Les poils absorbants présentent une architecture interne classiquement décrite dans la littérature avec la présence de cordon cytoplasmique (flèche). Les bactéries sont présentes dans le milieu mais ne semblent que rarement attachées aux poils absorbants (tête de flèche). Dans les deux cas l'attachement semble polaire. Barre d'échelle 20  $\mu$ m.

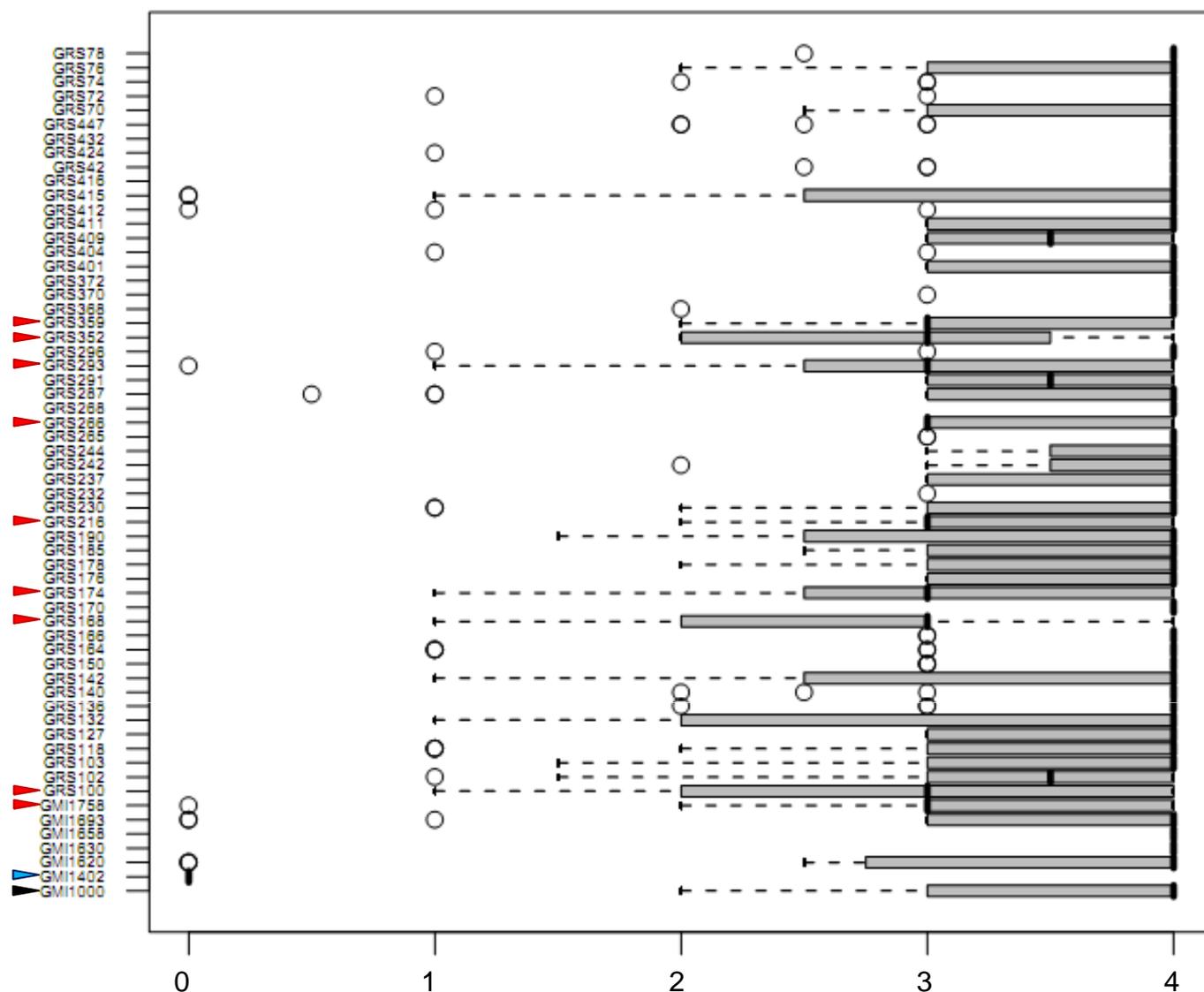
*gala7* et *avrA* induisaient une altération moins importante de l'épiderme racinaire et les racines n'avaient pas systématiquement une croissance arrêtée. Les résultats présentés dans les paragraphes suivants viendront préciser la mise en évidence de ces effecteurs chez la lignée sensible et leurs rôles dans l'induction de la mortalité de l'épiderme chez la lignée résistante F83005.5. Pour finir, nous reviendrons plus en détail sur la croissance racinaire résultant de l'inoculation par les deux mutants.

## **1) Altération de la viabilité épidermique**

### **➤ Implication principale du SST3**

Afin de déterminer les molécules ou structures bactériennes impliquées dans l'induction de la mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire par la souche GMI1000, nous avons procédé à l'inoculation de différents mutants bactériens de cette souche, sur les lignées A17 et F83005.5. Dans les travaux que nous avons publiés, nous avons rapporté que ni le SST2 ni les EPS ne semblaient être impliqués dans la mise en place de ce phénotype. Les mécanismes de mort cellulaire étant fortement contrôlés au niveau hormonal, nous avons voulu estimer l'implication des hormones bactériennes dans l'induction de la mort de l'épiderme. L'inoculation par des mutants de synthèse de cytokinine (GRS428), d'éthylène (GMI1769) et un mutant portant une disruption de 5 gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'auxine (GMI1770) (S. Genin, pers. communication) a révélé l'induction d'une mort épidermique similaire à celle induite par la souche GMI1000. Il semble donc que ces hormones bactériennes ne sont pas impliquées dans la mise en place de ce symptôme.

L'implication du SST3 dans la mise en place de la mort épidermique a été démontrée grâce au test FDA. De manière complémentaire, il était intéressant d'observer la structure interne des poils absorbants suite à l'inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *hrcS* (témoin négatif muté dans une protéine de structure du SST3) (Figure 15). Ces observations ont permis de voir que, suite à l'inoculation par la souche GMI1000, les bactéries semblaient « attachées » aux poils absorbants. Cette inoculation a également entraîné l'induction d'une plasmolyse de ces derniers dès 24 hpi. Cette figure est caractéristique d'un stress subit par la cellule et peut être l'annonciation d'une mort cellulaire (Mino et al., 2007; Tuffi Santos et al., 2009; Volgger et al., 2009). Il était intéressant d'observer que dans le cas de l'inoculation par le mutant *hrcS*, malgré la forte



**Figure 16. Viabilité épidermique des extrémités racinaires de la lignée F83005.5 3 jpi avec l'ensemble des mutants d'ET3s testés (basé sur un test FDA).**

Notation basée sur l'échelle décrite Figure 4 de nos travaux publiés. Une note de 0 a été attribuée à un épiderme intact comme observé suite à une inoculation avec le mutant *hrp-* (GMI1402, tête de flèche bleue). Une note de 4 correspond à un épiderme mort comme observé suite à une inoculation avec la souche GMI1000 (tête de flèche noire). La médiane est indiquée par une ligne noire verticale, les quartiles sont indiqués par une boîte grise ou une ligne pointillée. Les résultats isolés sont symbolisés par un cercle. Les 9 mutants d'effecteurs semblant induire une altération épidermique moins importante que la souche GMI1000 ont été notés par une tête de flèche rouge. 3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition.

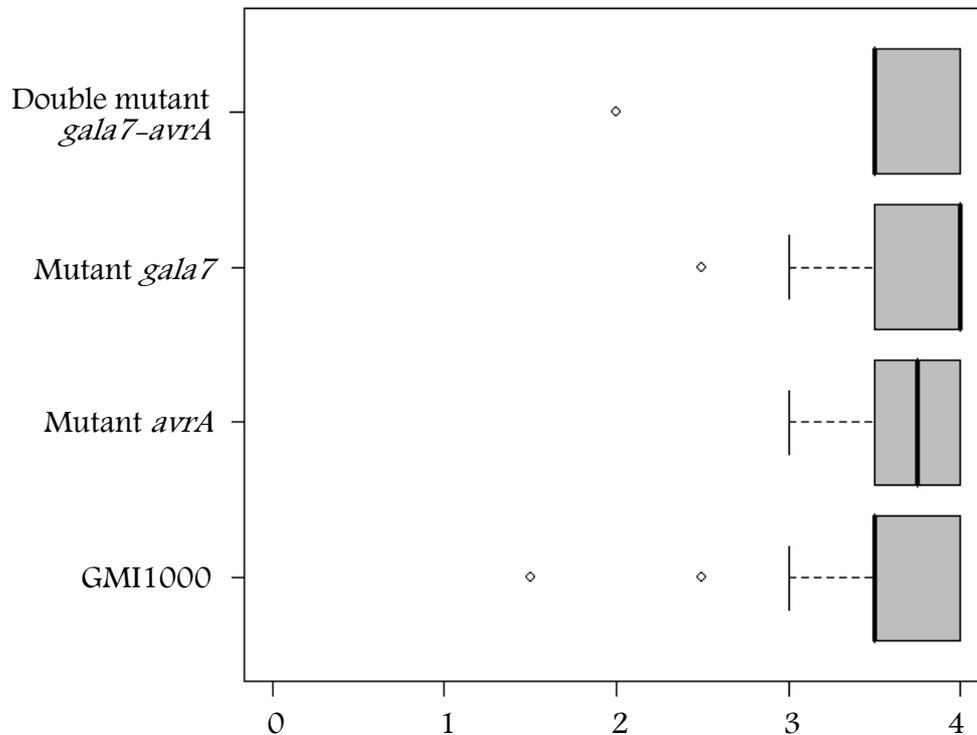
concentration bactérienne environnante, les bactéries n'ont semblé que rarement attachées aux poils absorbants. Ces derniers n'ont d'ailleurs pas présenté de figure de stress. En effet, une architecture cellulaire classiquement décrite dans la littérature (Volgger et al., 2009) avec la visualisation des cordons cytoplasmiques a été observée. Ces résultats montrent le rôle central du SST3 dans les étapes précoces de l'interaction.

### ➤ Implication des effecteurs de type III

Après avoir démontré l'implication du SST3 dans le développement des symptômes racinaires, nous avons voulu savoir si la seringue en tant que telle est responsable du phénotype ou si c'est l'injection des effecteurs. Nous avons donc inoculé les lignées A17 et F83005.5 avec les mutants *popF1* (GMI 1663) et *popF2* (GMI1664) ainsi que le double mutant *popF1-popF2* (GMI1677). En effet, les protéines codées par ces gènes sont supposées constituer le translocon responsable de l'injection des effecteurs dans la cellule végétale (Meyer et al., 2006). Les deux protéines fonctionnelles sont nécessaires à l'injection de la totalité des effecteurs. PopF1 a un rôle principal dans cette injection car sa seule mutation empêche la translocation de la majorité des effecteurs, alors que la mutation de PopF2 entraîne une légère réduction de leurs translocations. Les tests FDA suite à l'inoculation par ces 3 mutants ont révélé que l'épiderme est intact sur l'ensemble des plantes inoculées avec le double mutant. Le mutant *popF2* a entraîné la mort de l'épiderme de la totalité des plantes inoculées alors que l'inoculation par le mutant *popF1* a induit une altération de l'épiderme sur 40% des plantes observées. Il semble donc que le phénotype de mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire soit lié à l'injection d'effecteurs dans la cellule hôte des lignées résistante et sensible. Un crible basé sur la mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire a donc été effectué sur l'ensemble des mutants d'effecteurs à notre disposition.

### ➤ Identification de Gala7 et AvrA, deux ET3s impliqués dans le développement des symptômes racinaires sur la lignée A17

L'ensemble de l'étude sur l'implication des ET3s dans le processus infectieux de *R. solanacearum* chez *M. truncatula* a montré l'importance de Gala7 et AvrA dans le développement des symptômes racinaires sur la lignée sensible. Des expériences de complémentations ont donc été réalisées afin de confirmer ce résultat et les mutants complémentés ont été criblés avec le test FDA sur extrémité racinaire. Le mutant *gala7*



**Figure 17. Viabilité des extrémités racinaires de la lignée F83005.5, 3 jpi par les mutants *gala7*, *avrA* et le double mutant *gala7-avrA* (basé sur un test FDA).**

Notation basée sur l'échelle décrite Figure 4 de nos travaux publiés. Une note de 0 a été attribuée à un épiderme intact, une note de 4 correspond à un épiderme mort comme observé suite à une inoculation avec la souche GMI1000. La médiane est indiquée par une ligne noire verticale, les quartiles sont indiqués par une boîte grise ou une ligne pointillée. Les résultats isolés sont symbolisés par un cercle. 3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition.

complémenté par le gène *gala7* intact (plasmide pNP221 (Angot et al., 2006)) a induit une mortalité épidermique équivalente à la souche GMI1000. En revanche, la complémentation par le gène *gala7* délété de la F-Box (plasmide pNP222 (Angot et al., 2006)) a induit les mêmes phénotypes racinaires que le mutant *gala7*. L'implication de l'effecteur Gala7 a été validée et nous avons également pu observer l'importance d'une F-Box intacte dans le développement des symptômes racinaires.

Concernant l'implication de l'effecteur AvrA, les expériences de complémentation ont donné des résultats moins clairs que pour l'effecteur Gala7. En effet, le mutant complémenté n'a pas induit 100% de mortalité racinaire comme la souche GMI1000. Ces résultats pourraient être dus à l'effet moins fort de cet effecteur sur le phénotype et ne remettent pas en question son implication. En effet, les expériences de viabilité racinaire ont été effectuées avec deux mutants indépendants de l'effecteur AvrA contenant différentes constructions plasmidiques (GMI1758 (Turner et al., 2009) et GRS99 (Poueymiro et al., 2009)). Ces deux mutants ont induit une réduction de la mortalité de l'extrémité racinaire sur la lignée A17. Cela semble donc indiquer que c'est bien le gène *avrA* et non la construction plasmidique qui est responsable du phénotype.

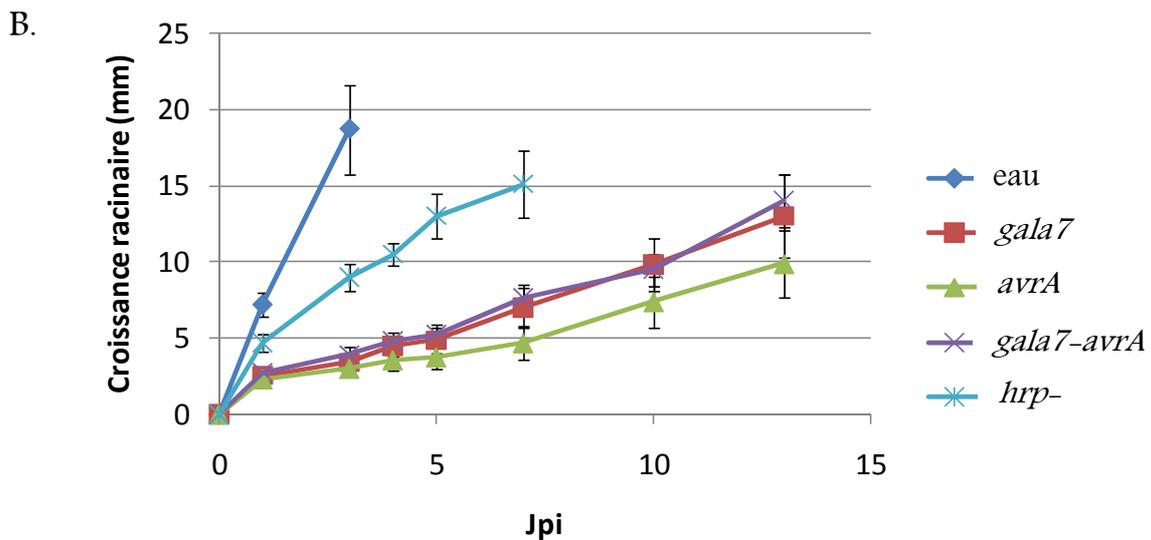
### ➤ Implication de Gala7 et AvrA sur la viabilité épidermique chez la lignée F83005.5

L'ensemble des mutants d'effecteurs a également été inoculé sur la lignée résistante F83005.5 et nous avons procédé à des tests FDA afin d'évaluer la viabilité de l'extrémité racinaire 3jpi (Figure 16). Alors qu'avec la lignée A17, les deux effecteurs AvrA et Gala7 ont clairement émergé par leurs capacités à réduire significativement l'altération de l'épiderme, cela n'a pas été le cas sur la lignée F83005.5. Aucun effecteur n'a semblé se démarquer nettement par rapport aux autres. 9 mutants semblent entraîner une réduction partielle de l'altération épidermique avec des notes médianes égales à 3, dont *avrA* (GMI1758). Il semble donc qu'en fonction des lignées, des groupes différents d'effecteurs soient responsables de l'induction d'un même phénotype.

Nous avons ensuite étudié l'effet plus précisément des mutants *avrA* et *gala7* et du double mutant *gala7-avrA* sur l'épiderme de F83005.5 (Figure 17). Il semble que cette double mutation n'entraîne pas d'amélioration de la viabilité épidermique sur cette lignée.

A.

Condition		Pourcentage de racines dont la croissance est arrêtée 14 jpi
Lignée	Souche	
A17	<i>gala7</i>	14
	<i>avrA</i>	45
	<i>gala7-avrA</i>	11
	GMI1000	97
F83005.5	<i>gala7</i>	90
	<i>avrA</i>	85
	<i>gala7-avrA</i>	82
	GMI1000	91



**Figure 18. Croissance racinaire des lignées A17 et F83005.5 après inoculation par la souche GMI1000 et les mutants *gala7*, *avrA*, *gala7-avrA* et *hrp-*.**

**A.** Tableau représentant la pourcentage de plantes dont les racines ont arrêté de croître 1 jpi et dont la croissance n'avaient pas repris à 14 jpi. **B.** Suivi de croissance racinaire de la lignée A17 sur 14 jours, moyenne des plantes dont la croissance ne s'est pas arrêtée. 3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition. Barre d'erreur IC 95%.

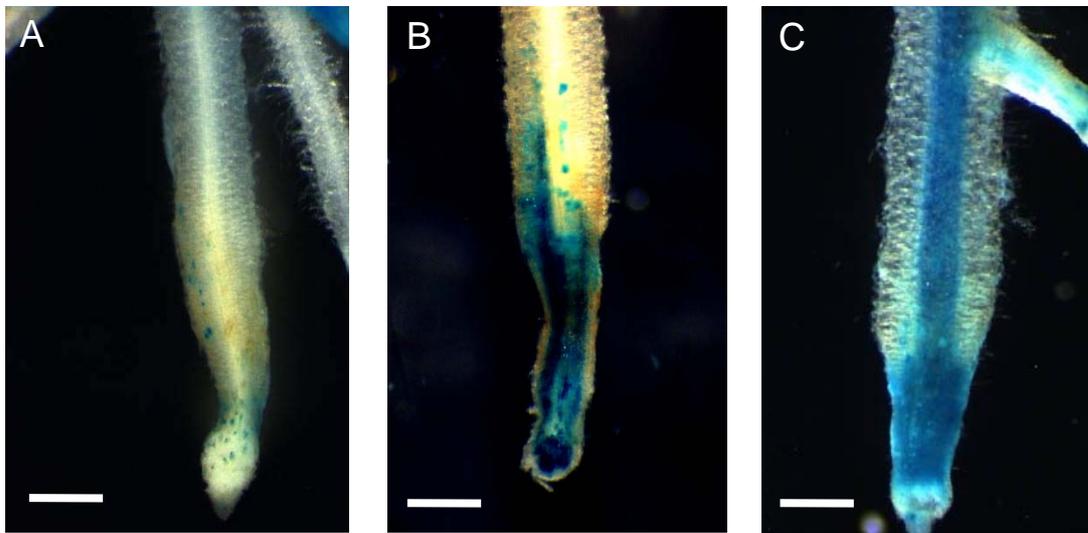
Ces résultats confortent l'idée qu'un pool différent d'effecteurs est responsable de la mortalité épidermique chez les lignées sensible et résistante.

## **2) Altération de la croissance racinaire par les ET3s**

Parmi les symptômes racinaires induit par la souche GMI1000 de manière dépendante du SST3, on observe un arrêt de croissance racinaire dès 24hpi chez les lignées A17 et F83005.5. Il faut cependant noter que si ce phénotype est dépendant du SST3, l'inoculation par le mutant *hrcS* n'était pour autant pas similaire à une inoculation par de l'eau. En effet, si l'arrêt de croissance racinaire n'a pas eu lieu avec le mutant *hrcS*, un ralentissement de cette dernière a été observé chez les 2 lignées (Figure 18).

L'étude de l'implication de Gala7 et d'AvrA sur la croissance racinaire a révélé des mécanismes complexes. En effet, avec le mutant *hrcS* la courbe de croissance était ralentie par rapport à l'eau mais était néanmoins régulière. Avec une inoculation par les mutants d'effecteurs, la croissance racinaire présentait une grande variabilité en fonction des plantes.

Chez la lignée A17 inoculée par les mutants *gala7* et *avrA*, l'arrêt de croissance définitif pouvait avoir lieu, mais de manière moins fréquente qu'avec la souche GMI1000. En effet, 14 jpi, respectivement 14% et 45% des plantes avaient une croissance racinaire arrêtée avec les mutants *gala7* et *avrA* contre 97% avec la souche GMI1000 (Figure 18A). L'inoculation par le double mutant n'a pas semblé apporter d'amélioration par rapport aux mutants simples puisque 11% des racines restaient arrêtées, ce qui est similaire aux résultats obtenus suite à l'inoculation par le mutant *gala7*. En observant la croissance des racines qui n'étaient pas arrêtées 14 jpi, on voit que de manière systématique, les plantes ont subi un ralentissement très important dans leur croissance entre 1 et 3 jpi (Figure 18B). Les plantes semblent donc subir un stress lié à l'inoculation qui n'est pas dépendant de la présence des effecteurs Gala7 et AvrA. Cependant, l'absence de ces derniers semble permettre de surmonter au moins partiellement ce stress, puisque la croissance peut repartir alors que cela n'est pas le cas avec la souche GMI1000. Le délai avant l'éventuelle reprise de croissance est variable et semble plus long avec le mutant *avrA* qu'avec le mutant *gala7*. La vitesse de croissance après reprise ne semble pas varier entre les deux mutants simples et le double mutant et semble proche de celle observée suite à une inoculation avec le mutant *hrcS*.



**Figure 19. Illustration du crible de colonisation racinaire** (basé sur l'observation de bactéries transformées avec le gène *uidA*). Barre d'échelle 0.5 mm.

**A.** Cette extrémité racinaire a été considérée comme non colonisée. Les points bleus montrent la présence de bactéries, mais elles semblent restées à un niveau superficiel de la racine et n'ont pas colonisé de manière massive le cortex. **B.** Cette extrémité racinaire a été considérée comme colonisée au niveau cortical mais non au niveau des vaisseaux conducteurs. En effet, on distingue les traces vasculaires qui semblent blanches malgré un cortex visiblement gorgé de bactérie, les vaisseaux ne sont pas clairement colonisés. **C.** Cette extrémité racinaire a été considérée comme colonisée au niveau des vaisseaux conducteurs. En effet, on voit que la coloration est visible au centre de la racine, à l'emplacement des vaisseaux conducteurs. Tant que cette zone n'était pas clairement bleue, les vaisseaux ont été considérés comme non colonisés.

Chez la lignée résistante, la mutation des effecteurs ne semble pas avoir de répercussion importante sur la croissance racinaire, qui est arrêtée de manière similaire à une inoculation par la souche GMI1000. L'ensemble des symptômes racinaires semble lié à des pools d'effecteurs qui diffèrent en fonction des lignées étudiées.

## **B. Comment se déroule l'infection chez une lignée sensible et une lignée résistante?**

La colonisation de *M. truncatula* par la souche GMI1000 et des mutants d'effecteurs a été étudiée grâce à l'utilisation de bactéries transformées pour avoir une expression constitutive du gène *uidA*. Cela a permis une visualisation et une quantification bactérienne par la révélation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase (GUS) avec différents substrats. Les observations présentées dans nos travaux publiés ont permis d'un côté, une comparaison de la lignée sensible avec la lignée résistante, de l'autre, une comparaison de la propagation des mutants *gala7* et *avrA* chez la lignée sensible. Chez la lignée sensible inoculée par la souche GMI1000, les bactéries commencent à se multiplier dans le cortex 3 jpi puis atteignent les vaisseaux conducteurs 7 jpi, ce qui peut entraîner le flétrissement des parties aériennes. Chez la lignée résistante, les bactéries peuvent se multiplier dans la zone corticale mais de manière moins systématique que chez la lignée sensible. En revanche, les bactéries n'ont jamais été détectées dans les vaisseaux conducteurs de la lignée F83005.5. Chez la lignée sensible A17, le mutant *gala7* n'a pas semblé capable de coloniser et se multiplier dans la zone corticale de l'extrémité racinaire et n'a pas induit de symptômes foliaires. Le mutant *avrA* n'a pas présenté les mêmes caractéristiques, puisqu'il a été détecté dans les mêmes zones que la souche GMI1000. La différence principale entre la souche sauvage et ce mutant semblant être dans l'intensité de colonisation puisque le mutant *avrA* pénètre de manière moins fréquente la zone corticale et les vaisseaux conducteurs que la souche sauvage. Il a induit en moyenne cinq fois moins de plantes flétries que la souche GMI1000. Les données présentées dans les prochains paragraphes visent tout d'abord à préciser le crible qui a été effectué *in planta* afin de déterminer les colonisations bactériennes dans chaque condition. Dans un second temps, l'étude de la colonisation des extrémités racinaires par les mutants *gala7* et *avrA* chez la lignée résistante sera présentée. Ensuite, une estimation de la quantification bactérienne par mesure d'activité GUS sera illustrée pour les différentes conditions étudiées.



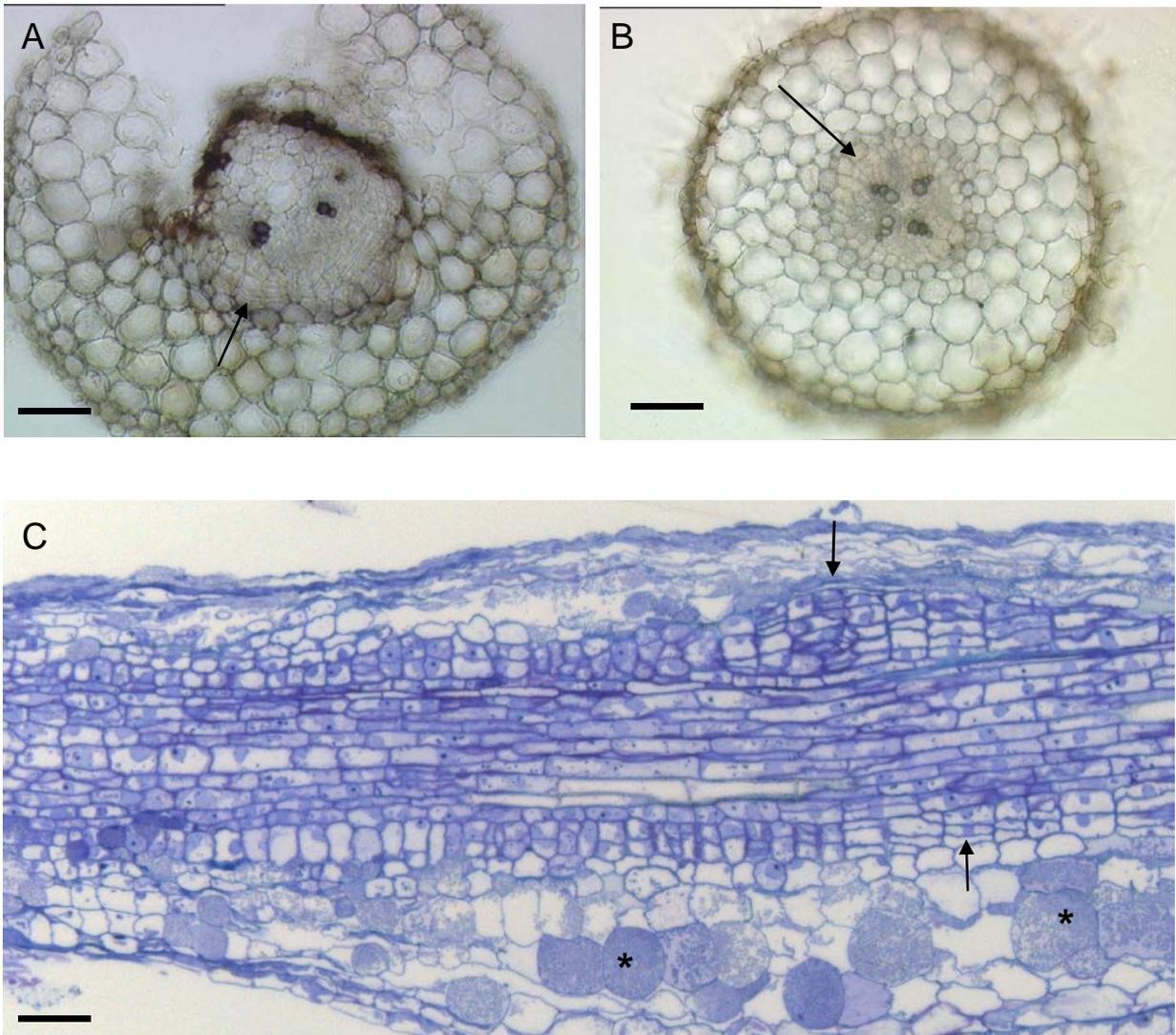
**Figure 20. Morphologie et colonisation de l'extrémité racinaire de la lignée A17 inoculée par le mutant *avrA* (transformé avec le gène *uidA*).** La racine présente une zone brune qui s'est développée dans les premiers jours après inoculation lorsque la croissance était fortement ralentie. On voit que la croissance racinaire est ensuite repartie, cette zone ne présente pas de brunissement ni de colonisation bactérienne. Des colonisations superficielles sous forme de taches bleues sont visibles, notamment au niveau de la zone marron (flèche). Barre d'échelle 0.5 mm.

## 1) Mise en place du crible GUS

L'explication du crible sur la colonisation racinaire dont les résultats ont été publiés Figure 5 est présenté ici Figure 19. Dans cette expérience, l'activité GUS est visualisée *in planta* en utilisant comme substrat le X-gluc, qui une fois scindé par l'enzyme forme du X-X qui a un couleur bleue visible.

Les extrémités considérées comme non colonisées (Figure 19A) ont pu présenter des « taches » bleues de manière superficielle. Nous n'avons pas pris en considération ce paramètre pour plusieurs raisons. Tout d'abord, malgré les rinçages opérés au cours de la révélation de l'activité GUS, il est parfois resté des bactéries en surface et seules des coupes systématiques des extrémités auraient pu nous dire si les bactéries sont effectivement rentrées ou pas. La lourdeur de cette expérience ne nous a pas permis de mettre ce système de vérification en place. Ensuite, si cette présence bactérienne reste superficielle, cela sous-entend qu'il y a un mécanisme en jeu limitant la colonisation massive du cortex comme celle observée Figure 19B ou C. Assimiler une colonisation superficielle de l'extrémité racinaire avec une colonisation massive des tissus aurait donc pu à notre sens, induire une confusion dans la réflexion. En parlant du côté massif de la colonisation, il est important de préciser d'ailleurs que la révélation de l'activité GUS ne permet pas de visualiser des quantités faibles de bactéries. De plus, des « taches » bleues similaires ont pu être observées à différents endroits sur la racine et particulièrement au niveau de la zone marron lorsque la racine est repartie suite à une inoculation avec les mutants d'effecteurs (Figure 20). Nous avons donc assimilé ce phénomène plus à une tentative de colonisation qu'à une colonisation effective.

L'extrémité présentée Figure 19B est principalement représentative de la lignée F83005.5 inoculée par GMI1000 dont les vaisseaux ne semblent pas contenir de bactéries. Le crible à la loupe binoculaire ne donne pas une très grande précision sur la localisation des bactéries, seule une colonisation sans doute de la zone centrale de la racine a été comptabilisée comme colonisée au niveau des vaisseaux conducteurs (Figure 19C). Afin de vérifier la présence de bactéries au sein de vaisseaux conducteurs de la lignée F83005.5, des coupes en résines ont été entreprises avec une coloration au bleu de toluidine. Les résultats ont confirmé l'absence de détection de la souche GMI1000 dans les vaisseaux conducteurs de la lignée F83005.5 (Figure 21C).



**Figure 21. Illustration des divisions cellulaires autour des vaisseaux conducteurs**

**A.** Coupe transversale d'une extrémité racinaire de la lignée A17 inoculée par le mutant *avrA*, dont la croissance était arrêtée lors du prélèvement 7 jpi. On voit un phénomène de divisions cellulaires massives autour des vaisseaux conducteurs (flèche pleine). Barre d'échelle 40  $\mu\text{m}$ . **B.** Coupe transversale de la lignée F83005.5 3 jpi par la souche GMI1000. On voit des phénomènes de divisions cellulaires autour des vaisseaux conducteurs, qui semblent limités dans leur envergure. Barre d'échelle 40  $\mu\text{m}$ . **C.** Coupe longitudinale de la lignée F83005.5 7jpi par la souche GMI1000. On voit également les phénomènes de divisions autour des vaisseaux conducteurs (flèche pleine). Cette vue longitudinale reflète bien l'hétérogénéité de ce phénomène le long des vaisseaux conducteurs et nous aide à comprendre la variabilité rencontrée avec les coupes transversales. Cette coupe nous permet également de voir que malgré la colonisation massive du cortex par les bactéries (étoile), on ne les détecte pas dans les traces vasculaires. Barre d'échelle 20  $\mu\text{m}$

La Figure 19C présente une configuration observée principalement chez la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000 et plus rarement avec le mutant *avrA*. Dans ce cas de figure, la colonisation du cylindre central a été comptabilisée.

## **2) Colonisation des extrémités racinaires de la lignée résistante**

Nous avons vu que les effecteurs impliqués dans l'apparition des symptômes chez la lignée sensible ne semblaient pas impliqués dans ce processus chez la lignée résistante. Nous avons donc voulu savoir si les mutants *gala7* et *avrA*, qui induisent des symptômes racinaires similaires à la souche GMI1000, colonisent la plante de la même manière. 14 jpi, aucune colonisation des mutants n'a été détectée dans l'extrémité racinaire de la lignée F83005.5. Il semble donc que ces effecteurs aient un rôle dans le pouvoir infectieux de *R. solanacearum* chez la lignée résistante qui serait différent de celui observé chez la lignée sensible.

## **3) Evolution de la multiplication bactérienne *in planta***

Une quantification bactérienne a été effectuée sur l'ensemble de la racine par mesure de l'activité GUS en utilisant comme substrat le 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide hydrate (MUG). Les racines ont été broyées et les protéines extraites avant de procéder au dosage enzymatique. La révélation de l'activité GUS se fait par détection de la formation de 4-methylumbelliférol (MU), produit fluorescent dont la concentration peut-être estimée par un fluorimètre. Les résultats montrent que seule la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000 présente une multiplication bactérienne plus importante par rapport aux autres conditions (Figure 22). Il semble donc que la colonisation des extrémités racinaires de la lignée F83005.5 ou des vaisseaux de la lignée A17 avec le mutant *avrA* induise une multiplication bactérienne trop limitée ramenée à l'ensemble des racines pour être différentielle par rapport aux autres conditions.

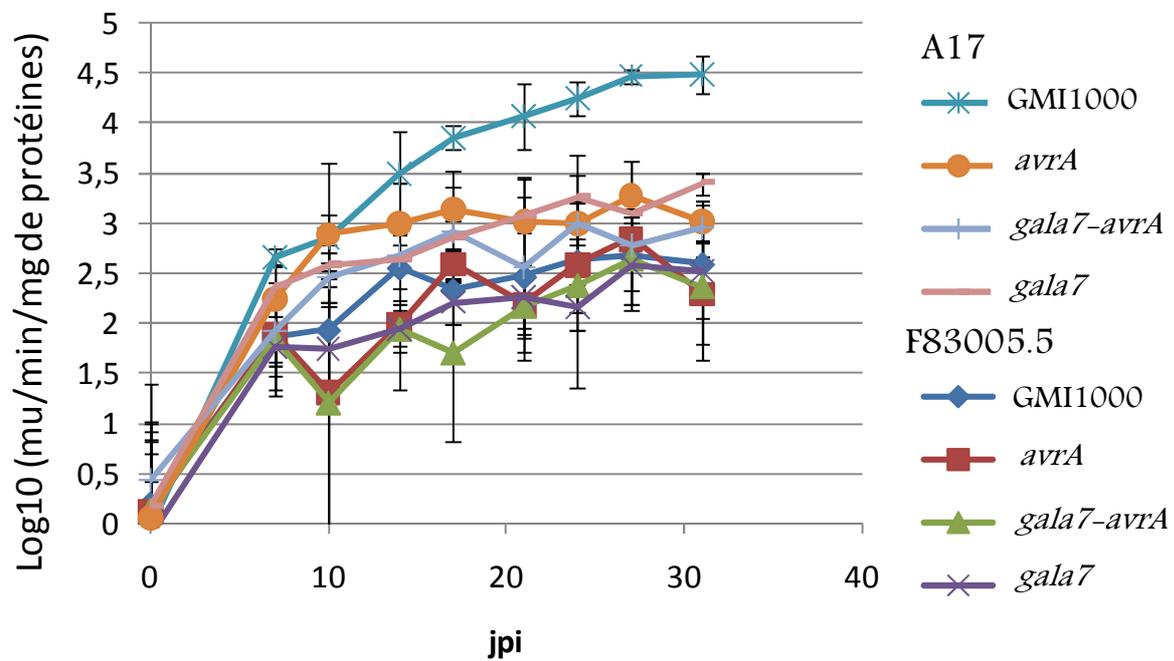


Figure 22. Quantification bactérienne par dosage enzymatique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase suite à l'inoculation sur racines intactes des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000 et les mutants *avrA*, *gala7* et *avrA-gala7* (utilisation de bactéries transformées avec le gène *uidA*). 3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition. Barre d'erreur IC95%.

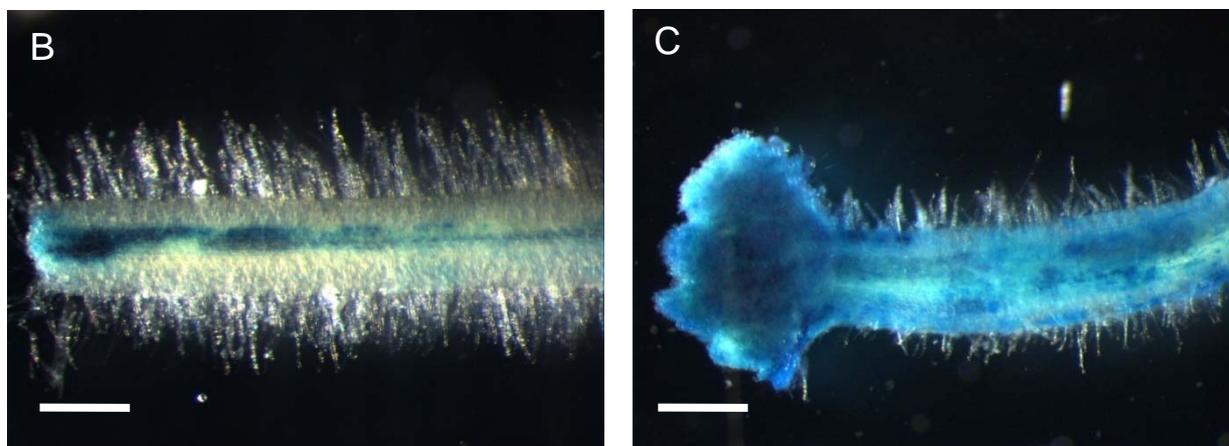
## C. Comment se déroule l'infection en s'affranchissant de l'étape de pénétration chez la lignée sensible et la lignée résistante?

L'étude de l'interaction suite à une inoculation sur racine intacte des lignées résistante et sensible a permis de mettre en évidence que l'étape de pénétration est déterminante pour la suite du processus infectieux et l'apparition des symptômes foliaires. L'implication de *Gala7* et *AvrA* dans les étapes précoces de l'interaction avec la lignée sensible a clairement été établie. Il a donc été intéressant d'étudier l'interaction entre *R. solanacearum* et *M. truncatula* en éliminant l'étape de pénétration par l'extrémité racinaire et une inoculation sur racine coupée a donc été entreprise. Les résultats publiés précédemment par le laboratoire (Vailleau et al., 2007) ont montré que la lignée F83005.5 est résistante dans ces conditions. Nos travaux publiés ont concerné la lignée sensible inoculée par la souche GMI1000 et les mutants *gala7* et *avrA*. Ils ont montré que dans ces conditions, le mutant *avrA* a un comportement similaire à la souche GMI1000 en induisant la mort de la totalité des plantes. Le pourcentage de plantes flétries suite à l'inoculation par le mutant *gala7* et le double mutant est respectivement de 40% et 30%. Nous avons donc voulu savoir plus précisément comment se déroule l'infection suite à l'inoculation de racines coupées. Nous avons donc étudié la propagation et la multiplication bactérienne dans les différentes conditions par utilisation des souches exprimant la  $\beta$ -glucuronidase de manière constitutive.

### 1) Analyse de la propagation bactérienne

**Chez la lignée A17** : L'intérêt d'une inoculation sur racine coupée est de passer outre les mécanismes de pénétration dans l'extrémité racinaire, afin d'atteindre directement les vaisseaux conducteurs. Des expériences de révélation d'activité GUS *in planta* ont permis de voir la propagation des bactéries dans les différentes conditions (Figure 23). A 12 jpi, 100% des racines de la lignée A17 sont colonisées suite à une inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA*. Suite à une inoculation par la souche *gala7*, 36% des racines sont colonisées. En comparant ces résultats avec le taux de flétrissement des parties aériennes présenté Figure 7 de la publication, il semble que la colonisation racinaire reflète

A.	A17	F83005.5
Mutant <i>gala7</i>	36	5
Mutant <i>avrA</i>	100	63
GMI1000	100	72
Mutant <i>hrcV</i>	18	5



**Figure 23. Colonisation bactérienne des lignées A17 et F83005.5 après inoculation sur racine coupée** (utilisation de souches transformées avec le gène *uidA*).

A. Pourcentage de plantes dont plus de 75% de la racine sont colonisées 12 jpi. B. Extrémité de la lignée A17 inoculée par GMI1000 12 jpi. On voit en bleu la colonisation des vaisseaux conducteurs par la bactérie. C. Extrémité de la lignée A17 inoculée par la souche *hrcV*. L'extrémité présente une structure calleuse et les bactéries ne semblent pas localisées dans le cylindre central. 3 répétitions ont été effectuées avec 10 plantes par répétition. Barre d'échelle 0.25 mm.

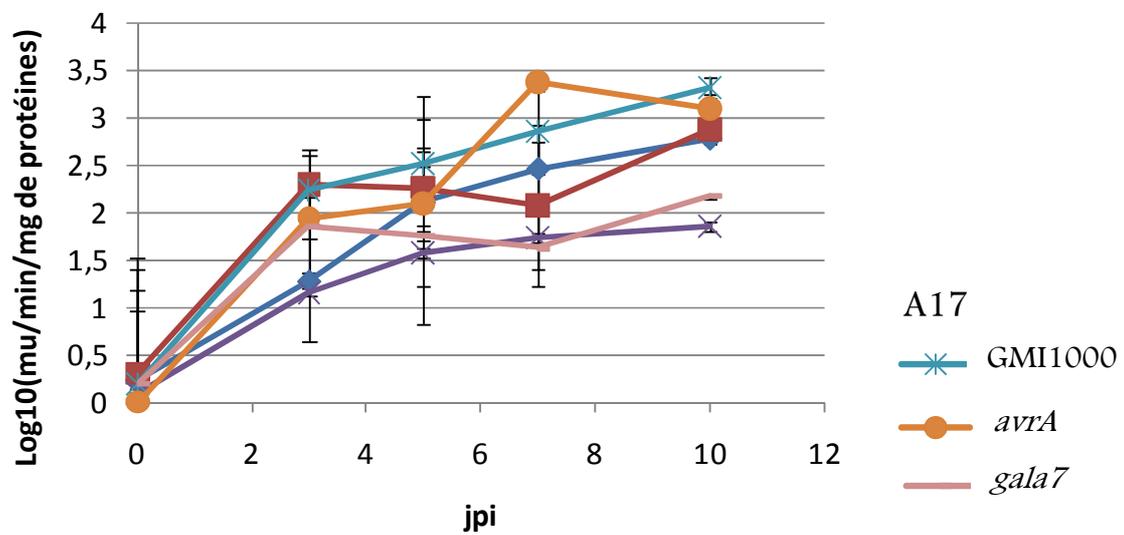
l'induction des symptômes foliaires pour la lignée A17. La réduction de mortalité foliaire rencontrée avec le mutant *gala7* en condition coupée serait due à un mécanisme limitant sa pénétration ou sa multiplication dans les tissus conducteurs.

**Chez la lignée F83005.5** . La lignée F83005.5 est résistante à la souche GMI1000, que l'inoculation se déroule sur racine intacte ou coupée. Sur racine intacte, les bactéries semblent s'arrêter au niveau du cylindre central puisqu'on ne les détecte pas dans les vaisseaux conducteurs. Suite à une inoculation sur racine coupée, les mécanismes en jeu semblent différents puisque les bactéries se multiplient dans les vaisseaux conducteurs de 72% des plantes, sans pour autant être détectées dans les parties aériennes et induire de flétrissement de la plante (Figure 23A). Les résultats sont similaires avec le mutant *avrA* (Figure 23A). L'observation de la plante dans son ensemble nous permet de constater que les bactéries seraient arrêtées au niveau du franchissement des parties aériennes. Un mécanisme limitant la propagation de la bactérie se mettrait en place au niveau du collet chez la lignée F83005.5. Cette différence observée avec la lignée sensible pourrait être liée à des différences structurales au niveau du collet ou à des mécanismes de résistance mise en place par la lignée F83005.5.

Le cas de la souche *gala7* montre la même particularité qu'avec la lignée A17 puisque les parties racinaires de F83005.5 ne sont que très peu colonisées par ce mutant. Le mutant *gala7* semble donc limité dans sa capacité à pénétrer la racine des deux lignées A17 et F83005.5, même lorsque l'extrémité est coupée lors de l'inoculation.

**Les témoins *hrp*** . L'inoculation par le mutant *hrcS* sur des racines coupées des lignées A17 et F83005.5 n'a pas entraîné de flétrissement des parties aériennes et a induit la formation d'une structure calleuse à l'extrémité de la racine (Figure 23C). Cette structure visible au niveau macroscopique a été induite par les 2 mutants *hrcV* et *hrcS* utilisés. La colonisation racinaire a été observée suite à l'inoculation par le mutant *hrcV* transformé par le gène *uidA*. La structure calleuse semble colonisée par la bactérie et les structures vasculaires sont difficiles à distinguer car la zone corticale semble également colonisée par la bactérie. Il aurait donc fallu faire des coupes de manière systématique pour localiser précisément la bactérie. La lourdeur de la procédure ne nous a pas permis d'effectuer cette vérification et la localisation intra vasculaire ne peut donc pas être affirmée ou infirmée avec certitude.

### A. Racines



### B. Feuilles

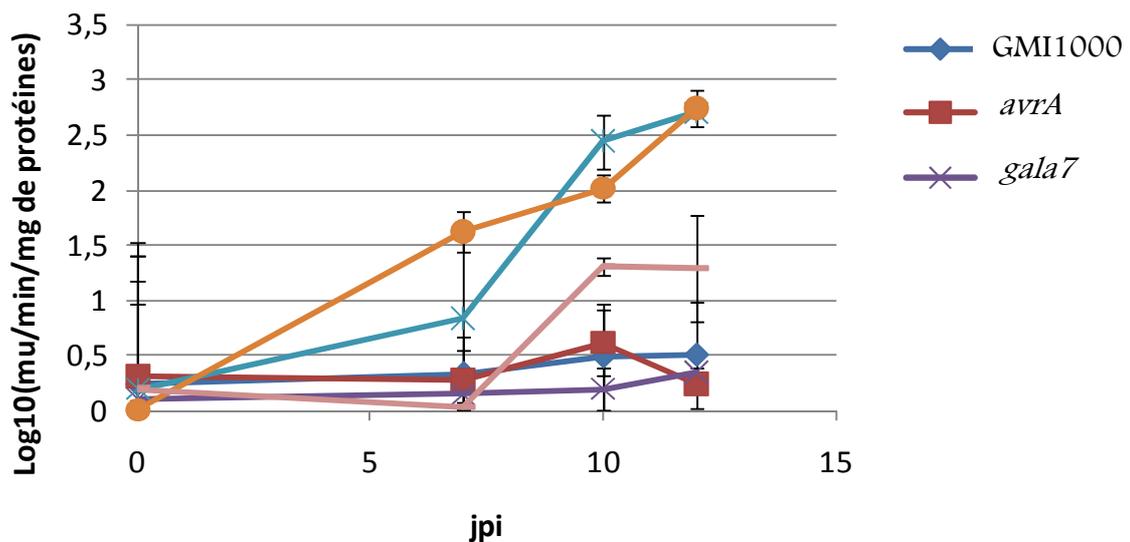


Figure 24. Quantification bactérienne par dosage enzymatique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase suite à l'inoculation sur racine coupée des lignées A17 et F83005.5 par la souche GMI1000 et les mutants *avrA*, *gala7* (utilisation de bactéries transformées avec le gène *uidA*).

Les racines (A) et les feuilles (B) ont été prélevées séparément et un dosage d'activité enzymatique a été effectué sur les deux types de tissus. 3 répétitions biologiques ont été effectuées avec 10 plantes par répétition. Barre d'erreur IC95%.

## **2) Analyse de la multiplication bactérienne *in planta***

Une quantification bactérienne a été effectuée par dosage de l'activité GUS sur les parties racinaires et foliaires (Figure 24). L'estimation de la multiplication bactérienne a donné des résultats cohérents avec les observations faites directement *in planta*.

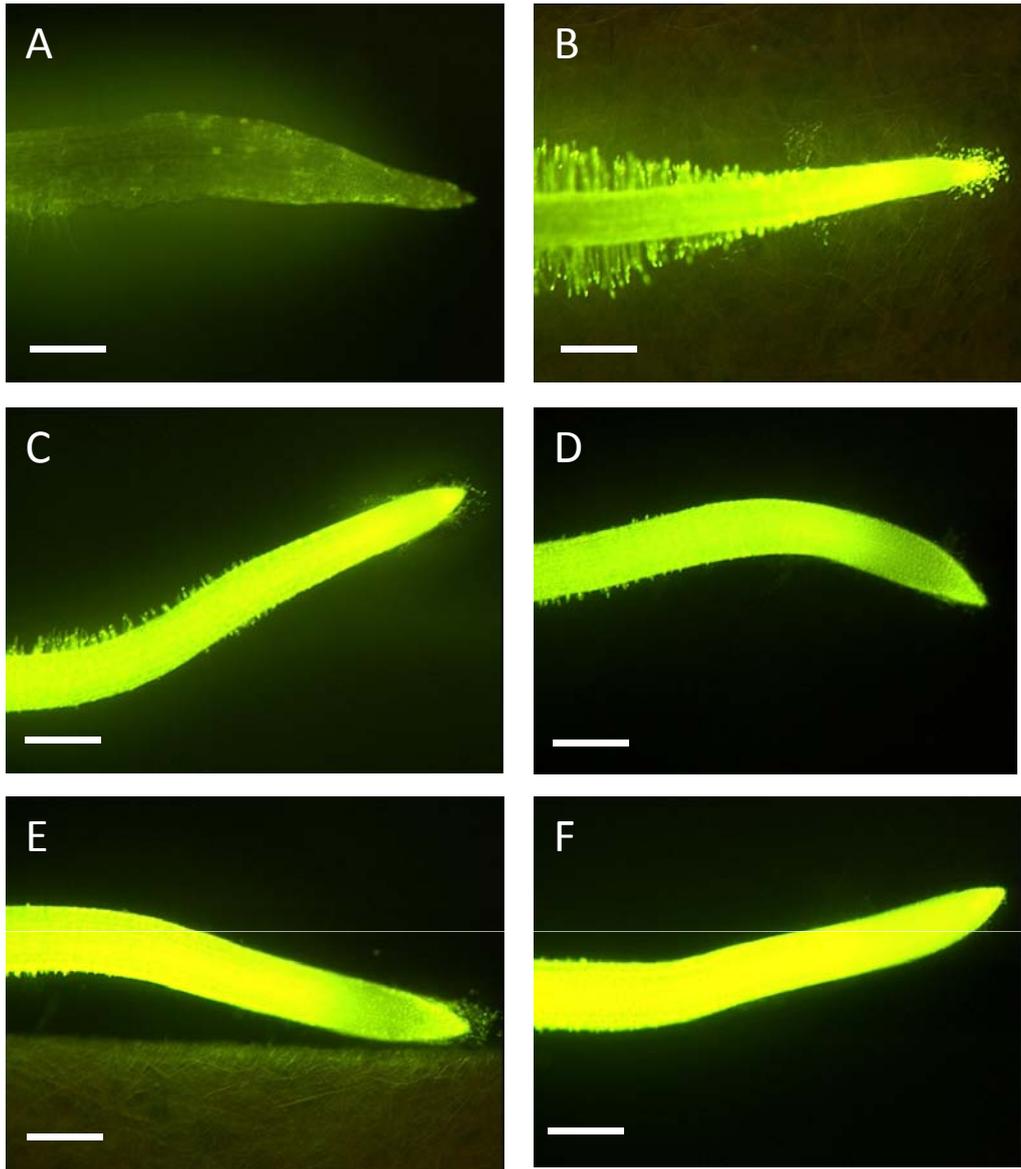
Au niveau racinaire (Figure 24A), à 10 jpi, il n'a pas été possible de distinguer la multiplication bactérienne au sein des 2 lignées étudiées suite à une inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA*. En revanche, la multiplication bactérienne a été réduite suite à l'inoculation avec le mutant *gala7* dans les 2 lignées et de manière plus importante chez la lignée F83005.5 où les bactéries ne rentrent que dans 5% des cas (Figure 23A).

Au niveau foliaire (Figure 24B), la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000 et le mutant *avrA* a présenté une multiplication bactérienne importante et apparemment similaire au sein de ses tissus. L'inoculation par le mutant *gala7* a entraîné une multiplication bactérienne moins importante que les conditions précédentes. La multiplication bactérienne au sein des feuilles de la lignée F83005.5 semble quasi nulle et inférieure à celle rencontrée chez la lignée A17 par le mutant *gala7* à 10 jpi.

Les résultats de quantification bactérienne ont permis de confirmer la forte présence bactérienne au niveau racinaire chez les deux lignées et une multiplication moins importante avec le mutant *gala7*. La quantification bactérienne dans les parties foliaires reflète bien le développement des symptômes de flétrissement observés dans les différentes conditions.

## **IV. L'interaction évaluée du côté du partenaire végétal**

Nous avons vu que du côté du partenaire bactérien, le processus infectieux implique des mécanismes complexes faisant intervenir le SST3 et particulièrement deux effecteurs, Gala7 et AvrA. Nous avons ensuite étudié les voies métaboliques impliquées côté végétal et les éventuelles modifications cellulaires de la plante liées à l'infection de la bactérie. Nous avons ensuite analysé l'implication du SST3 et des effecteurs Gala7 et AvrA dans ces processus.



**Figure 25. Viabilité de l'extrémité racinaire (test FDA) 3 jpi par la souche GMI1000 (A, C et E) ou par de l'eau (B, D et F).**

**A-B.** Lignée A17. **C-D.** Lignée A17 prétraitée 24h avant inoculation par un inhibiteur de biosynthèse de l'éthylène, l'AVG. **E-F.** Mutant de transduction de l'éthylène *sk1*. Barre d'échelle 0.5 mm.

## A. L'éthylène est-il impliqué dans le processus infectieux ?

Nous avons vu que les symptômes racinaires induit par la bactérie sont notamment un arrêt de croissance racinaire et une mort de l'épiderme de l'extrémité racinaire. Les phénomènes de division, d'élongation, de maturation et de mort cellulaire sont notamment contrôlés par une hormone végétale pléiotrope, l'éthylène. Nous nous sommes donc intéressés à son importance dans le processus infectieux de *R. solanacearum*. Nous avons donc suivi l'infection par la souche GMI1000 d'un mutant de transduction de l'éthylène dérivé de la lignée A17, *skI*, et de la lignée A17 prétraitée 24h avant inoculation avec un inhibiteur chimique de la biosynthèse de l'éthylène, l'Aminoethoxyvinylglycine (AVG). Comme situations contrôles, nous avons utilisé le mutant *skI* inoculé avec de l'eau, la lignée A17 traitée avec de l'AVG seul, inoculée avec un mutant bactérien de biosynthèse de l'éthylène dérivé de la souche GMI1000, *ethylene forming enzyme (efe)* ou inoculée par la souche GMI1000. Nous avons évalué le rôle de l'éthylène à chaque étape du déroulement de l'infection sur racines intactes, du développement des symptômes racinaires aux symptômes foliaires.

### 1) L'éthylène est nécessaire au développement des symptômes racinaires

Un test FDA de viabilité de l'extrémité racinaire a été mis en place dans les différentes conditions mentionnées, en inhibant ou non la voie de l'éthylène de la plante (Figure 25) ou de la bactérie. Ce test a révélé qu'en inhibant la synthèse de l'éthylène par la bactérie, les symptômes développés sur la lignée sensible sont identiques à ceux observés avec la souche GMI1000. En revanche, en inhibant de manière génétique ou chimique la transduction ou la synthèse d'éthylène par la plante, les extrémités racinaires inoculées par la souche GMI1000 ne présentent pas d'altération de leur épiderme. L'étude de la lignée A17 traitée par l'AVG seul ou du mutant *skI* inoculé avec de l'eau n'a pas révélé d'altération de l'épiderme racinaire. Une voie éthylène de la plante intacte semble nécessaire à l'induction de la mortalité de l'épiderme par la souche GMI1000.

Nous avons ensuite voulu observer l'implication de cette voie dans la mise en place des autres symptômes racinaires, l'arrêt de croissance et le brunissement de l'extrémité

racinaire. L'inoculation de la lignée A17 par le mutant *efe* a révélé des résultats similaires à la souche GMI1000. En revanche, l'inoculation par la souche GMI1000 n'a pas entraîné d'arrêt de croissance ni de brunissement de l'extrémité racinaire lorsque la voie éthylène est inhibée. L'étude de la lignée A17 traitée par l'AVG seul ou du mutant *skl* inoculé avec de l'eau n'a pas révélé d'arrêt de croissance racinaire.

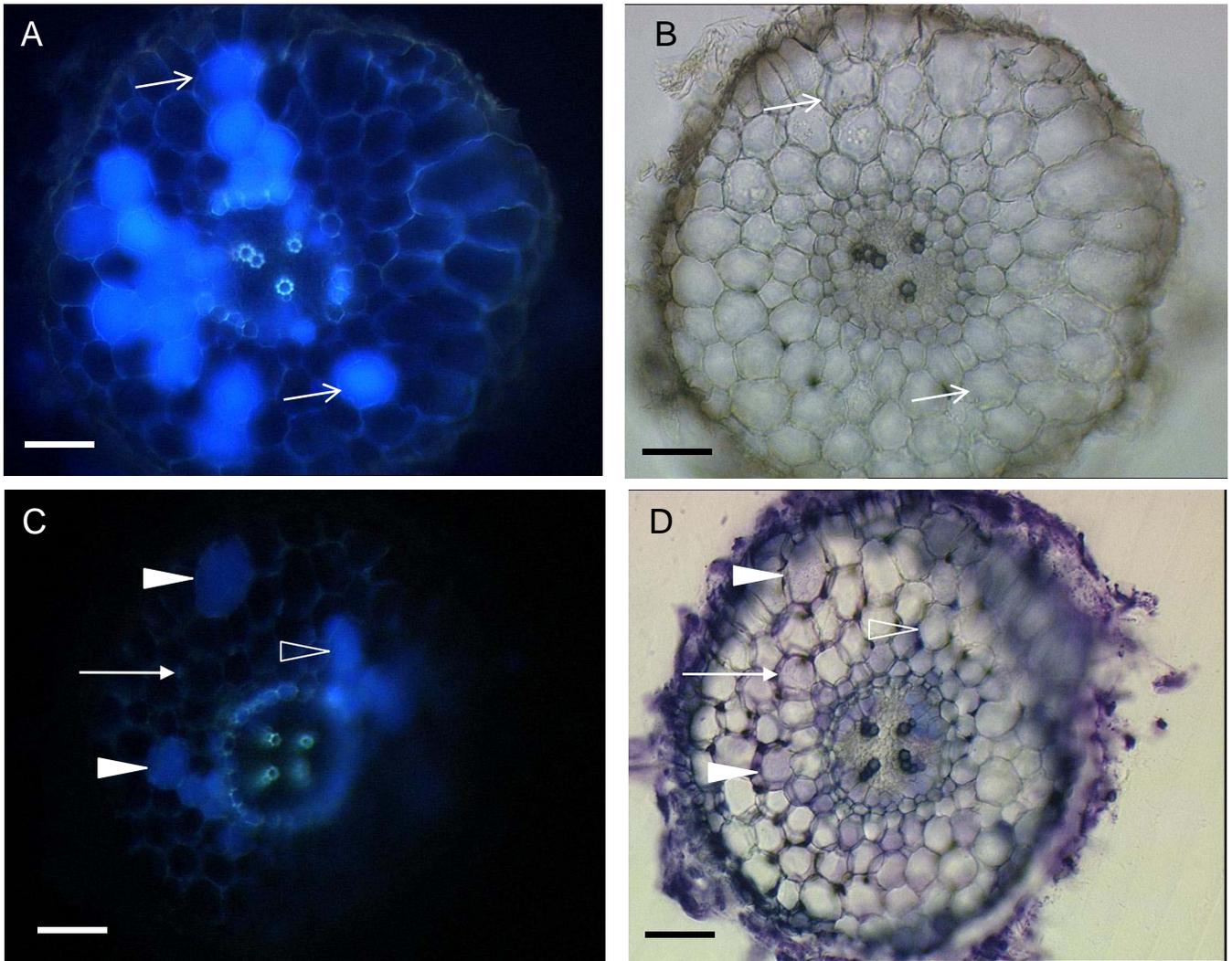
Une voie éthylène intacte chez la plante semble nécessaire à la mise en place de l'ensemble des symptômes racinaires par la bactérie.

## **2) L'éthylène est nécessaire à la colonisation bactérienne et au développement des symptômes foliaires en système non coupé**

Après avoir vu l'importance d'une voie éthylène intacte chez la plante pour le développement des symptômes racinaires, nous avons voulu analyser son rôle dans la colonisation bactérienne et le développement des symptômes foliaires. L'inoculation de la souche GMI1000 portant une expression constitutive du gène *uidA* sur le mutant *skl* ou la lignée A17 prétraitée par l'AVG a permis de localiser la bactérie *in planta*. Dans ces conditions, aucune colonisation racinaire n'a été observée, au niveau des extrémités racinaires ou des aisselles des racines secondaires. En parallèle, nous avons également suivi l'apparition des symptômes foliaires et aucun flétrissement n'a été observé lorsque la voie éthylène n'était pas intacte. Le mutant *efe* a induit des symptômes équivalents à la souche GMI1000. Il semble donc que la colonisation bactérienne et le développement des symptômes foliaires nécessitent également une voie éthylène intacte chez la plante.

## **B. Quelles sont les modifications cellulaires liées à l'infection chez les lignées sensible et résistante?**

Nous avons vu que l'extrémité racinaire est une zone clé dans le processus infectieux de *R. solanacearum* chez *M. truncatula*. En effet, c'est le lieu de la mise en place de symptômes caractéristiques et de la pénétration bactérienne. Différentes expériences ont donc été menées dans cette zone afin d'analyser plus finement les modifications cellulaires observables chez la plante, suite à son infection par la souche GMI1000. D'un côté, l'analyse de la présence de composés phénoliques et d'éventuelles modifications morphologiques a été



**Figure 26. Autofluorescence et colonisation bactérienne de la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000.**

Coupes transversales d'extrémités racinaires 7jpi. **A** et **B**. Même coupe sous éclairage UV (**A**) ou en fond clair (**B**). On voit la présence de cellules autofluorescentes (flèches blanches) (**A**) sans qu'elles ne présentent de phénotype particulier en fond clair (**B**). **C** et **D**. Même coupe sous éclairage UV (**C**) ou en fond clair après coloration au bleu de toluidine qui révèle la présence de bactérie en violet (**D**). On peut observer une correspondance partielle entre la présence de la bactérie et l'autofluorescence des cellules. Certaines cellules autofluorescentes semblent remplies de bactéries (tête de flèche pleine), d'autres non (tête de flèche vide). Certaines cellules ne présentent pas d'autofluorescence et semblent pourtant remplies de bactéries (flèche pleine). Barre d'échelle 0.1 mm.

effectuée sur coupe transversale. D'un autre côté, la production de ROS a été étudiée, d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

### **1) Production de composés phénoliques et modifications morphologiques**

Une analyse de la structure racinaire et de potentiels mécanismes de défense a été effectuée par l'analyse de coupes transversales d'extrémités racinaires 3 et 7 jpi. Au total, 4 critères ont été retenus pour étudier les modifications éventuelles induites par la souche GMI1000 sur les lignées A17 et F83005.5: lignification de l'endoderme, divisions autour du cylindre central, autofluorescence des parois corticales et du contenu cellulaire. Nos travaux publiés rapportent la mise en évidence de lignification et d'autofluorescence pariétale chez les lignées A17 et F83005.5. Une lignification de l'endoderme a été observée chez les deux lignées suite à une inoculation par la souche GMI1000, mais elle était observable plus précocement chez la lignée résistante, dès 3jpi. L'autofluorescence des parois corticales a également été observée chez les deux lignées mais de manière plus systématique chez la lignée résistante 7jpi. La suite des résultats illustre donc la description et les résultats obtenus pour les deux critères non publiés chez les deux lignées inoculées par la souche GMI1000, l'autofluorescence du contenu cellulaire et les divisions autour du cylindre central.

#### **➤ Description des nouveaux critères étudiés**

**Autofluorescence intracellulaire** : Suite à un éclairage dans l'ultra violet (UV), certaines coupes ont révélé une autofluorescence du contenu de certaines cellules (Figure 26A etC), sans pour autant présenter un phénotype particulier en fond clair. Ce phénomène n'a jamais été observé suite à une inoculation par l'eau. Une racine a été considérée comme présentant une autofluorescence du contenu cellulaire à partir du moment où une cellule autofluorescente a été détectée sur une des coupes de cette racine.

**Divisions cellulaires** : En fond clair, certaines coupes ont présenté des divisions cellulaires autour des vaisseaux conducteurs (Figure 21). Ces observations ont été variables dans leurs intensités et dispositions et n'ont jamais eu lieu suite à une inoculation par de l'eau. Les deux coupes transversales A et B illustrent respectivement des phénomènes de divisions massives et déformantes, et des phénomènes de divisions limitées et homogènes

**Tableau 4. Analyse des modifications cellulaires observées en coupe transversale, induites au cours de l'infection des lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* par la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.**

Les chiffres donnés représentent le pourcentage de racines concernées par le phénotype étudié. La lignification de l'endoderme a été détectée par utilisation de phloroglucinol (dans la publication de nos travaux Figure 4). L'autofluorescence a été détectée sans utilisation de colorant et par une illumination dans les UV au niveau pariétal (dans la publication de nos travaux Figure 4) ou au niveau du contenu cellulaire (phénotype décrit dans le texte et illustré Figure 26). Le phénomène de divisions cellulaires autour du cylindre central est décrit dans le texte et illustré Figure 21.

Lignée	Souche	Condition de prélèvement	Nombre de racines observées	Pourcentage de racines présentant le phénotype donné			
				Lignification endoderme	Autofluorescence pariétale	Autofluorescence cellulaire	Divisions cellulaires
A17	GMI1000	3 jpi	17	24	59	47	0
A17	GMI1000	7 jpi	25	92	68	92	16
A17	GMI1000	plante malade	2	100	100	0	100
F83005.5	GMI1000	3 jpi	20	90	90	10	40
F83005.5	GMI1000	7 jpi	24	79	92	54	29

autour du cylindre central. Une racine a été considérée comme présentant des divisions cellulaires à partir du moment où elles ont été observées sur une des coupes de la racine.

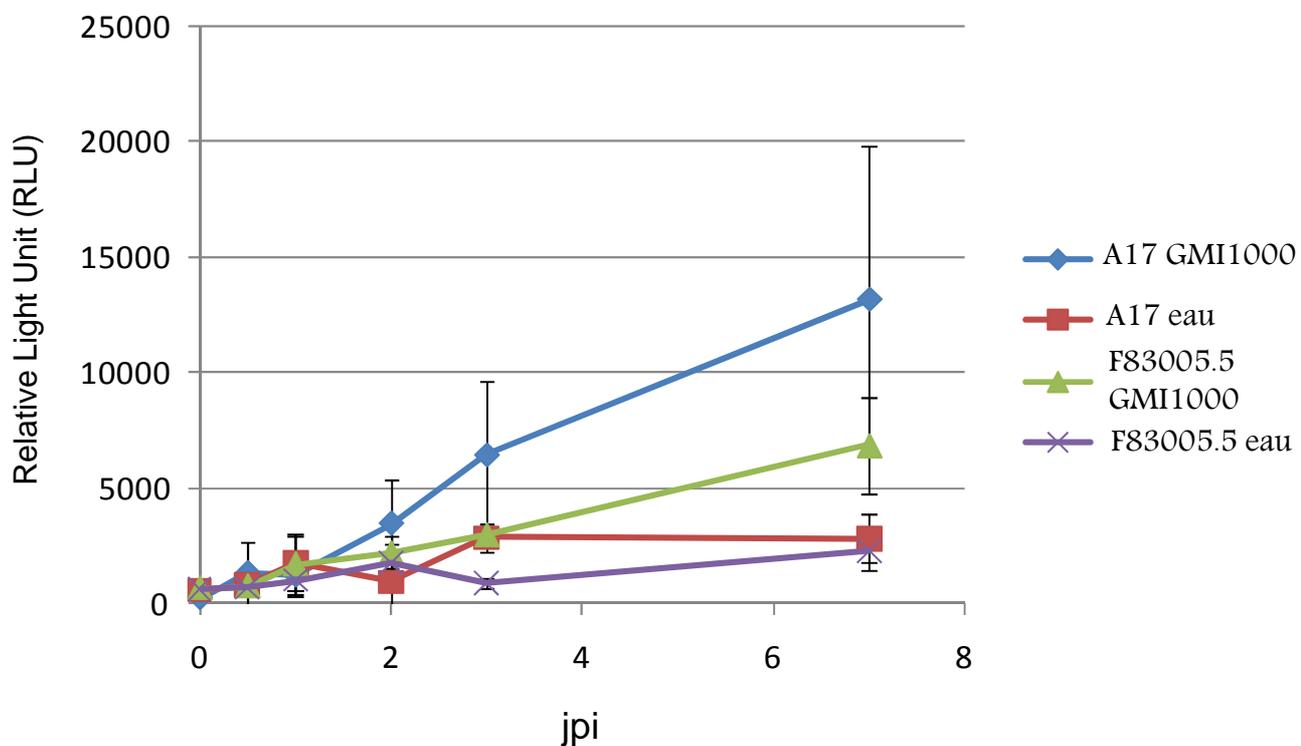
### ➤ Analyse des lignées sensible et résistante

**Autofluorescence intracellulaire** : Ce phénomène a été rencontré chez les deux lignées, mais de manière plus intense chez la lignée sensible (Tableau 4). En effet, dès 3 jpi 47 % des racines étudiées de la lignée sensible ont présenté une autofluorescence du contenu de certaines cellules contre 10% pour la lignée résistante. Ce processus s'est intensifié 7 jpi pour les 2 lignées mais est resté plus important chez la lignée sensible puisque la quasi-totalité des racines a présenté de l'autofluorescence intracellulaire contre près de la moitié pour la lignée résistante.

Nous avons essayé de comprendre l'origine de cette autofluorescence en révélant la présence des bactéries au bleu de toluidine (Figure 26D). Nous avons d'abord observé la coupe sans coloration avec les UV puis après coloration au bleu de toluidine en fond clair afin de voir d'éventuelles superpositions d'autofluorescence et de présence bactérienne. Ces expériences nous ont permis de voir un lien non systématique entre les 2 phénomènes, puisque nous avons pu observer des cellules présentant uniquement de l'autofluorescence ou une présence bactérienne ou les 2 simultanément. Il faut cependant préciser les limites de ces expériences, liées au fait tout d'abord que le bleu de toluidine ne pénètre et ne colore pas très bien dans ces conditions. Ensuite, les coupes en agar sont d'une épaisseur de 80  $\mu\text{m}$ , ce qui correspond à plusieurs couches cellulaires.

**Divisions cellulaires** : La lignée F83005.5 a présenté des divisions cellulaires de faible intensité dès 3 jpi alors que cela n'a pas été le cas de la lignée sensible. 7 jpi, ce phénomène a été présent chez les 2 lignées mais de manière plus importante chez la lignée F83005.5 (Tableau 4). La coupe longitudinale présentée Figure 21C reflète bien l'hétérogénéité de ce phénomène le long de la racine et de part et d'autre des vaisseaux conducteurs.

L'autofluorescence intracellulaire semble donc liée majoritairement à la condition de sensibilité et pourrait être liée à la pénétration bactérienne. En revanche, les divisions cellulaires autour du cylindre central semblent plus liées à la condition de résistance et pourrait être un mécanisme limitant la progression des bactéries dans le cylindre central.



**Figure 27. Dosage de production d' $H_2O_2$  par émission de chimioluminescence.**  
Moyenne de deux répétitions biologiques avec 10 plantes par répétition, les barres d'erreurs représentent l'IC à 95%.

## **2) Etude de la production de ROS dans l'extrémité racinaire**

### **➤ Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'infection**

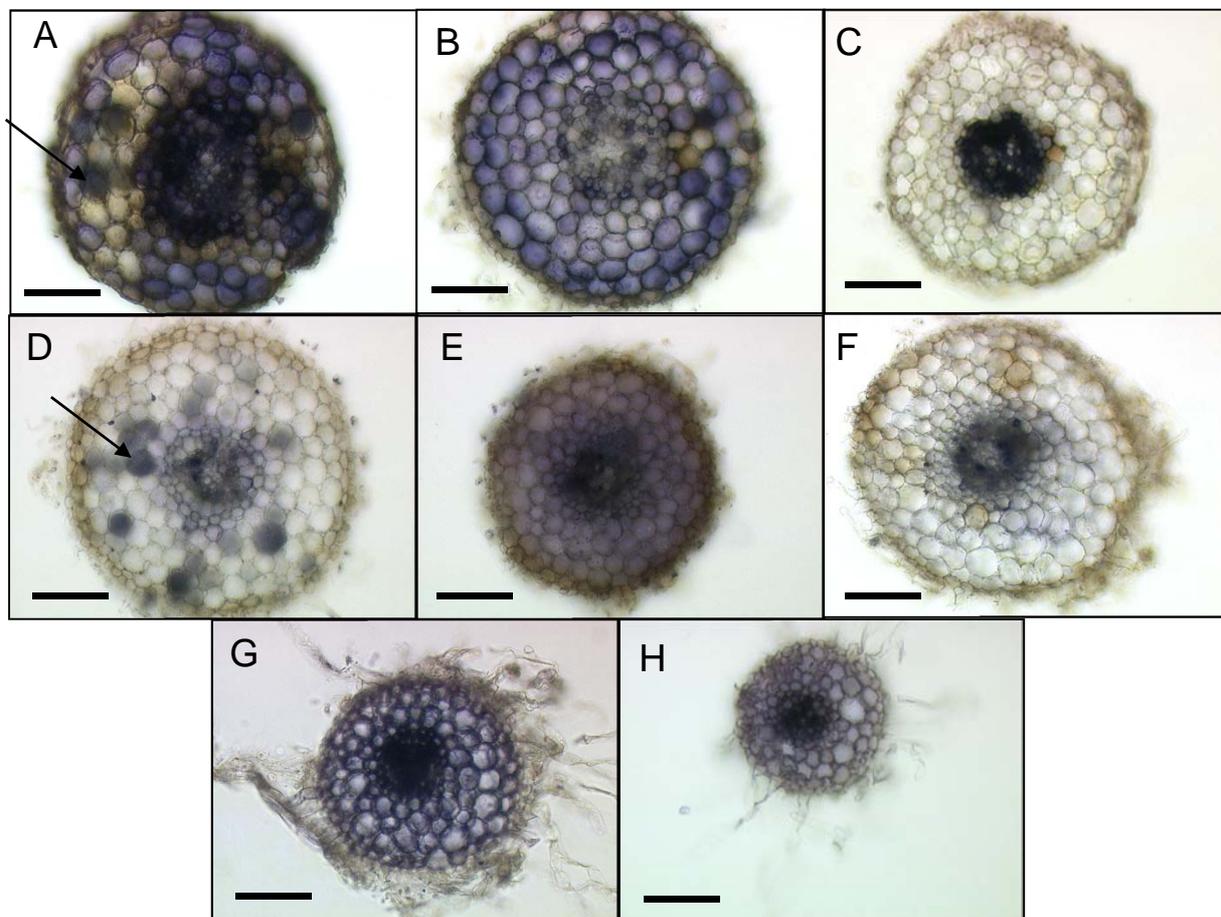
Le dosage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été fait par chimioluminescence. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est extrait à partir d'un broyat d'extrémités racinaires et mis en présence de luminol et de potassium ferricyanide. L'oxydation du luminol par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne la production de lumière dosée par un luminomètre. Les résultats sont donnés en unité relative de luminescence (RLU). Une comparaison des deux lignées inoculées par le l'eau ou la souche GMI1000 a été effectuée à différents temps, de 12hpi à 7jpi (Figure 27).

Les résultats présentés correspondent à deux répétitions biologiques et méritent donc d'être complétés, on peut cependant dégager certaines conclusions préliminaires. En effet, si un niveau d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> basal est observé dans les racines inoculées avec de l'eau, ce niveau reste faible et varie peu au cours du temps. L'inoculation par la souche GMI1000 entraîne la génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui augmente avec le temps, quelque soit la lignée étudiée. Il semble cependant que cette induction soit plus rapide (dès 3 jpi) et plus importante chez la lignée sensible. En effet, 7 jpi, une moyenne respective de 13195 et 6863 RLU a été observée pour les lignées sensible et résistante. L'intervalle de confiance importante ne permet pas de conclure à une différence significative, il sera donc important de renouveler l'expérience pour confirmer ou infirmer cet écart observé.

Dans le cadre de cette interaction, on voit que l'inoculation par la souche GMI1000 entraîne une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la plante. Cette production, qui augmente avec le temps, semble plus liée à la colonisation racinaire qu'à des processus de signalisation cellulaire précoce impliqués dans la mise en place des voies de défense. Cette hypothèse est confortée par le fait que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paraît plus importante dans la condition de sensibilité.

### **➤ Analyse de la répartition de O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans l'extrémité racinaire**

La révélation de la présence de l'anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a été effectuée *in planta* par utilisation de nitrobluetétrazolium (NBT). La NADPH oxydase est une enzyme qui catalyse la réduction d'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>-</sup> en oxydant du NADPH. L'oxydation du NADPH entraîne la libération d'ions H<sup>+</sup> qui vont réduire le NBT, qui forme alors un précipité bleu-noir. La



**Figure 28.** Analyse de la présence de  $O_2^-$  par coloration au NBT 7jpi par la souche GMI1000 (A-F) ou par l'eau (G-H) de la lignée A17 (A-C et G) et F83005.5 (D-F et H).

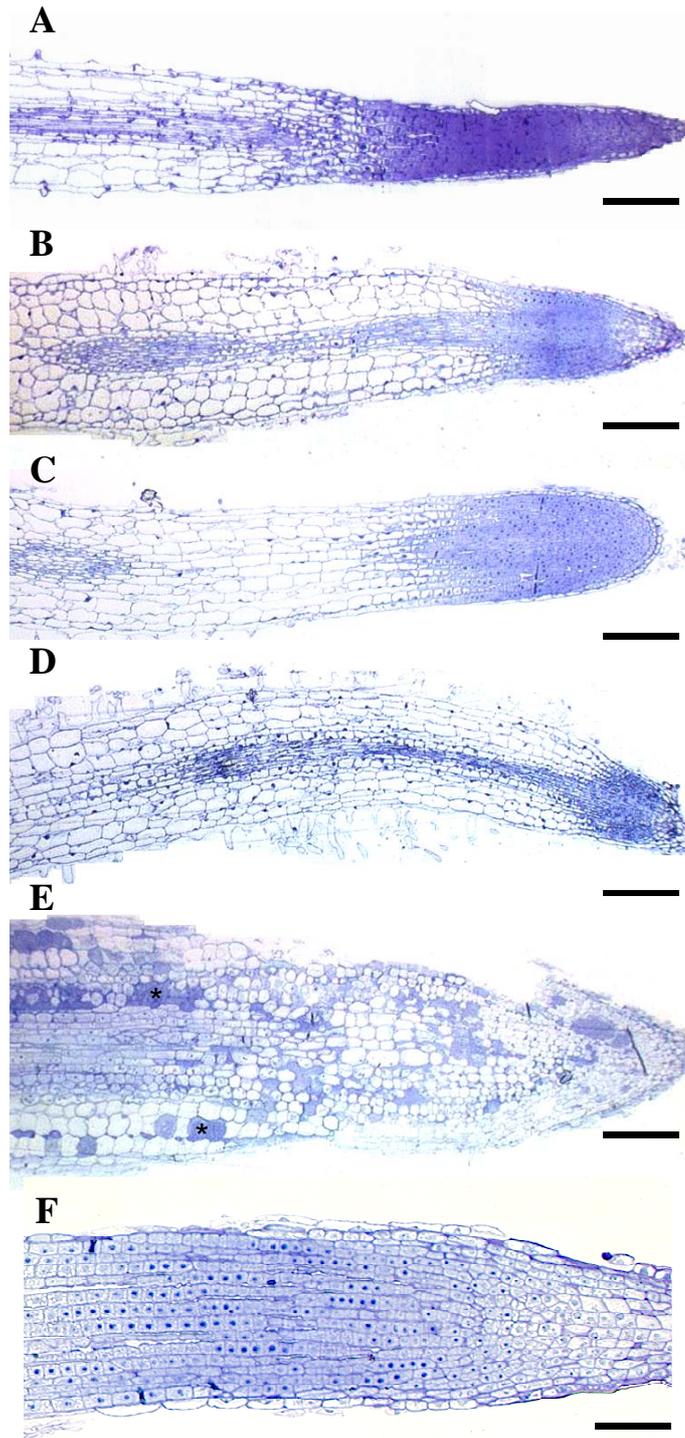
La couleur bleue reflète la présence d' $O_2^-$ , l'intensité de coloration est liée à la quantité de molécules produites. Dans la zone corticale, des cellules individuelles ou regroupées se distinguent en présentant une coloration intense (flèche). Des coupes ont été faites sur 3 répétitions biologiques avec entre 3 et 5 plantes prélevées pour chaque condition. Barre d'échelle 60  $\mu$ m.

coloration bleue reflète donc la présence d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'intensité du bleu est dépendante de la concentration en O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Des coupes transversales ont été effectuées dans une zone comprise entre 1-3mm de l'extrémité racinaire chez les deux lignées, 3 et 7 après inoculation par de l'eau ou la souche GMI1000. Les résultats obtenus suite à une inoculation par de l'eau révèlent une présence d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> avec une coloration bleue homogène sur l'ensemble des coupes effectuées (Figure 28G-H). Les résultats obtenus suite à une inoculation par la souche GMI1000 chez les deux lignées sont difficiles à interpréter de part la grande hétérogénéité rencontrée, aussi bien dans la localisation que dans l'intensité de la coloration bleue observée (Figure 28A-F). Cette figure illustre plusieurs exemples de répartition de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> chez la lignée A17 (Figure 28A-C) ou F83005.5 (Figure 28D-F). Des cellules présentant une coloration très foncée ont pu être observées avec les deux lignées, rappelant la configuration des patches d'autofluorescence précédemment décrits. Cependant, les variations importantes dans l'intensité de la coloration bleue observée ne nous ont pas permis de pouvoir comptabiliser ce paramètre de manière claire. Dans l'ensemble, les coupes avec la lignée A17 ont présenté une coloration bleue plus importante mais une quantification n'a pas été possible, tout comme l'établissement d'un crible pertinent. Aucune conclusion claire n'a donc pu être dégagée, si ce n'est une modification évidente de la répartition et de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les deux lignées avec notamment la présence de cellules très concentrées en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, suite à une inoculation par la souche GMI1000.

### **C. En quoi les ET3s sont impliqués dans les modifications de l'extrémité racinaire chez la lignée sensible ?**

Nous avons vu que les effecteurs Gala7 et AvrA sont impliqués dans la mise en place des symptômes racinaires et la colonisation bactérienne. Nous avons donc voulu analyser le rôle de ces effecteurs dans les modifications cellulaires de l'extrémité racinaire. Nous nous sommes principalement concentrés sur l'analyse des composés phénoliques et de la morphologie racinaire. Dans un premier temps, une vue d'ensemble en coupe longitudinale de l'extrémité racinaire de la lignée A17 inoculée par les mutants d'effecteurs ou dans les conditions témoins sera présentée (Figure 29). Ensuite, l'analyse de coupes



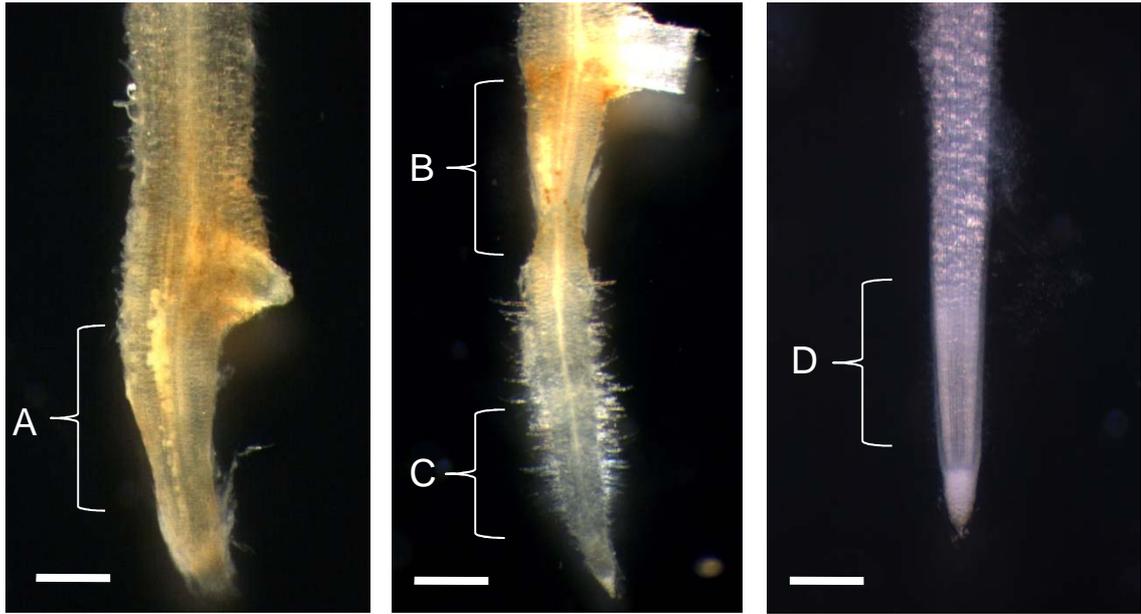
**Figure 29.** Observation en coupe longitudinale des extrémités racinaires de la lignée A17 inoculée par les mutants *gala7* (A), *avrA* (B), *gala7-avrA* (C), *hrcS* (D), la souche GMI1000 (E) ou de l'eau (F).

Une coloration au bleu de toluidine a été effectuée et permet de visualiser le cytoplasme en bleu. Les structures méristématiques semblent préservées suite à une inoculation par les mutants en comparaison avec une inoculation par la souche GMI1000, mais semblent tout de même altérées en comparaison avec la condition eau. Des poches de bactéries sont détectées suite à une inoculation pas la souche GMI1000 (étoile). Barre d'échelle 0,2 mm.

transversales pour les quatre critères précédemment décrits sera effectuée pour les différentes conditions d'inoculation : lignification de l'endoderme, autofluorescence des parois et du contenu cellulaire et divisions autour du cylindre central. Les mutants d'effecteurs induisent un fort ralentissement de la croissance racinaire dans les premiers jpi, qui peut éventuellement repartir ensuite. Ce stress des premiers jours est visible sous forme d'une zone brune, qui se trouve à l'extrémité de la racine quand la croissance de cette dernière reste arrêtée ou plus haut dans la racine quand la croissance est repartie (Figure 20 et 30). Plus l'arrêt de croissance durait longtemps et plus la coloration brune semblait intense. Il nous a semblé intéressant d'analyser les modifications cellulaires dans les différentes conditions de reprise ou non de croissance. Un système expérimental exposé Figure 30 a donc été mis en place et sera expliqué dans une seconde partie. Ensuite, les résultats obtenus avec les mutants *gala7*, *avrA* et les mutants *hry* pour les 4 critères étudiés seront présentés.

### **1) Etude de la morphologie de l'extrémité racinaire**

Les coupes longitudinales illustrées Figure 29 montrent les extrémités racinaires de la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000, les mutants d'effecteurs et les témoins négatifs *hrcS* et eau 7jpi. Sur la coupe correspondant à la condition eau, on voit une importante zone d'élongation riche en cytoplasme (zone bleue) avec un méristème structuré. En comparant les inoculations par l'ensemble des bactéries par rapport à ce témoin, on voit que la zone riche en cytoplasme est systématiquement réduite chez les mutants et inexistante dans le cas de la souche GMI1000. En regardant la structure méristématique dans les différentes conditions, on voit qu'elle semble toujours en place et relativement structurée suite à une inoculation par les différents mutants bactériens. Avec la souche GMI1000 en revanche, cette zone est totalement désorganisée et colonisée par des bactéries. Ces résultats sont cohérents avec les observations faites en termes de croissance racinaire et de colonisation. En effet, une réduction de la croissance racinaire peut-être due à un défaut d'élongation cellulaire à l'extrémité et/ou à une diminution de l'activité méristématique. En terme de colonisation, la lourdeur expérimentale pour obtenir ces coupes ne nous a pas permis d'observer plus de 5 racines pour la souche GMI1000 et 3 racines dans les autres conditions. Seule la souche GMI1000 semblait pénétrer de manière systématique dans les tissus racinaires, ce qui est cohérent avec sa colonisation quasi systématique observée grâce aux bactéries GUS. Il aurait sûrement fallu faire plus de répétitions avec le mutant *avrA*



**Figure 30. Illustration des zones de prélèvement pour les coupes transversales.** Barre d'échelle 0.5 mm.

- A. Extrémité dont la croissance est arrêtée.** Prélèvements à 3 et 7 jpi pour les lignées A17 et F83005.5 avec la souche GMI1000 et la lignée A17 avec les mutants *gala7* et *avrA*. Pour les prélèvements 3 jpi avec les 2 mutants d'effecteurs, la croissance étant fortement ralentie, il n'était pas possible de distinguer les racines totalement arrêtées ou non. Les racines ont donc été prélevées aléatoirement pour ces 2 conditions. Pour les conditions avec la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA*, certaines plantes ont également été prélevées 21 jpi, lorsqu'elles présentaient des symptômes foliaires
- B. Zone brune des racines dont la croissance était arrêtée à 7 jpi mais qui est repartie ensuite.** La lignée A17 avec les mutants *gala7* et *avrA*. Pour cette condition, les plantes ont été prélevées au fur et à mesure de leurs reprises de croissance jusque 14 jpi.
- C. Extrémité des racines dont la croissance était arrêtée à 7 jpi mais qui est repartie ensuite.** La lignée A17 avec les mutants *gala7* et *avrA*.
- D. Extrémité des plantes dont la croissance n'est pas arrêtée.** Les lignées A17 et F83005.5 inoculées avec de l'eau ou les mutants *hrp-*. Prélèvements 3 et 7 jpi.

pour voir des racines colonisées, car sa pénétration dans la racine est fortement réduite par rapport à la souche GMI1000, comme nous l'avons vu avec les bactéries GUS.

## 2) Mise en place du système expérimental pour les coupes transversales (Figure 30)

Comme nous l'avons vu, la souche GMI1000 induit un arrêt de croissance racinaire et un brunissement de l'extrémité racinaire chez les lignées A17 et F83005.5, les coupes ont donc été effectuées dans la zone de brunissement (A). En revanche, suite à l'inoculation des mutants *gala7* et *avrA* sur la lignée A17, cet arrêt de croissance a pu avoir lieu mais pas de manière systématique. Nous avons donc distingué 3 lieux de coupes : l'extrémité brunie lorsque la croissance est arrêtée (A), la zone marron correspondant à des plantes dont la croissance était arrêtée 7jpi et est repartie ensuite (B) ou l'extrémité de la racine dont la croissance est repartie (C). Des inoculations par l'eau ou des mutants *hrp* (mutant de structure du SST3 *hrcS* et *hrcV*, mutant de régulation du SST3 *hrpB*) ont servi de témoins négatifs de ces expériences (D). Afin d'enrichir les résultats, des coupes au niveau de l'extrémité dont la croissance est arrêtée (A) ont également été effectuées sur des plantes mortes, suite à une inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA*. Pour des raisons pratiques, certaines conditions sont illustrées par un nombre faible de racine. Les résultats présentés ici sont préliminaires et méritent donc d'être confirmés par plus de répétitions. L'ensemble des résultats par zone pour les quatre critères étudiés est présenté Tableau 5.

## 3) Analyse de la production de composés phénoliques et de modifications morphologiques chez la lignée sensible (Tableau 5)

**Lignification de l'endoderme** : Lorsque la croissance racinaire est arrêtée (A), ce phénomène a été détecté suite à l'inoculation par les deux mutants *avrA* et *gala7*, mais de manière plus importante à 3jpi avec le mutant *avrA*. Le pourcentage de plantes présentant une lignification de l'endoderme est un critère qui différencie les deux lignées A17 et F83005.5, par une lignification plus importante de la lignée résistante dès 3 jpi. Les chiffres obtenus avec le mutant *avrA* sont plus proches de la lignée A17 avec la souche GMI1000. A 7 jpi, la quasi-totalité des racines étudiées ont présenté une lignification de l'endoderme suite à l'inoculation par les 2 mutants, tout comme suite à une inoculation par la souche

**Tableau 5. Analyse des modifications cellulaires observées en coupe transversale, induites au cours de l'infection des lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* par la souche GMI1000 et les mutants *avrA*, *gala7* et *hrp-* de *R. solanacearum*.**

Les chiffres donnés représentent le pourcentage de racines concernées par le phénotype étudié. L'illustration des différentes zones de coupe est donnée Figure 30. La lignification de l'endoderme a été détectée par utilisation de phloroglucinol (dans la publication de nos travaux Figure 4). L'autofluorescence a été détectée sans utilisation de colorant et par une illumination dans les UV au niveau pariétal (dans la publication de nos travaux Figure 4) ou au niveau du contenu cellulaire (phénotype décrit dans le texte et illustré Figure 26). Le phénomène de divisions cellulaires autour du cylindre central est décrit dans le texte et illustré Figure 21.

« Zone » de coupe	Lignée	Souche	Condition de prélèvement	Nombre de racines observées	Pourcentage de racines présentant le phénotype donné			
					Lignification endoderme	Autofluorescence pariétale	Autofluorescence cellulaire	Divisions cellulaires
A	A17	GMI1000	3 jpi	17	24	59	47	0
	A17	GMI1000	7 jpi	25	92	68	92	16
	A17	GMI1000	plante malade	2	100	100	0	100
	F83005.5	GMI1000	3 jpi	20	90	90	10	40
	F83005.5	GMI1000	7 jpi	24	79	92	54	29
	A17	GMI1758	3 jpi	9	44	78	0	33
	A17	GMI1758	7 jpi	12	92	92	67	83
	A17	GMI1758	plante malade	5	100	100	0	60
	A17	GRS138	3 jpi	9	11	11	0	0
B	A17	GRS138	7 jpi	2	100	100	0	50
	A17	GMI1758	zone marron	13	92	92	38	77
C	A17	GRS138	zone marron	3	67	100	0	33
	A17	GMI1758	Croissance racinaire	4	0	0	0	0
A17	GRS138	7		0	0	0	0	
D	A17	eau	3 jpi	10	0	0	0	0
	A17	GMI1402	3 jpi	9	11	0	11	0
	A17	GMI1402	7 jpi	12	75	58	33	67
	A17	GMI1694	7 jpi	7	57	57	0	43
	A17	GMI1525	7 jpi	6	17	17	0	0

GMI1000. Chez les plantes malades suite à une inoculation par la souche GMI1000 et le mutant *avrA*, toutes les plantes ont présenté une lignification de l'endoderme.

Dans la zone brune des racines dont la croissance est repartie (B), la lignification de l'endoderme a été détectée suite à une inoculation par les 2 mutants. Ce phénomène a été observé de manière un peu moins importante suite à une inoculation par le mutant *gala7*, 67% des racines observées ont présenté ce phénotype contre 92% avec le mutant *avrA*. Il faut cependant noter que seules trois racines ont été observées avec le mutant *gala7*.

Dans les extrémités racinaires des racines dont la croissance était repartie (C), les observations ont été similaires à une inoculation par de l'eau, il n'y avait pas de lignification de l'endoderme.

**Autofluorescence pariétale** : Lorsque la croissance racinaire est arrêtée (A), ce phénomène a été observé de manière importante (78% des racines observées) dès 3 jpi suite à une inoculation par le mutant *avrA*. Suite à une inoculation par le mutant *gala7*, il a été détecté moins fréquemment, chez 11% des racines étudiées. A 7 jpi avec les deux mutants et chez les plantes malades avec le mutant *avrA* ou la souche GMI1000, la quasi-totalité des racines présentait une autofluorescence pariétale. Ce phénomène semble donc plus précoce suite à une inoculation par le mutant *avrA* que par le mutant *gala7*. 7jpi, l'autofluorescence pariétale suite à une inoculation avec les mutants *avrA* et *gala7* semble plus importante que suite à une inoculation avec la souche GMI1000 chez la lignée A17. Les chiffres sont proches de ceux rencontrés avec la souche GMI1000 chez la lignée F83005.5.

Dans la zone brune des racines dont la croissance est repartie (B), ce phénomène a été détecté de manière quasi systématique suite à une inoculation par les 2 mutants.

Dans les extrémités racinaires des racines dont la croissance était repartie (C), l'autofluorescence pariétale n'a pas été détectée tout comme suite à une inoculation avec de l'eau.

**Autofluorescence intracellulaire** : Nous avons vu précédemment que ce processus a été observé principalement chez la lignée A17 inoculée par la souche GMI1000. L'étude des mutants a révélé que ce phénotype a été observé uniquement suite à une inoculation par le mutant *avrA* 7 jpi. Ce résultat conforte l'idée qu'il y aurait un lien entre l'autofluorescence intracellulaire et la multiplication bactérienne dans la zone corticale. En

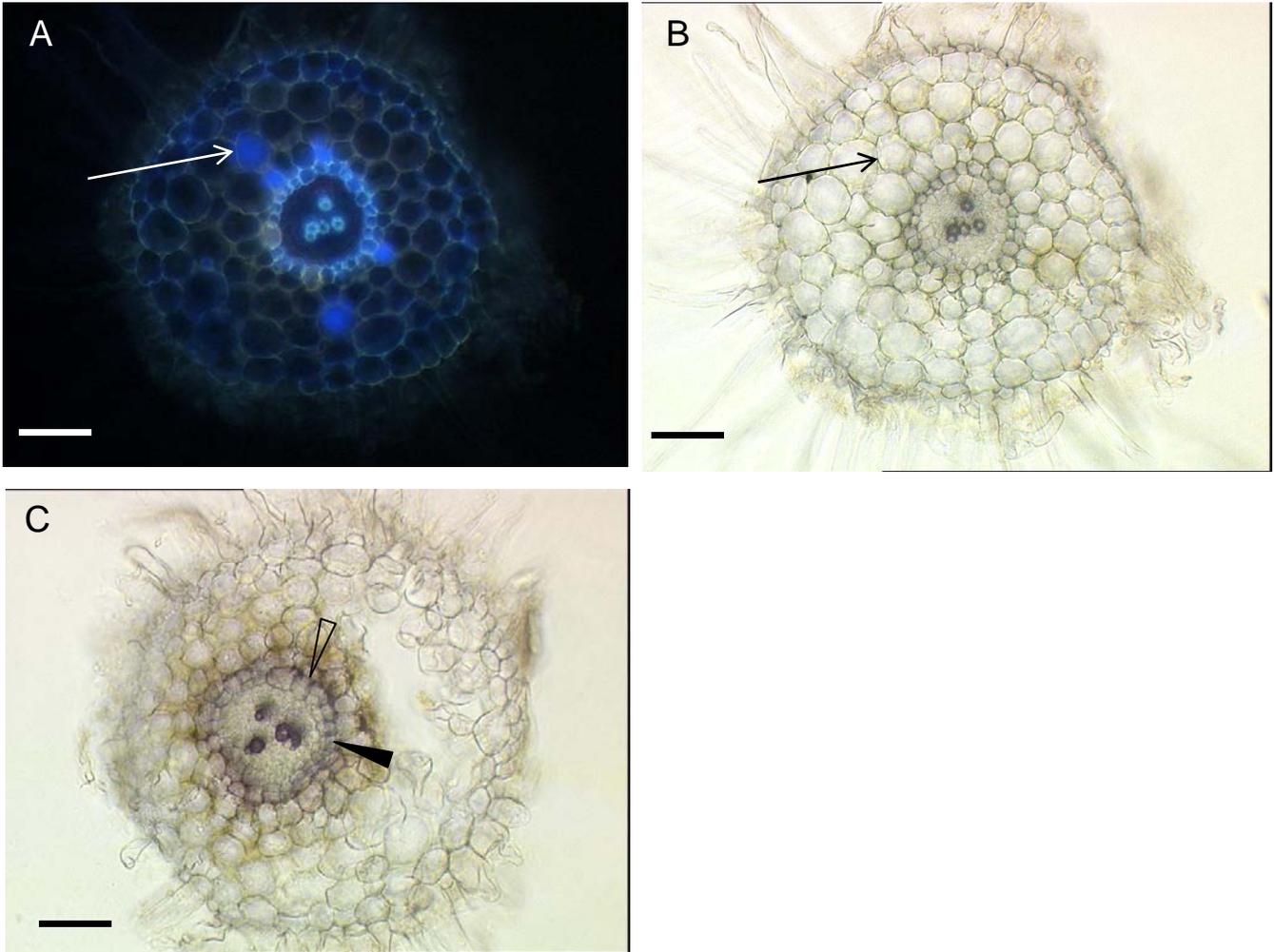
effet, les mutants *gala7* n'ont pas été détectés dans la zone corticale de l'extrémité racinaire de la lignée A17 alors que c'est le cas pour le mutant *avrA*. Le fait que les contenus cellulaires n'autofluorescent pas lorsque les plantes sont mortes avec la souche GMI1000 et le mutant *avrA* pourrait être dû au fait que les cellules sont mortes et donc vidées de leurs contenus.

Dans la zone brune des racines dont la croissance est repartie (B), ce phénotype est induit uniquement suite à une inoculation par le mutant *avrA* et non par le mutant *gala7*.

Les extrémités racinaires des racines dont la croissance était repartie (C) n'ont pas présenté d'autofluorescence intracellulaire, tout comme suite à une inoculation avec de l'eau.

**Divisions cellulaires** : Toutes conditions confondues, c'est suite à une inoculation par le mutant *avrA* que ce phénomène a été le plus observé, aussi bien en termes de fréquence de racines concernées, que d'intensité des divisions. Les divisions observées 3 jpi sont peu intenses et ressemblent à celles rencontrées chez la lignée F83005.5 inoculée par la souche GMI1000 (Figure 21B). De manière fréquente 7jpi et chez les plantes malades suite à une inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA*, il a été observé des phénomènes de divisions comme illustrés Figure 21A. Ces divisions sont massives, déformantes et plus ou moins asymétriques autour du cylindre central. Sur les deux racines dont la croissance était arrêtée avec le mutant *gala7*, une racine a présenté des divisions massives comme celles observées Figure 21A. Les plantes mortes suite à une inoculation par la souche GMI1000 ou le mutant *avrA* ont présenté également ces divisions massives. Ces phénomènes de divisions massives, uniquement rencontrés suite à une inoculation par des mutants d'effecteurs ou lorsque les plantes sont mortes, pourraient être un mécanisme de défense afin de limiter la propagation bactérienne dans les vaisseaux conducteurs ou liées à l'arrêt de croissance des racines.

Le phénomène de divisions cellulaires a été détecté lors des coupes dans la zone marron (B) suite à l'inoculation par les 2 mutants mais de manière peu intense et plus fréquemment avec le mutant *avrA*. Il n'a pas été observé de phénomènes de divisions massives.



**Figure 31. Morphologie et autofluorescence de l'extrémité racinaire de la lignée A17 en coupe transversale, 7 jpi par le mutant *hrcS*.**

**A et B** Même coupe sous éclairage UV (**A**) ou en fond clair (**B**). On voit la présence de cellules autofluorescentes (flèches) sans qu'elles ne présentent de phénotype particulier en fond clair. On observe également une autofluorescence au niveau des parois des cellules corticales (flèche pleine). **C**. La coloration au phloroglucinol révèle la présence de lignine en violet (tête de flèche vide). On voit également des phénomènes de divisions cellulaires autour des vaisseaux conducteurs (tête de flèche pleine). Barre d'échelle 40  $\mu\text{m}$ .

Aucune division autour du cylindre central n'a été observée dans les extrémités des racines en croissance (C).

➤ En bref...

Les phénomènes de lignification et d'autofluorescence pariétale sont assez proches lors d'une inoculation par la lignée A17 de la souche GMI1000 et des deux mutants. Ils sont systématiques chez les plantes mortes. Ils sont également similaires entre les extrémités brunes des racines dont la croissance est arrêtée 7jpi et celles dont la croissance est repartie après 7jpi. Une fois cette croissance repartie, les extrémités ne présentent plus ces phénomènes et sont très similaire à la condition eau.

L'autofluorescence cellulaire est uniquement rencontrée dans les conditions où les bactéries ont été détectées dans la zone corticale. Ce mécanisme semble plus tardif avec le mutant *avrA* qu'avec la souche GMI1000 puisqu'il n'a pas été observé 3 jpi avec le mutant alors que la quasi-totalité des plantes a présenté ce phénotype 3jpi avec la souche GMI1000. Dans la zone marron (B), ce phénomène a également été observé avec le mutant *avrA* mais de manière moins fréquente que lorsque l'extrémité était arrêtée. Dans les extrémités des plantes reparties (C), ce phénomène n'est plus rencontré.

Le phénomène de divisions cellulaires autour du cylindre central semble complexe. En effet, on le retrouve majoritairement peu intense et homogène, comme observé régulièrement avec la lignée F83005.5 dès 3jpi par la souche GMI1000 ou comme rencontré avec les mutants d'effecteurs chez la lignée A17 dans la zone marron dont les croissances sont reparties. Des phénomènes de divisions massives et déformantes ont été observés avec le mutant *avrA* 7jpi principalement, mais également lorsque les plantes sont mortes. On peut envisager que ces deux phénomènes de divisions soient distincts dans leurs significations biologiques, ou que le phénomène massif soit une version amplifiée et désorganisée des divisions peu intenses et homogènes autour des vaisseaux.

➤ Les questions que posent les témoins *hrp*

Le mutant *hrcS* est la souche utilisée jusque là pour l'ensemble de nos expériences. Les premières expériences de coupes transversales ont donc été effectuées avec cette souche (Tableau 5). Si à 3 jpi les résultats sont proches d'une inoculation par l'eau, une coupe a

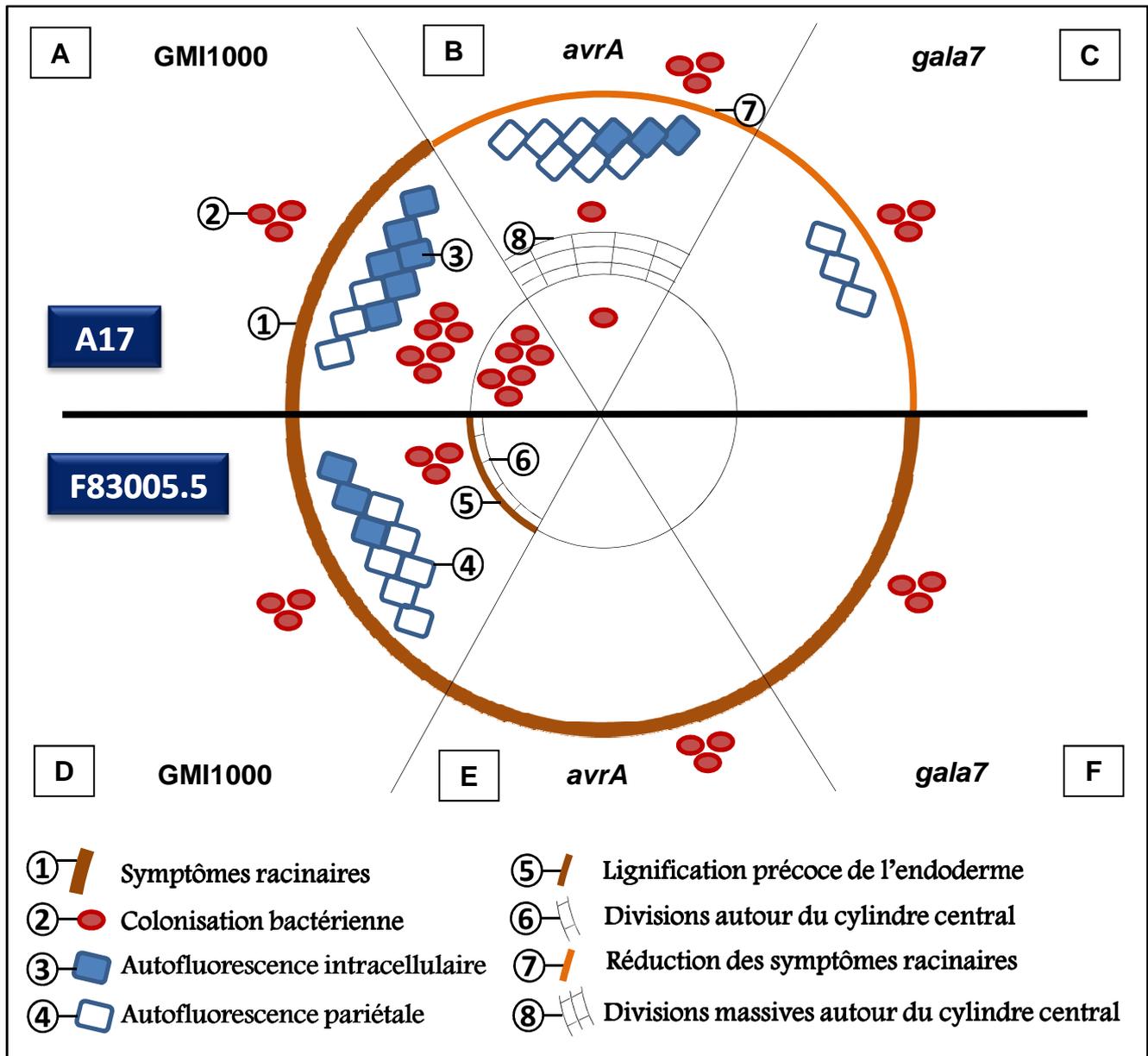


Figure 32. Schéma récapitulatif des principales observations faites avec les lignées A17 (A-B-C) et F83005.5 (D-E-F) inoculées par la souche GMI1000 (A et D) et les mutants *avrA* (B et E) et *gala7* (C et F), suite à une inoculation sur racine intacte.

A et D. Les 2 lignées A17 et F83005.5 développent des symptômes racinaires (1) suite à une inoculation avec la souche GMI1000. **A.** La lignée A17 présente une colonisation bactérienne (2) massive du cortex et du cylindre central. La colonisation bactérienne semble liée à une autofluorescence intracellulaire (3). L'apparition de symptômes racinaires et la colonisation bactérienne nécessitent une voie éthylène végétale fonctionnelle. **D.** Avec la lignée F83005.5, la colonisation du cortex est moins systématique et les bactéries ne sont jamais détectées dans le cylindre central. Le contrôle de la propagation bactérienne chez cette lignée semble lié à une autofluorescence pariétale importante (4), une lignification précoce de l'endoderme (5) et des divisions cellulaires autour du cylindre central (6). **B.** Chez la lignée A17 inoculée avec le mutant *avrA*, la colonisation bactérienne est réduite dans le cortex et le cylindre central. Une réduction des symptômes racinaires (7), des divisions massives autour du cylindre central (8) et une autofluorescence pariétale importante pourraient être responsables de la réduction de la colonisation bactérienne. **C.** Avec le mutant *gala7*, une réduction des symptômes racinaires et une absence de colonisation bactérienne ont été observées. **E-F.** Chez la lignée F83005.5, la mutation d'*AvrA* et de *Gala7* n'engendre pas de réduction du développement des symptômes racinaires mais aucune colonisation bactérienne n'est observée.

présenté des cellules avec une autofluorescence intracellulaire. A 7 jpi, les phénomènes de divisions, d'autofluorescence et de lignification ont été détectés régulièrement et sont partiellement comparables avec une inoculation par la souche GMI1000 (Figure 31). Ces résultats nous ont surpris et nous avons donc cherché à mieux comprendre leur origine. En effet, on peut imaginer que la présence des effecteurs ou d'autres déterminants du pouvoir pathogène de la bactérie qui s'accumulent autour de la racine suffisent à induire certaines réponses chez la plante.

Afin de valider l'une ou l'autre de nos hypothèses, nous avons refait les expériences avec deux autres mutants *hrp*. Le mutant *hrcV*, de la même manière que le mutant *hrcS*, synthétise les effecteurs mais ne peut les injecter. Le mutant *hrpB* est muté dans un régulateur en amont de la formation du SST3 et ne synthétise pas les ET3s.

Même si les résultats doivent être reproduit dûs au faible nombre racines observés, ils nous donnent déjà des indices sur les mécanismes en jeu. En effet, l'autofluorescence intracellulaire ne se rencontre qu'avec le mutant *hrcS* et pourrait donc être un artéfact expérimental ou une spécificité liée à cette mutation. En revanche, les phénomènes d'autofluorescence pariétale, de lignification et de divisions cellulaires sont observés de manière similaire entre les deux mutants synthétisant les effecteurs et de manière moins fréquente avec le mutant *hrpB* (Tableau 5). Il semble donc que la présence des effecteurs non injectés ou d'autres molécules soit capable d'induire des réponses de la plante pouvant être apparentées à de la défense.

**- Afin de synthétiser les principaux résultats mis en évidence sur l'ensemble de ce travail -**

**- de thèse, un schéma récapitulatif est présenté Figure 32 -**

# DISCUSSION

## DISCUSSION

L'étude de l'interaction entre *R. solanacearum* et *M. truncatula* a permis de décrire différentes étapes du processus infectieux de la bactérie et plusieurs niveaux de contrôle du côté de la plante. La première étape de l'interaction est l'apparition de symptômes racinaires ubiquitaires et contrôlés par des pools d'ET3s. L'éventuel lien entre les différents symptômes décrits, leurs rôles potentiels dans l'infection bactérienne et l'implication des ET3s seront discutés. Suite au développement de ces symptômes dans les lignées résistante et sensible, la colonisation bactérienne peut avoir lieu par l'extrémité racinaire et éventuellement induire le flétrissement des parties aériennes chez la lignée sensible. Les différences de propagation bactérienne dans les différentes conditions d'inoculation seront analysées. Plusieurs modifications cellulaires dans l'extrémité racinaire ont été observées au cours de l'infection. Leurs rôles comme mécanismes impliqués dans la défense des plantes, conséquences de la colonisation bactérienne ou mécanismes nécessaires à la virulence de la bactérie seront envisagés. Un point sera ensuite fait sur l'importance du SST3 dans le processus infectieux de la bactérie et l'éventuelle induction de mécanismes de défense par les mutants du SST3.

### I. Corrélation entre les différents symptômes racinaires

Les symptômes racinaires décrits sont l'ensemble des modifications visibles induites suite à une inoculation par la souche GMI1000 chez les deux lignées sensible et résistante. L'extrémité racinaire, renflée et déformée, présente un brunissement et une mortalité épidermique, la croissance racinaire est arrêtée dès 24hpi et une émission importante de racines secondaires est observée.

La zone brunie à l'extrémité racinaire correspondait à la zone dont l'épiderme est mort. La coloration brune pourrait être attribuable à l'accumulation et à l'oxydation de composés phénoliques au niveau des cellules mortes (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). La mortalité épidermique pourrait être induite par la bactérie de manière directe, par intervention d'enzymes de dégradation cellulaires ou indirecte, par l'activation de voies de la plante conduisant à la mort de son épiderme. Dans notre cas, l'altération de l'épiderme semble être liée à un mécanisme indirect. En effet, nous avons vu qu'un mutant du SST2

induit une mortalité équivalente à la souche GMI1000. Le SST2 est l'appareil qui, dans l'état actuel des connaissances, sécrète les enzymes bactériennes de dégradation cellulaire (Cianciotto, 2005; Johnson et al., 2006). La mort de l'épiderme ne semble donc pas une conséquence d'une dégradation par la bactérie. La nécessité d'une voie éthylène intacte pour la mise en place des symptômes renforce cette idée. En effet, cela suggère que la bactérie induirait une modulation de cette voie entraînant la mise en place des symptômes.

L'extrémité racinaire semble également altérée en profondeur puisque l'arrêt de croissance racinaire suggère un dysfonctionnement méristématique. Ce dysfonctionnement pourrait être à l'origine de l'émission importante de racines secondaires. En effet, le processus de dominance apical étant présent au niveau racinaire, l'altération de l'extrémité racinaire pourrait être à l'origine de la formation importante de racines secondaires. Des expériences sur la Laitue (*Lactuca sativa*) ont montré que l'excision de l'extrémité racinaire entraîne une formation importante de racines latérales (Zhang et Hasenstein, 1999). Le processus de dominance apical au niveau racinaire serait finement contrôlé au niveau hormonal, une forte concentration de cytokinine à l'extrémité de la racine jouerait un rôle majeur dans la régulation de ce mécanisme (Aloni et al., 2006). En plus du processus de dominance apical, une forte concentration dans la racine en éthylène ou en auxine peut également être responsable de l'émergence de racines latérales (Aloni et al., 2006).

Un crible sur l'induction de la mortalité épidermique a permis l'identification de Gala7 et AvrA, deux effecteurs impliqués dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. Les mutants correspondant à ces deux effecteurs présentent une altération réduite de la mortalité racinaire 3 jpi, ainsi qu'un pourcentage réduit de plantes ayant un arrêt définitif de leur croissance. L'étude cinétique des extrémités racinaires suite à l'inoculation par les mutants a montré que le brunissement épidermique observé avec la souche GMI1000 avait également lieu avec les mutants. Cette coloration apparaissait avec la même cinétique qu'avec la souche GMI1000, au cours de la phase où la croissance racinaire semblait arrêtée, entre 1 et 3 jpi. Cette étape passée, certaines racines présentaient une reprise de leur croissance pouvant intervenir jusqu'à 14 jpi, laissant une marque brune apparente. Cette coloration semble d'autant plus intense que l'arrêt de croissance a duré longtemps. Suite à une inoculation avec le mutant *gala7*, la croissance racinaire de la lignée A17 repartait plus rapidement qu'avec le mutant *avrA*, dès 3 jpi. Les racines inoculées par *gala7* présentaient donc une coloration brune moins marquée. La mutation des effecteurs aurait un effet sur la

dégradation de l'épiderme, mais une altération moins dramatique et définitive de l'activité méristématique semble être une conséquence importante de leurs mutations. Il est difficile avec les éléments actuels de savoir l'action précise des effecteurs sur les symptômes racinaires et de déterminer la nature de la corrélation éventuelle entre l'altération de l'épiderme et du méristème apical. Avec les mutants *gala7* et *avrA*, les zones vivantes repérées avec le test FDA semblent donc correspondre aux racines dont la croissance est en train de repartir et dont l'extrémité est donc vivante. Le fait que les mutants *gala7* et *avrA* ne semblaient pas avoir d'effet sur la viabilité épidermique de la lignée F83005.5 ni induire une réduction du pourcentage de plante dont la croissance est arrêtée est cohérent avec cette hypothèse.

## **II. Les symptômes racinaires dans le processus infectieux : rôle des ET3s**

Les symptômes racinaires pourraient avoir différents rôles dans le processus infectieux de *R. solanacearum*, qui ne sont pas exclusifs les uns des autres. Dans nos travaux publiés, il a été envisagé que la mortalité épidermique puisse avoir un rôle dans la nutrition et le chimiotaxisme de la bactérie. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de l'ubiquité de ce processus. En effet, ce phénotype est induit sur l'ensemble des espèces hôtes et non-hôtes testées. Il pourrait donc permettre à la bactérie de se nourrir ou être attirée vers une large gamme d'espèce. Cette observation est cohérente avec sa capacité à constituer des réservoirs de population dans de nombreuses espèces hôtes ou non-hôtes (Hayward, 1991; Alvarez et al., 2008).

L'apparition des symptômes racinaires pourrait être liée à la colonisation bactérienne à plusieurs niveaux. Nous avons vu qu'il y a deux zones privilégiées de colonisation par *R. solanacearum*, les sites d'émission des racines secondaires et l'extrémité racinaire, tout deux corrélés avec un endoderme respectivement indifférencié ou modifié (Vasse et al., 2005). L'altération de l'extrémité racinaire induit la formation de racines secondaires et permet donc la création de points d'entrées potentiels. L'induction de racines secondaires a notamment été décrite chez la Tomate dont la colonisation se déroule par les aisselles des racines secondaires (Vasse et al., 1995). Même si ce n'est pas une zone de

pénétration chez *M. truncatula*, ce mécanisme largement répandu pourrait donc augmenter les chances de colonisation de *R. solanacearum* sur d'autres espèces hôtes. Dans cette optique, on peut envisager l'hypothèse que la formation de RLS soit une adaptation du Pétunia qui limite la pénétration de la bactérie. En effet, ces structures ont été décrites comme étant des émergences de racines secondaires anormales par lesquelles la bactérie ne peut coloniser la plante (Zolobowska et Van Gijsegem, 2006).

La mortalité épidermique pourrait avoir un rôle direct dans la colonisation de l'extrémité racinaire. En effet, l'épiderme intact est une barrière difficile à franchir pour les bactéries pathogènes dépourvues d'organes de pénétration (Huang, 1986; Loria et al., 2003). La dégradation de cette couche cellulaire permet de créer une ouverture sur la zone corticale et le système vasculaire. Nous avons vu que l'induction de la mort cellulaire épidermique serait une action indirecte de la bactérie, qui pourrait être capable d'induire un mécanisme de mort cellulaire programmée (PCD) par la plante. Parmi les PCD induites au cours d'une interaction pathogène, le mécanisme de résistance de type HR est bien connu et répandu lors de la résistance à un agent pathogène biotrophe (Mayer et al., 2001; Spoel et Dong, 2008). De plus en plus d'études montrent que dans le cas d'agents pathogènes nécrotrophes, l'induction d'une PCD serait un mécanisme impliqué dans la sensibilité de la plante (Greenberg et Yao, 2004). Quand une HR se met en place face à un agent pathogène nécrotrophe, sa croissance semble accélérée et non arrêtée (Mayer et al., 2001; Kemmerling et al., 2007). Il semblerait que les mécanismes en jeu entre PCD induite au cours de la résistance ou de la sensibilité partagent des régulations en commun (Qutob et al., 2006). L'agent pathogène pourrait profiter du mécanisme de défense mis en place par la plante, mais de nombreuses évidences supportent l'idée qu'un agent pathogène nécrotrophe est capable d'interagir avec l'hôte en contrôlant la mise en place de la mort cellulaire (Kim et al., 2008). *E. amylovora* est une bactérie nécrotrophe capable d'infecter la Poire (*Pyrus communis*). Au cours d'une interaction compatible, une forte production de ROS a été observée et semble liée à l'induction de la mort cellulaire nécessaire à l'invasion des tissus de la plante. Des mutants *hrp* n'induisent pas ce mécanisme et ne semblent pas capables d'envahir la plante. Cela renforce l'idée que des ET3s pourraient donc être impliqués dans l'induction du burst oxydatif conduisant à la mort cellulaire, nécessaire à la pénétration de l'hôte (Venisse et al., 2001).

L'hypothèse du lien entre l'apparition des symptômes racinaires et la colonisation bactérienne est renforcée par l'analyse de la colonisation des mutants d'effecteurs chez la lignée A17. Dans le cas des colonisations superficielles par les mutants, elles ont été principalement observées dans la zone brune. Lorsque la croissance racinaire était repartie, la colonisation était toujours superficielle (Figure 20). L'arrêt de croissance semble donc nécessaire à la propagation des bactéries jusqu'aux vaisseaux conducteurs. L'absence de *Gala7* ou d'*AvrA* entraînant une perturbation moins dramatique du méristème racinaire, la reprise de croissance de la racine ne permet plus une colonisation efficace de la bactérie. L'hypothèse retenue est l'image d'une « course » entre les deux partenaires : les bactéries, qui font un trajet horizontal à travers le cortex pour atteindre les vaisseaux conducteurs et la plante, dont la racine croît à la verticale avec un endoderme qui se lignifie naturellement au fur à mesure de l'élongation racinaire (Dettmer et al., 2009). Il semble que la bactérie ne puisse rentrer dans le cylindre central que lorsque l'endoderme n'est pas lignifié (Vasse et al., 2005). Si la croissance n'est pas altérée, l'endoderme sera différencié au moment où les bactéries atteindront les vaisseaux conducteurs. Il semble que l'arrêt de croissance permette donc à la bactérie d'atteindre les vaisseaux conducteurs dans une zone où l'endoderme n'est pas encore lignifié. La plante peut également agir à ce niveau en induisant une lignification rapide de l'endoderme à l'extrémité racinaire comme nous l'avons vu chez la lignée résistante F83005.5.

Dans l'ensemble, l'apparition des symptômes racinaires semble nécessaire mais pas suffisante à la colonisation bactérienne. En effet, dans les situations où les symptômes sont réduits ou absents, il y a une réduction systématique voire une abolition de la colonisation bactérienne. C'est le cas des mutants *gala7* et *avrA* sur la lignée A17 ou lorsque la voie éthylène est inhibée. Le cas de la souche *Molk2* va également dans ce sens, puisque chez la lignée A17, il y a une forte réduction des symptômes racinaires et de la colonisation bactérienne. Inversement, il peut y avoir réduction de la colonisation bactérienne sans réduction apparente des symptômes racinaires, comme le montre l'étude des mutants *gala7* et *avrA* chez la lignée F83005.5. Il semble donc que la mise en place des symptômes racinaires et la colonisation bactérienne soient deux étapes séquentielles dont la première est nécessaire à l'établissement de la seconde. Cela est cohérent avec l'hypothèse où la mort de l'épiderme serait un moyen pour la bactérie d'ouvrir une porte sur l'intérieur des tissus de l'hôte. Cette ouverture est nécessaire à la pénétration de la bactérie mais n'implique pas

que la bactérie sera ensuite capable de coloniser les tissus et ces deux étapes sont au moins partiellement contrôlées par des mécanismes distincts. *R. solanacearum* est une bactérie décrite comme ayant besoin de blessure ou d'ouverture naturelle pour pénétrer ses hôtes (Vasse et al., 1995). Selon notre hypothèse, *R. solanacearum* aurait mis en place un mécanisme qui lui crée une ouverture.

Le rôle du SST3 et plus particulièrement des ET3s Gala7 et AvrA a été clairement démontré dans le processus infectieux de *R. solanacearum* chez la lignée sensible. Cependant, ces deux effecteurs ne sont pas les seuls acteurs impliqués. Un pool d'effecteur est vraisemblablement responsable de la mise en place de l'ensemble des étapes de la colonisation bactérienne puisque le double mutant *gala7-avrA* présente toujours des symptômes racinaires. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui indique que les effecteurs agissent rarement seuls, la combinaison de leurs effets permettant la mise en place de la maladie (Lin et al., 2008; Ma et Guttman, 2008; Stavrinides et al., 2008).

Dans notre système, les effecteurs sont impliqués différemment lors de l'interaction avec la lignée sensible ou avec la lignée résistante. Tout d'abord, nous avons vu que la mutation des effecteurs Gala7 et AvrA ne semble pas réduire le développement de la mortalité épidermique chez la lignée résistante. En regardant la totalité des mutants d'effecteurs testés, 9 induiraient un développement une mortalité épidermique plus limitée en comparaison avec la souche sauvage. AvrA pourrait être impliqué dans la mise en place des symptômes mais cela ne semble pas être le cas de Gala7. Un même phénotype pourrait donc être induit par différents effecteurs. Une vaste étude sur les ET3s de *P. syringae* et *R. solanacearum* a révélé que plusieurs effecteurs présentant ou non des homologies de séquences sont capables d'induire un même motif de réaction (intensité de chlorose et/ou de nécrose), suggérant des cibles similaires ou des voies cellulaires identiques ciblées par les différents effecteurs (Wroblewski et al., 2009).

L'étude de la colonisation bactérienne chez la lignée F83005.5 par ces mutants a révélé que ces derniers n'étaient pas détectés dans les tissus de la plante. Les différentes étapes du processus infectieux semblent donc contrôlées par différents effecteurs. De plus, des effecteurs particuliers peuvent avoir des rôles différents en fonction des lignées impliquées dans l'interaction. Plusieurs exemples dans la littérature relatent le rôle d'effecteurs à un stade précis de l'interaction et le fait qu'une collaboration entre plusieurs

facteurs soit nécessaire pour virulence complète. Par exemple, HopPtoM est un ET3 de *P. syringae* qui a une contribution majeure dans l'élicitation des symptômes de lésions conférés par cet agent pathogène. Cet effecteur n'aurait pourtant pas de rôle dans la multiplication *in planta* du pathogène, qui semble gouvernée par d'autres mécanismes (Badel et al., 2003).

Dans le cas de Gala7, on sait que cet effecteur est capable d'interférer avec le processus d'ubiquitination de l'hôte. Il pourrait ainsi permettre à la bactérie de dégrader ou modifier des cibles protéiques afin de détourner des voies cellulaires de l'hôte (Angot et al., 2006; Angot et al., 2007; Zhou et Chai, 2008). Les différences de cibles protéiques ou voies intracellulaires mises en place en fonction de la lignée ou de l'espèce en question peuvent expliquer qu'une même fonction cellulaire puisse être associée à des rôles et des phénotypes variés en fonction de l'interaction considérée. Des protéines interagissant avec des membres de la famille des effecteurs GALA ont été identifiées. L'effecteur Gala6 et les protéines ASK1 et ASK2 d'*Arabidopsis* sont capables d'interagir en double hybride et l'interaction a été validée pour ASK2 grâce à des expériences de co-immunoprécipitations (Angot et al., 2006). Concernant l'effecteur AvrA, son mode d'action *in planta* reste encore assez obscur à ce jour, aucun homologue n'a été identifié chez d'autres espèces. Une étude récente a permis de mieux comprendre la structure de cet effecteur, une région de 18 acides aminés contenant des insertions VNTR serait importante pour l'élicitation de la HR sur Tabac (Poueymiro et al., 2009). Cette étude est la première qui décrit un rôle pour cet effecteur dans la virulence de la bactérie. Aucune cible pour les effecteurs Gala7 et AvrA n'a été identifié chez *M. truncatula* à ce jour.

### III. Mécanismes liés à la résistance

Suite à une inoculation sur racine intacte, plusieurs conditions ont abouti à une réduction ou une absence de développement de symptômes foliaires. Sur la lignée A17, la mutation de l'ET3 Gala7 a induit une diminution des symptômes racinaires et une absence de colonisation *in planta*. La mutation de l'effecteur AvrA a induit une réduction de la propagation bactérienne à plusieurs niveaux. Des divisions massives autour du cylindre central ont été observés et pourraient être un mécanisme entraînant une réduction de la propagation bactérienne dans les vaisseaux conducteurs. Comme cela a été discuté dans la

publication, l'observation de la lignée F83005.5 nous montre que la colonisation de l'extrémité racinaire n'implique pas directement le développement de symptômes foliaires de flétrissement. Dans ce cas, c'est la colonisation des vaisseaux conducteurs qui est nécessaire à l'établissement de ces symptômes. Nous allons donc tout d'abord voir les différents mécanismes semblant conférer une réduction ou une abolition du flétrissement bactérien dans l'extrémité racinaire avec des modifications de la composition pariétale et des divisions cellulaires autour du cylindre central. Nous allons ensuite discuter le fait que des mécanismes situés en aval de l'extrémité racinaire semblent également être impliqués dans la résistance ou la tolérance à *R. solanacearum*.

## **A. Des modifications pariétales semblent limiter la propagation de *R. solanacearum***

Nous avons montré dans nos travaux publiés qu'une lignification précoce et une autofluorescence pariétale importante semblent liées à la résistance chez F83005.5. La lignification est un mécanisme de défense répandu. Une étude a par exemple révélé que la formation de tissus ligno-subérisés chez *Pinus banksiana* était un mécanisme de résistance face à *Gremmeniella abietina* (Simard et al., 2001). Cette structure semble permettre le confinement du champignon pathogène vasculaire dans une zone nécrotique et il ne peut alors plus coloniser les vaisseaux conducteurs. Au cours d'un stress, la croissance racinaire diminue et la maturation de l'endoderme est accélérée et a lieu plus proche de l'extrémité racinaire. Ces phénomènes ont été décrits dans le cas de stress liés à la salinité, l'acidité, des carences en ion ou suite à une inondation (Enstone et al., 2003). On peut alors se demander si la résistance de F83005.5 face à *R. solanacearum* est spécifique ou est une caractéristique de la lignée, qui répondrait de manière plus précoce à n'importe quel stress.

La lignification de l'endoderme est un mécanisme qui ne semble pas être gouverné par Gala7 et AvrA chez la lignée A17, des résultats proches de ceux obtenus avec la souche GMI1000 ont été obtenus avec les mutants. L'autofluorescence pariétale en revanche semble plus importante suite à une inoculation par les mutants. Ce mécanisme pourrait donc être réprimé par les effecteurs afin de faciliter la propagation bactérienne.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent l'importance de la structure pariétale dans la résistance à *R. solanacearum*, ce qui est cohérent avec les résultats décrits dans la

littérature. En effet, nous avons vu qu'une étude sur la modification de la composition pariétale de la Tomate montrait un lien entre ce paramètre et la résistance des plantes. Une diminution de la méthyle-estérification des homogalacturonanes plus importante semblait être induite par la bactérie chez les cultivars sensibles (Wydra et Beri, 2006). Un autre exemple récent illustre l'importance de la composition pariétale dans l'infection de *R. solanacearum*. En effet, des mutants d'*Arabidopsis* dans des enzymes de synthèse de cellulose (CESAs) intervenant dans la formation de la paroi secondaire étaient plus résistants à la bactérie (Hernandez-Blanco et al., 2007).

## **B. Des divisions autour du cylindre central pourraient réduire la colonisation bactérienne**

Des divisions autour du cylindre central ont été observées dans plusieurs conditions et peuvent prendre deux formes, limitées uniformes autour du cylindre central ou massives et parfois asymétriques. Les premières ont été observées avec la lignée F83005.5 et le mutant *hrp* synthétisant les effecteurs ou dans la zone brune de racines dont la croissance est repartie avec les mutants d'effecteurs. Les divisions massives ont été rencontrées principalement avec le mutant *avrA* dans les extrémités arrêtées et lorsque la plante était morte avec ce mutant ou la souche GMI1000. Ces phénomènes pourraient être régulés par différents mécanismes mais semblent associés à un mécanisme de défense. En effet, on peut envisager que les divisions cellulaires permettent de renforcer le cylindre central et de limiter la pénétration bactérienne dans cette zone. Les divisions massives étant observées avec le mutant *avrA* dès 7jpi ou lorsque les plantes sont mortes, on peut émettre l'hypothèse que ce phénomène doit être mis en place de manière suffisamment précoce, avant le franchissement des vaisseaux conducteurs par la bactérie, pour être efficace. L'effecteur AvrA pourrait intervenir dans une régulation négative de l'induction de divisions cellulaires autour du cylindre central, réduisant ainsi la mise en place de ce mécanisme de défense potentiel.

Une étude récente sur le pathosystème *M. truncatula* et *A. euteiches* a révélé des différences cytologiques entre lignées résistante et sensible similaires à certaines observées dans notre système (djebali et al., 2009). Dans ce pathosystème, la lignée A17 est résistante et la lignée F83005.5 est sensible. Des dépôts importants de lignine et des couches cellulaires

supplémentaires autour du cylindre central ont été observées chez la lignée A17. Ces mécanismes semblent conférer une plus grande résistance au pathogène en limitant sa propagation dans les tissus vasculaires. Ces résultats renforcent nos conclusions car ces caractéristiques ne sont pas liées aux propriétés d'une lignée particulière mais bien à l'état de résistance. En effet, la lignée F83005.5 ne présente ni division, ni lignification face à *A. euteiches*.

### **C. La résistance peut également avoir lieu dans des stades plus tardifs de l'infection**

L'extrémité semble être un lieu déterminant dans la mise en place de l'infection et des mécanismes de résistance de la plante. Une inoculation sur racines coupées peut permettre de révéler des stades plus tardifs du processus infectieux. En effet, dans cette condition, il a été montré que le flétrissement des parties aériennes n'est pas forcément induit et il semble donc que des mécanismes de résistance puissent se mettre en place après la pénétration des vaisseaux conducteurs par la bactérie. Ces observations ont déjà été effectuées avec plusieurs hôtes dont *M. truncatula* (Vailleau et al., 2007) et *Arabidopsis* (Deslandes et al., 1998).

Le différentiel observé sur racines intactes entre les lignées A17 et F83005.5 est donc conservé en coupant l'extrémité racinaire. Les observations de propagation et de quantification bactérienne semblent indiquer que la résistance se situe principalement au niveau du collet, dans la zone de transition entre les parties racinaires et foliaires. Des études fines dans cette zone n'ont pas été effectuées au cours de cette thèse et nous ne disposons donc pas d'explications concrètes à ce phénomène. L'organisation vasculaire est différente entre la racine et les parties aériennes (Beck, 2005). La jonction des vaisseaux du xylème entre ces deux zones pourrait être différente entre les deux lignées et être un obstacle à la propagation bactérienne dans le cas de la lignée F83005.5. Il se pourrait également que des mécanismes spécifiques se mettent en place dans cette zone. Aucun élément bibliographique ne nous permet d'opter préférentiellement pour l'une ou l'autre des hypothèses. Il semble en tout cas que les mécanismes de résistance dans cette lignée interviennent à plusieurs niveaux.

La mutation de *Gala7* entraîne une réduction du pourcentage de plantes flétries. Chez la lignée A17 inoculée par le mutant *gala7*, 40 % des plantes meurent et un taux similaire de plante présente une colonisation des parties racinaires. Il semble donc qu'un mécanisme de résistance se mette en place dès l'extrémité de la racine coupée, limitant la propagation des bactéries dans les vaisseaux conducteurs. Si ce mécanisme n'a pas lieu, la bactérie semble se propager de manière similaire à la souche sauvage. Chez la lignée F83005.5, les mutants *gala7* ne pénètrent pas les racines coupées. Il se pourrait que des mécanismes de cicatrisations précoces ou qu'une production de composés antimicrobiens à la zone de coupure empêche la pénétration du mutant *gala7*. Il semble que dans le cas de la lignée A17, ces mécanismes soient moins constants et ne permettent pas une exclusion systématique de la bactérie des vaisseaux conducteurs. L'effecteur *Gala7* pourrait intervenir en court-circuitant la mise en place de ces mécanismes.

L'effecteur *AvrA* semble uniquement impliqué dans les étapes précoces de l'interaction puisqu'un profil de propagation similaire à la souche GMI1000 a été observé, que la lignée soit sensible ou résistante.

## **IV. Les mécanismes impliqués dans la sensibilité**

Au cours de l'étude de l'interaction, des processus associés à l'état de sensibilité ont été mis en évidence. L'inhibition de la voie éthylène a entraîné une perturbation des étapes précoces de l'interaction, une absence d'apparition des symptômes racinaires et de colonisation bactérienne a été observée. Une voie éthylène intacte chez l'hôte semble donc nécessaire à la virulence de la bactérie. Une autofluorescence du contenu cellulaire ainsi qu'une production de ROS seraient également associées à la colonisation bactérienne et à la sensibilité de l'hôte.

### **A. L'inhibition de la voie éthylène abolit les symptômes racinaires et la colonisation bactérienne**

L'implication de la voie éthylène dans la mise en place du processus infectieux et en particulier des symptômes racinaires a été mise en évidence. Nous avons vu dans l'introduction que l'éthylène est une hormone pléiotrope impliquée dans des processus

développementaux de la plante ou lors de stress biotiques ou abiotiques (Alonso et Stepanova, 2004). Dans le cadre d'une interaction pathogène, cette hormone est principalement étudiée pour son implication dans la mise en place de la défense des plantes. Cependant, de nombreux exemples relatent son importance dans l'établissement de la pleine virulence du pathogène, comme c'est le cas dans notre étude (Broekaert et al., 2006). Le rôle des hormones dans le développement de la maladie est sujet à discussion. En effet, il est difficile de définir si ces voies sont activées comme facteurs de virulence ou si les bactéries profitent de fonctions liées au développement des plantes (Grant et Jones, 2009).

Dans notre cas, la question se pose très clairement. Les symptômes racinaires décrits incluent une mortalité cellulaire, une émission de racines secondaires et un arrêt de croissance racinaire, qui sont abolis lors de l'inhibition de la voie éthylène par voie chimique ou par l'utilisation du mutant *skl*. Au niveau développemental, l'éthylène est impliqué dans un contrôle négatif de la croissance racinaire (Stepanova et al., 2005; Iwama et al., 2007; Sun et al., 2007; Dugardeyn et al., 2008). Il a également des rôles positifs sur la morphogénèse des poils absorbants (Cho et Cosgrove, 2002; Rahman et al., 2002), la division cellulaire (Love et al., 2009), l'induction de racines latérales (Aloni et al., 2006), la maturation des vaisseaux conducteurs (Aloni et al., 2006; Dettmer et al., 2009) et la mort cellulaire (Steffens et Sauter, 2005). Nos résultats sont cohérents avec les rôles connus de l'éthylène chez la plante et des phénotypes similaires ont également été décrits lors de stress abiotiques. En effet, une toxicité à l'aluminium induit une mort de l'extrémité racinaire et un arrêt de sa croissance. Une étude transcriptomique a révélée implication de l'éthylène dans ce processus (Pan et al., 2001; Tamas et al., 2005; Sun et al., 2007; Chandran et al., 2008; Chandran et al., 2008).

L'étude des mutants *gala7* et *avrA* a révélé une réduction des symptômes dont la mise en place par la souche GMI1000 est dépendante d'une voie éthylène fonctionnelle. On peut donc se demander si ces effecteurs ne sont pas capables d'interférer avec la mise en place de cette voie en l'activant afin d'induire un arrêt de croissance racinaire et une mortalité épidermique nécessaire à la colonisation. Un exemple dans la littérature relate le rôle de deux effecteurs de *P. syringae*, AvrPto et AvrPtoB, dans l'induction de la production d'éthylène par la Tomate. Ces effecteurs entraînent l'induction de deux gènes, LeACO1 et LeACO2, qui codent pour une enzyme de biosynthèse de l'éthylène, l'ACC oxidase. Cette

régulation par les effecteurs est nécessaire à la pleine virulence de la bactérie (Cohn et Martin, 2005).

Une absence de colonisation bactérienne a également été observée lors de l'inhibition de la voie éthylène, cette inhibition conférant donc une plus grande résistance à la bactérie. Comme nos résultats suggèrent que la mise en place des symptômes racinaires est nécessaire à la colonisation, il est donc logique de ne pas observer de colonisation bactérienne lors de nos expériences d'inhibition de la voie éthylène. Dans ce cas, on peut se demander si la résistance ne serait pas due à l'absence de mise en place d'un mécanisme de sensibilité. On peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de la voie éthylène ne permet pas la mise en place de la mort de l'épiderme et ferme donc la voie d'entrée de la bactérie.

Par ailleurs, des études préliminaires sur l'implication de l'éthylène dans les stades plus tardifs du processus infectieux, en coupant l'extrémité racinaire lors de l'inoculation, ont été effectuées. Les premiers résultats ont révélé que les symptômes foliaires sont réduits (données non montrées). Il sera intéressant d'approfondir ces résultats car l'éthylène semble impliqué à plusieurs stades du développement de la maladie.

## ***B. R. solanacearum* présente-t-elle une phase nécrotrophe ? Mise en évidence par la production de ROS**

L'autofluorescence du contenu cellulaire se manifeste dans les conditions où une pénétration corticale de la bactérie a été détectée et le pourcentage de racines concernées semble proportionnel au pourcentage de racines colonisées. La configuration de ces cellules autofluorescentes rappelle d'ailleurs celle des poches bactériennes observées grâce aux coupes longitudinales. La coloration au bleu de toluidine indique un lien entre l'autofluorescence cellulaire et la présence bactérienne mais il n'y a pas de superposition systématique. L'épaisseur de la coupe implique une superposition de plusieurs couches cellulaires, on peut penser que l'autofluorescence dans les couches inférieures soit suffisamment forte pour être visible en surface, ce qui ne serait pas le cas de la coloration au bleu de toluidine. Ce paramètre pourrait être une explication à l'absence de superposition. On peut également penser qu'il y ait un décalage temporel entre l'autofluorescence

cellulaire et sa colonisation. Des bactéries détectées au niveau de la paroi cellulaire pourraient déclencher une production rapide de composés autofluorescents ou inversement, une colonisation massive d'une cellule pourrait aboutir à une autofluorescence de cette dernière.

L'infection par la souche GMI1000 induit une perturbation du métabolisme des ROS, observable au niveau qualitatif et quantitatif. La répartition de l' $O_2^-$  avec le NBT a permis de révéler des motifs très hétérogènes en comparaison du témoin eau où la coloration est homogène sur l'ensemble des coupes. Des variations importantes d'intensité de coloration ont été observées et notamment des cellules très foncées chez les deux lignées, qui rappellent la configuration des cellules autofluorescentes ou des poches bactériennes. La quantification d' $H_2O_2$  a permis de révéler une induction de cette molécule chez les deux lignées avec la souche GMI1000 par rapport à une inoculation avec de l'eau. L'induction semble être plus importante chez la lignée A17 et augmente avec le temps. Dans notre situation, cette induction ne semble donc pas liée à la signalisation cellulaire précoce permettant la mise en place de mécanismes de défense. Cela pourrait être lié à la mise en place de la lignification de l'endoderme car ce processus implique l'action de peroxydases, mais cela ne peut pas être la seule explication car ce phénomène a été observé de manière plus précoce chez la lignée F83005.5.

Dans la littérature, on trouve un lien entre la production de ROS et l'autofluorescence cellulaire. Les cellules contiennent des fluorophores endogènes qui sont autofluorescents suite à une excitation par les UV (Gaspers et Thomas, 2008). Leurs présences vont être induites ou réprimées en fonction des situations biologiques. Une partie de l'autofluorescence est générée par l'activité des mitochondries, la présence d'acides aminés aromatiques ou de composés phénoliques. La majorité de l'autofluorescence cellulaire sous UV est liée à la présence d'une co-enzyme NAD(P)H qui présente une autofluorescence sous forme réduite (Koenig et al., 1996; Monici, 2005). L'autofluorescence cellulaire est donc un test utilisé pour révéler le stress oxydatif de la cellule (Schuchmann et al., 2001; Kable et Kiemer, 2005) et parfois la mort cellulaire (Kwak et al., 2006). Une étude sur la levure a montré que le niveau de NADH intracellulaire mesuré par autofluorescence augmente au début du processus d'apoptose et va ensuite diminuer jusqu'à la mort de la cellule (Liang et al., 2007). Ces résultats pourraient expliquer le fait que dans notre système, les extrémités mortes ne présentent pas d'autofluorescence cellulaire.

Une corrélation entre la production de ROS et la colonisation bactérienne est cohérente avec plusieurs faits décrits dans la littérature. Tout d'abord, des gènes de détoxification de ROS comme des peroxydases sont induit au cours de l'infection de *R. solanacearum* chez la Tomate et suggèrent que la bactérie évolue dans un milieu riche en ROS (Flores-Cruz et Allen, 2009). Son génome contient de nombreuses enzymes de détoxification des ROS. Dans l'étude de Flores-Cruz (2009), plus de 9% des gènes induit au cours de l'interaction avec son hôte étaient également régulés positivement par de l' $H_2O_2$ , suggérant qu'un stress oxydatif pourrait être lié à son cycle de vie dans la plante. Une mesure de la concentration en  $H_2O_2$  dans les feuilles de Tomates infectées a montré qu'elle augmente au cours de la croissance de la population bactérienne. Ces résultats sont cohérents avec nos observations. Des mutants bactériens dépourvus d'une peroxydase putative, *bcp*, présentent une réduction de leur virulence, montrant qu'il est important pour la virulence de la bactérie qu'elle soit capable de détoxifier les ROS. Dans cette publication, l'hypothèse est que la détoxification des ROS permettrait à la bactérie de ne pas être affectée par les défenses de l'hôte. Une étude faite sur plusieurs champignons pathogènes nécrotrophes comme *B. cinerea* et *S. sclerotiorum* révèle qu'ils possèdent également une large batterie d'enzymes de détoxifications des ROS comme des superoxydes dismutases, des catalases ou des peroxydases (Mayer et al., 2001). Les auteurs envisagent que ces enzymes leurs permettent de détoxifier les ROS produit en relation avec la mort cellulaire de l'hôte. C'est une hypothèse que l'on pourrait également envisager dans le cas de *R. solanacearum*.

Dans notre système, les ROS pourraient être produits par la plante en lien avec la mort cellulaire. En effet, *R. solanacearum* semble connaître un stade nécrotrophe dans la zone corticale jusqu'au franchissement des vaisseaux conducteurs. Il n'est cependant pas établi si la bactérie induit une mort cellulaire de l'hôte pour pouvoir pénétrer et se multiplier dans les cellules, ou si la bactérie dégrade les parois des cellules corticales avec sa batterie d'enzymes. En effet, le test FDA effectué avec le mutant du SST2 reflétait l'implication des enzymes dans la dégradation de l'épiderme. Nous avons vu qu'il était fort possible que les mêmes mécanismes ne soient pas impliqués dans la dégradation de l'épiderme et la propagation bactérienne dans la zone corticale.

Le lien entre la production de ROS et la mort cellulaire est bien illustré (Mazel et Levine, 2001; Van Breusegem et Dat, 2006). La production de ROS serait une composante centrale d'une boucle d'auto-amplification appelée cycle de la mort cellulaire oxydative

(Kangasjarvi et al., 2005). Dans ce système décrit pour expliquer le lien entre l'ozone et la mort cellulaire, l'ozone induit la formation de ROS. Ces ROS peuvent directement entraîner des dommages cellulaires aboutissant à une mort cellulaire. La mort cellulaire entraîne alors la production d'éthylène nécessaire pour entretenir la production de ROS, permettant alors la propagation de la mort cellulaire. Ce modèle peut-être étendu à une interaction pathogène où l'agent pathogène sera responsable de l'induction de la production de ROS (Bouchez et al., 2007). L'importance de l'éthylène dans la sensibilité de la lignée A17 à *R. solanacearum* a été discutée et est cohérente avec la mise en place de ce processus.

L'importance des ROS et de la mort cellulaire dans la sensibilité à un agent pathogène nécrotrophe est largement illustrée. Par exemple, une étude sur l'Orge et deux champignons nécrotrophes *Rhynchosporium secalis* et *Pyrenophora teres* montre l'importance de la production de ROS dans la sensibilité de l'hôte (Able, 2003). En effet, un burst oxydatif tardif est observé de manière plus importante chez la lignée sensible. La cinétique d'induction de ces ROS correspond au moment du contact du pathogène avec la membrane plasmique et la mort cellulaire venant ensuite. Cette induction massive de ROS a été observée proche de cellules mortes et brunies par la présence de composés phénoliques chez la lignée sensible. Une préinfiltration avec un antioxydant n'a pas eu d'effet sur la mise en place de la résistance mais a entraîné une limitation de l'expansion du pathogène et le brunissement des cellules. Au cours d'une interaction avec agent pathogène nécrotrophe, la mort cellulaire peut être induite de manière directe ou indirecte en fonction des pathosystèmes étudiés. Les agents pathogènes nécrotrophes produisent des toxines afin d'entraîner la mort cellulaire. Par exemple, l'acide fusarique est une toxine produite par *Fusarium sp.* qui induit la mort cellulaire en entraînant une perméabilité de la mitochondrie et de la membrane plasmique ainsi qu'une production de ROS (Samadi et Shahsavan Behboodi, 2006). L'induction de la mort cellulaire peut également être induite de manière indirecte. Les espèces de champignons pathogènes *Fusarium sp.* produisent des mycotoxines comme le deoxynivalenol (DON) au cours de l'infection, nécessaires à la virulence et à la propagation de l'agent pathogène (Desmond et al., 2008). Cette toxine favoriserait la propagation de l'agent pathogène en induisant la production de ROS conduisant à la mort cellulaire de l'hôte.

L'ensemble de ces éléments observés en lien avec la sensibilité et la colonisation bactérienne nous permet de renforcer l'hypothèse que *R. solanacearum* aurait une phase

nécrotrophe lors de sa multiplication dans le cortex de l'extrémité racinaire chez *M. truncatula*. Il semble qu'il y ait une relation fonctionnelle importante entre colonisation bactérienne, production de ROS, d'éthylène, l'autofluorescence et la mort cellulaire.

## **V. La complexité du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* et le rôle du SST3**

Le développement de la maladie implique un ensemble de facteurs et d'étapes successives. La bactérie doit s'attacher à son hôte, déjouer ses défenses ou ne pas les induire et coloniser les tissus afin de se multiplier. Ces événements pourront aboutir au développement de symptômes. Le SST3 est un déterminant majeur du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* mais il n'est pas le seul intervenant, comme nous l'avons vu §V de l'introduction. Les différentes analyses faites sur les mutants *hrp* soulèvent plusieurs questions sur l'importance de SST3 dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* chez *M. truncatula*. Tout d'abord l'attachement de la bactérie est-il lié à son SST3 ? Quelle à la capacité des mutants *hrp* à coloniser les tissus de son hôte ? Induisent-ils des mécanismes de défense ?

### **A. Le rôle du SST3 dans l'attachement de la bactérie**

Dans notre étude, l'attachement de mutants *hrp* a été observé en de rares occasions par rapport à la souche GMI1000. Il semble cependant que l'attachement polaire de la bactérie ne soit pas affecté par la mutation du SST3. Des études sur l'attachement de la bactérie ont été effectuées sur cultures cellulaires de Tabac (Van Gijsegem et al., 2000; Kang et al., 2002) et d'Arabidopsis (Aldon et al., 2000). L'attachement polaire similaire à la souche sauvage a été décrit mais aucune étude n'indique l'importance du SST3 dans l'attachement de la bactérie avec des plantes entières et d'un point de vue quantitatif (Aldon et al., 2000; Van Gijsegem et al., 2000; Kang et al., 2002). Il serait intéressant de faire ces études comparatives sur un même système biologique pour voir si la différence de quantification observée vient du système expérimental.

## B. La colonisation *in planta* des mutants *hrp*

La capacité des mutants *hrp* à coloniser la plante est également une question posée par ce travail de thèse. Suite à une inoculation sur racine intacte, le suivi de la colonisation bactérienne *in planta* par utilisation de bactérie GUS a révélé que le mutant *hrcV*-GUS ne semblait pas capable de coloniser la plante. Les observations des coupes longitudinales faites suite à une inoculation avec le mutant *hrcS* n'ont pas révélé de colonisation de la plante dans ce mutant. Les résultats suite à une inoculation avec le mutant *hrcS* ont montré que ce mutant a induit de l'autofluorescence intracellulaire, décrite uniquement dans les conditions où les bactéries ont été détectées dans la zone corticale. Cela n'a pas été le cas avec les mutant *hrcV* et *hrpB*. Les protéines HrcS et HrcV participent à la partie basale de la structure du SST3 et devraient en théorie induire le même phénotype. Il est cependant envisageable que des mutants *hrcS* aient colonisé la zone corticale en nombre trop faible pour être détectés ou qu'il y ait un artéfact.

En coupant l'extrémité racinaire, le mutant *hrcV*-GUS n'a pas été détecté dans les vaisseaux conducteurs comme la souche GMI1000 et les bactéries ont semblé réparties dans la zone corticale. Ces résultats montrent l'importance du SST3 dans la pénétration et localisation de la bactérie dans notre système. Une étude de la colonisation d'un mutant *hrpB* de la souche OE1-1 sur Tabac a été réalisée en infiltrant les feuilles ou en plongeant les racines dans une suspension bactérienne. Le mutant a perdu sa capacité à coloniser et se multiplier à l'intérieur de l'hôte (Kanda et al., 2003). Des résultats différents ont été obtenus sur Tomate. En effet, une étude sur 11 mutants structuraux *hrp* de la souche GMI1229 de *R. solanacearum* a révélé qu'à l'exception d'un mutant, tous ont été détectés dans la tige et sont capables de pénétrer le système racinaire (Trigalet et Demery, 1986). Parmi les mutants détectés dans la tige, quatre ont une propagation limitée dans les parties aériennes et ne sont pas présents à partir du troisième étage foliaire. Les 6 derniers ont été détectés dans tous les tissus prélevés. Si les bactéries étaient présentes au seins des tissus, la vitesse de colonisation et le niveau de multiplication des mutants étaient systématiquement réduits par rapport à la souche virulente. Une autre étude montre que le mutant *hrpB* est capable de coloniser la plante mais présente une infection et une multiplication réduite (Vasse et al., 2000). Dans l'ensemble, ces résultats montrent l'importance du SST3 dans la localisation et la

multiplication *in planta*. Son implication dans la pénétration de l'hôte semble variable en fonction de l'interaction étudiée.

### C. L'induction de mécanismes de défense par les mutants *hrp*

Dans notre étude, les mutants *hrp* ont été capables d'induire une lignification de l'endoderme, une autofluorescence corticale et des divisions cellulaires autour du cylindre central dans le cas des mutants *hrcV* et *hrcS* et plus rarement avec le mutant *hrpB*. Les trois mutants ont provoqué une réduction de la croissance racinaire. Les différences observées entre les mutants de structure du SST3 (*hrcV* et *hrcS*) et le mutant de régulation *hrpB* peuvent être dûes au fait que le gène *hrpB* contrôle d'autres mécanismes de virulences que le SST3, qui pourraient être impliqués dans l'induction de ces mécanismes (Occhialini et al., 2005). Nous avons vu d'ailleurs qu'un ensemble de facteurs de virulence autre que le SST3 sont impliqués dans le pouvoir pathogène de la bactérie et sa détection par la plante. La variation des mécanismes induits par différents mutants *hrp* et leurs assimilations à des mécanismes de défense potentiels ont été largement illustrés. Par exemple, au cours de l'interaction entre *E. amylovora* et *Malus* sp., un mutant *hrp* n'induit aucune réponse en matière de production de ROS et d'accumulation de protéines PR en comparaison avec ce qui est induit par le sauvage. Cependant, la production d'enzymes du métabolisme des phenylpropanoïdes (chalcone synthase (CHS), dihydroflavonol reductase (DFR) et flavonol synthase (FLS)) est identique au sauvage (Venisse et al., 2002). Il existe donc dans ce système des mécanismes de défense dépendants et indépendants du SST3. Au cours de l'interaction entre le Poivron (*Capsicum annuum*) et deux pathovars de *X. campestris*, pv. *vesicatoria* et pv. *campestris*, la production de deux composés phénoliques a été détectée 24 hpi, le feruloyltyramine (FT) et le *p*-coumaroyltyramine (CT) (Newman et al., 2001). L'étude de la production de ces composés avec les mutants *hrp* des deux souches a révélé que, dans le cas du mutant de *X. campestris* pv. *campestris*, une accumulation plus rapide, dès 4hpi, a été observée. En revanche, dans le cas du mutant de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, aucune production n'a été détectée. Il y a donc des mécanismes d'activation et de répression de défense dépendants et indépendants du SST3 et variables en fonction des interactions étudiées. Les mécanismes de défense induits par ces mutants *hrp* alors qu'ils sont avirulents peuvent être utiles en matière de lutte biologique. Des essais de protection sur Tomate ont

été effectués en inoculant des mutants *hrp* simultanément ou 8 jours avant l'inoculation par la souche virulente, une protection systématique a été observée (Trigalet et Trigalet-Demery, 1990). D'autres expériences avec le mutant *hrcV* sur Tomate ont donné des résultats similaires et ce, malgré la production d'une toxine par le sauvage et une multiplication importante (Frey et al., 1994). Il existe également des systèmes où l'induction de défense n'a pas pu être mise en évidence comme avec les mutants *hrpB* et *hrpY* de la souche OE1-1 chez le Tabac. L'expression des gènes *hsr203f* et *hin1*, induite au cours de l'interaction avec la bactérie sauvage n'a pas été observée avec les mutants (Kanda et al., 2003).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*R. solanacearum* est une bactérie pathogène qui a développé des mécanismes efficaces pour coloniser de nombreux hôtes. La pénétration de la bactérie par l'extrémité racinaire observée chez *M. truncatula* n'avait jamais été décrite chez la Tomate, hôte qui a servi de modèle pour la majorité des travaux sur la colonisation par cette bactérie. Dans notre système, le développement de symptômes racinaires qui apparaissent rapidement dans cette zone (altération de l'épiderme et arrêt de croissance racinaire) est nécessaire à la colonisation racinaire tout en n'étant pas suffisants au déroulement ultérieur de la maladie. Ces symptômes se sont révélés chez l'ensemble des espèces testées. Analyser les étapes précoces de la colonisation chez d'autres espèces hôtes de *R. solanacearum* nous permettrait de comprendre la capacité de la bactérie à diversifier et adapter son mode opératoire en fonction de l'hôte impliqué.

Le SST3 est un déterminant majeur du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* car il lui permet d'injecter une batterie d'ET3s qui participent au développement de maladie. Nos travaux ont permis d'identifier deux ET3s, Gala7 et AvrA, qui ont un rôle majeur dans la virulence de *R. solanacearum* vis à vis de *M. truncatula*. Ils sont principalement impliqués dans les étapes précoces de pénétration et de colonisation bactérienne. Ces deux ET3s sont des piliers de l'infection dans ce pathosystème et l'identification de leurs cibles et fonctions cellulaires serait une avancée importante dans la compréhension du processus infectieux chez *M. truncatula*. Une étude de l'activité méristématique racinaire suite à une infection par la souche GMI1000 et par les mutants *gala7* et *avrA* serait également intéressante dans ce cadre.

La sensibilité et la colonisation de la plante entraînent des modifications cellulaires avec notamment une autofluorescence cellulaire et la production de ROS qui seraient liées à la mort cellulaire. La première étape nécessaire à la pénétration est l'induction par la bactérie d'une mort cellulaire de l'épiderme, dont la mise en place semble contrôlée par la plante et notamment la voie éthylène. Puis, la bactérie semble connaître une phase nécrotrophe lors des étapes précoces de colonisation de la zone corticale de l'extrémité racinaire, qui lui permettrait l'atteindre les vaisseaux conducteurs. Il n'a pas été établi de manière claire si la mort cellulaire était induite de manière directe ou indirecte lors de la

multiplication bactérienne dans la zone corticale. Ces deux étapes pourraient faire intervenir des mécanismes distincts et il serait intéressant d'étudier le rôle des enzymes bactériennes de dégradation de la paroi au cours de la colonisation de la zone corticale. L'implication des ET3s devrait également être analysée puisqu'ils semblent également intervenir à cette étape. En effet, nous avons vu chez la lignée F83005.5 que les symptômes racinaires ne sont pas réduits avec les mutants *gala7* et *avr4*. En revanche, la colonisation de la zone corticale n'a pas été détectée avec ces mutants.

Du côté du partenaire végétal, plusieurs niveaux d'infections ont pu être mis en évidence, révélant des mécanismes de contrôle complexes de la part des deux partenaires. L'inhibition de la voie éthylène a entraîné une absence de symptômes racinaires pouvant être à l'origine de l'absence de colonisation observée suite à une inoculation sur racines intactes. Il semble cependant que l'éthylène soit également impliqué à d'autres stades de l'infection. A ce titre, une étude de la colonisation bactérienne suite à une inoculation sur racine coupée pourrait nous informer sur le rôle de l'éthylène dans les stades plus tardifs du développement de la maladie. L'étude de l'implication d'autres hormones végétales devrait être également être envisagée. En effet, les mécanismes de mort, de division et d'élongation cellulaires font intervenir des réseaux complexes de régulation hormonale où l'auxine joue un rôle particulièrement important, notamment en interaction avec l'éthylène.

L'étude de la colonisation de la lignée F83005.5 a révélé plusieurs niveaux de contrôles de la propagation bactérienne. Suite à une inoculation sur racine intacte, les bactéries sont arrêtées avant le cylindre central. Une modification des parois cellulaires de la zone corticale, une lignification précoce de l'endoderme ainsi que des divisions cellulaires autour du système vasculaire semble permettre ce contrôle de la colonisation bactérienne. Ce ne sont pas les seuls mécanismes permettant la résistance chez la lignée F83005.5. En effet, suite à une inoculation sur racines coupées, les bactéries colonisent les vaisseaux conducteurs au niveau racinaire et le contrôle de la propagation bactérienne semble être situé au niveau du collet. Une étude comparative de cette zone suite à une inoculation sur racine coupée chez les lignées sensible et résistante, au niveau morphologique et biochimique, devrait nous donner des informations sur ce niveau de résistance.

Afin d'étudier les voies végétales régulées au cours de l'interaction sensible ou résistante, une étude transcriptomique comparant les lignées A17, F83005.5 et le mutant *skl*

à différents temps suite à une inoculation sur racine intacte par la souche GMI1000 a été entreprise au laboratoire. Il serait intéressant d'étudier la régulation de la voie des ROS ou de l'éthylène dans notre système et d'en identifier les potentiels acteurs au niveau moléculaire.

MATERIELS

&

METHODES

# MATERIELS ET METHODES

## ➤ Dosage de l'activité $\beta$ -glucuronidase

10 extrémités racinaires (1,5 cm) sont prélevées et broyées dans l'azote liquide par temps et par condition d'inoculation pour chaque répétition (3 au total).

Une extraction de protéines totales est effectuée sur le broyat. 500  $\mu$ L de tampon d'extraction GUS (TEG, cf. composition en fin de paragraphe) sont ajoutés pour 150 mg de broyat. Deux séries de centrifugation ont été effectuées pendant 15 min à 4°C et 13400 rpm où le surnageant est à chaque fois récupéré dans un tube propre.

Le dosage de l'activité GUS est réalisé à l'aide d'un fluoroscan (Microplate Fluorescence reader FL600 Bio-Tek) (Jefferson, 1987). Une solution de 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide hydrate (MUG) (SIGMA M9130 100mg) est préparée à 10mM dans le TEG. L'ensemble des conditions d'une répétition est déposé et analysé sur une plaque multipuits 96. Dans chaque puits sont déposés 25  $\mu$ L d'extrait protéique de la condition donnée, 155  $\mu$ L de TEG et juste avant lecture, 20  $\mu$ L de MUG 10 mM. Un blanc est effectué avec 180  $\mu$ L de TEG et 20  $\mu$ L de MUG 10mM. Une gamme étalon est préparée avec du 4-methylumbelliferone (MU) 1mM dissout dans le TEG et du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2M dilué au 1/10ème dans le TEG. Les concentrations finales de MU sont 0 ; 0,01 ; 0,1 ; 0,4 ; 0,8 et 1mM, les solutions sont déposées telles quelles sur la plaque.

Le fluoroscan utilisé pour la lecture de la plaque et le dosage de l'émission de fluorescence est programmé avec les caractéristiques suivantes : filtre d'excitation 360 nm (largeur de bande 40nm), filtre d'émission 460 nm (largeur de bande 20 nm), température à 37°C. Une lecture est effectuée chaque 5min pendant 40 min afin d'observer une cinétique d'émission de fluorescence. Les résultats sont donnés en unité de fluorescence relative. Les valeurs de la cinétique nous permettent ainsi d'obtenir une valeur de pente pour chaque condition, correspondant à une émission de fluorescence par min.

Un dosage de protéine est effectué sur chaque extrait avec l'utilisation du réactif de Bradford (Coomassie stain solution, BIO-RAD 161-0436) (Bradford, 1976). Une gamme étalon est effectuée avec de la Bovine Serum Albumin (BSA, Biolabs B9001S) à 0 ; 5 ; 12,5 ; 25 ; 37,5 ; 50 ; 62,5 ; 75  $\mu$ g/ml. Le dosage est fait avec l'extrait protéique dilué au 32<sup>ème</sup> ou

la gamme étalon dans 800µl d'eau, qui sont mélangés à 200µl de réactif de Bradford. Après 10 à 30 min de repos à température ambiante, la lecture de densité optique s'est faite à 595 nm par un spectrophotomètre.

La valeur de la pente obtenue avec les résultats de la gamme étalon nous permet de faire une corrélation entre la lumière émise et la quantité de MU produite au cours de la réaction. Le résultat final est donné en émission de MU par min et par mg de protéine.

Tampon d'extraction GUS (TEG) (pour 50ml) :

10 ml de tampon phosphate de sodium pH=7 filtré (filtre 0,22 µM)

1 ml de Na<sub>2</sub>EDTA pH=8 filtré (filtre 0,22 µM)

0,5 ml de Triton X-100 à rajouter extemporanément

34,5 µL β-mercapto éthanol à rajouter extemporanément

Qsp. 50ml avec de l'eau UHQ

➤ Observation des ROS

**Détection d'O<sub>2</sub>- par coloration *in planta* au Nitrobluetétrazolium (NBT) (Ramu et al., 2002)**

Entre 3 et 5 extrémités racinaires sont prélevées pour chaque temps et chaque condition d'inoculation. 3 répétitions biologiques ont été effectuées. La mise en évidence de d'O<sub>2</sub>- par coloration NBT est faite *in planta* avant de procéder aux coupes.

Les racines sont infiltrées sous vide 10 min dans du tampon phosphate de sodium 10mM pH=7,8 puis laisser incuber 1h à 37°C dans tampon phosphate de sodium 10mM pH=7,8 contenant du NBT 0,1%. Les extrémités sont incluses dans de l'agar low melting 5% puis coupées au vibratome LEICA (Turner et al., 2009). Les coupes sont montées dans de l'eau entre lame et lamelle puis observées en fond clair.

**Dosage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au luminomètre (Djebali, 2008)**

10 extrémités racinaires (1,5 cm) sont prélevées et broyées dans l'azote liquide par temps et par condition d'inoculation pour chaque répétition. 2 répétitions biologiques ont été effectuées. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est extrait en ajoutant 300µL de Méthanol : EDTA 0,5M pH8 (9 :1, v/v)

pour 100 mg de matière fraîche. Après 15 min de centrifugation à 13000 g à 4°C, le surnageant est récupéré et conservé dans la glace.

Parallèlement, une solution de luminol (3-aminophthalhydrazide) est préparée à 0,11µM dans du tampon phosphate de potassium 50mM pH 7,9 ainsi qu'une solution de potassium ferricyanide à 14 mM.

Le dosage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se fait avec un luminomètre (SIRIUS luminometer Berthold detection system). Au moment du dosage, on mélange 20µL d'extrait et 20µL de la solution de luminol à 0,11µM dans un tube placé dans le luminomètre. La réaction de chimioluminescence est déclenchée par ajout de 20µL de potassium ferricyanide, directement par l'appareil. L'émission de chimioluminescence est détectée par le luminomètre qui donne les données brutes en Relative Light Unit (RLU). Pour chaque condition, on prend comme résultat la valeur d'émission maximale détectée.

### ➤ Complémentation des mutants *gala7* et *avrA*

La complémentation du mutant *gala7* par le gène codant pour l'effecteur délété ou non de la F-Box par les plasmides pNP221 et pNP222 a été décrite par Angot (2006).

La complémentation du mutant *avrA* par le gène codant pour l'effecteur AvrA a été effectuée par insertion du plasmide pSC222. Ce plasmide correspond au plasmide pLAFR6 qui contient un fragment PCR de 967 bp amplifié avec les primers AvrA-CpIF et AvrA-CpIR et a été décrit par Poueymiro (2009).

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été effectuées avec 10 plantes par répétition.

### ➤ Implication des hormones bactériennes

La souche GMI1770 porte une disruption de cinq gènes codant potentiellement pour la biosynthèse d'auxine (S. Genin, comm. personnelle), ΔRSp0680-RSp0684::Ω. Cet interposon Ω permet une sélection sur Spectinomycine (Prentki et Krisch, 1984).

La souche GRS428 porte une disruption dans un gène codant pour une trans-zéatine synthase impliqué dans la biosynthèse de cytokinine, ΔRSp1225::Ω (Akiyoshi et al., 1989).

La souche GMI1769 porte une disruption dans le gène *efe* (ethylen forming enzyme),  $\Delta efe::\Omega$  et est donc inhibée dans la synthèse d'éthylène (Valls et al., 2006).

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été effectuées avec 10 plantes par répétition

### ➤ Inhibition de la voie éthylène

L'inhibition de la voie éthylène est effectuée par l'utilisation d'Aminoethoxyvinylglycine (AVG) (SIGMA 32999) 24 heures avant inoculation par la bactérie, à une concentration de 10 $\mu$ M. Pour cette condition, les traitements sont effectués sur des plantules de 3 jours et l'inoculation par la bactérie a donc lieu sur des plantules de 4 jours.

Le mutant *sk1* a également été utilisé pour étudier l'implication de la voie éthylène dans notre processus, c'est un mutant hypernodulant insensible à cette hormone (Penmetsa et Cook, 1997).

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été effectuées avec 10 plantes par répétition

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
-----------------------------

- Able AJ** (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* **221**: 137-143
- Abramovitch RB, Martin GB** (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 356-364
- Afroz A, Khan R, Ahsan N, Komatsu S** (2009) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. *Peptides*
- Ahmad M, Majerczak DR, Pike S, Hoyos ME, Novacky A, Coplin DL** (2001) Biological activity of harpin produced by *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1223-1234
- Akiyoshi DE, Regier DA, Gordon MP** (1989) Nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Pseudomonas solanacearum* strain K60. *Nucleic Acids Res* **17**: 8886
- Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S** (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal* **19**: 2304-2314
- Aldridge P, Hughes KT** (2001) How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* **9**: 209-214
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, et al.** (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7327-7331
- Alfano JR, Collmer A** (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* **179**: 5655-5662
- Alfano JR, Collmer A** (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414
- Allen C, Huang Y, Sequiera L** (1991) Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 147-154
- Allen C, Prior P, Hayward AC** (2005) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. *The American Phytopathological Society, St-Paul, Minnesota*
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot (Lond)* **97**: 883-893
- Alonso JM, Stepanova AN** (2004) The ethylene signaling pathway. *Science* **306**: 1513-1515
- Alvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Demery D, Lopez MM, Trigalet A** (2008) Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* **98**: 59-68
- Ameline-Torregrosa C, Cazaux M, Danesh D, Chardon F, Cannon SB, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B, Young ND, Samac DA, Huguet T, Jacquet C** (2008) Genetic dissection of resistance to anthracnose and powdery mildew in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 61-69
- Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S** (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14620-14625

- Angot A, Vergunst A, Genin S, Peeters N** (2007) Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog* **3**: e3
- Araud-Razou I, Vasse J, Montrozier H, Etchebar C, Trigalet A** (1998) Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *R.solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 795-809
- Arlat M, Van Gijsegem F, Huet JC, Pernellet JC, Boucher CA** (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
- Badel JL, Nomura K, Bandyopadhyay S, Shimizu R, Collmer A, He SY** (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
- Baker CJ, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 299-321
- Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM** (1993) Harpin, An Elicitor of the Hypersensitive Response in Tobacco Caused by *Erwinia amylovora*, Elicits Active Oxygen Production in Suspension Cells. *Plant Physiol* **102**: 1341-1344
- Baldrige GD, O'Neill NR, Samac DA** (1998) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology* **38**: 999-1010
- Bari R, Jones JD** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473-488
- Bauer DW, Wei ZM, Beer SV, Collmer A** (1995) *Erwinia chrysanthemi* harpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 484-491
- Beck CB** (2005) *An Introduction to Plant Structure and Development: plant anatomy for the 21st century*. Cambridge University Press, New-York
- Bent AF, Innes RW, Ecker JR, Staskawicz BJ** (1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 372-378
- Bent AF, Mackey D** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 399-436
- Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Brie C, de Wit PJ, Marco Y, 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*
- Bjarnsholt T, Givskov M** (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* **387**: 409-414
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR** (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396-403
- Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ, Van Gijsegem F** (1996) Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**: 681-683

- Boshou L** (2005) A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, Bacterial wilt disease development and the *Ralstonia solanacearum* species complex  
The american phytopathological society  
Minnesota, pp 225-239
- Boshou L, Xuanqiang L, Huifang J, Yong L, Zhihui S, Xinyou Z** (2005) Progress on genetic enhancement for resistance to groundnut bacterial wilt in China. In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, Bacterial wilt disease development and the *Ralstonia solanacearum* species complex. The american phytopathological society  
Minnesota, pp 239-247
- Boucher C, Genin S, Arlat M** (2001) [Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria]. C R Acad Sci III **324**: 915-922
- Bouchez O, Huard C, Lorrain S, Roby D, Balague C** (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant vad1. Plant Physiol **145**: 465-477
- Bozso Z, Maunoury N, Szatmari A, Mergaert P, Ott PG, L.R. Z, Szabo E, Kondorosi E, Klement Z** (2009) Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. Plant and Molecular Biology *in press*
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254
- Brito B, Aldon D, Barberis P, Boucher C, Genin S** (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. Mol Plant Microbe Interact **15**: 109-119
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP** (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. Annu Rev Phytopathol **44**: 393-416
- Brooks DM, Bender CL, Kunkel BN** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. mol Plant Pathol **6**: 629-639
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M** (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. Plant J **14**: 225-234
- Buttner D, Bonas U** (2002) Port of entry--the type III secretion translocon. Trends Microbiol **10**: 186-192
- Buttner D, Bonas U** (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. Curr Opin Microbiol **9**: 193-200
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P** (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. Theor Appl Genet **113**: 110-121
- Carney BF, Denny TP** (1990) A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level. J Bacteriol **172**: 4836-4843
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG** (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Reports **22**: 46-51
- Chague V, Danit LV, Siewers V, Schulze-Gronover C, Tudzynski P, Tudzynski B, Sharon A** (2006) Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: a missing link in ethylene regulation of fungus-plant interactions? Mol Plant Microbe Interact **19**: 33-42

- Chandran D, Sharopova N, Ivashuta S, Gantt JS, Vandenbosch KA, Samac DA** (2008) Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta* **228**: 151-166
- Chandran D, Sharopova N, VandenBosch KA, Garvin DF, Samac DA** (2008) Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **8**: 89
- Chen YY, Lin YM, Chao TC, Wang JF, Liu AC, Ho FI, Cheng CP** (2009) Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant*
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G** (2006) The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465-476
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500
- Cho HT, Cosgrove DJ** (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 3237-3253
- Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR** (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15289-15294
- Cianciotto NP** (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**: 581-588
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**: 95-101
- Cohn JR, Martin GB** (2005) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J* **44**: 139-154
- Colditz F, Braun HP, Jacquet C, Niehaus K, Krajinski F** (2005) Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches* tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* **59**: 387-406
- Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun HP, Krajinski F** (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology* **55**: 109-120
- Cook DR** (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 301-304
- Cook DR, Barlow E, Sequeira L** (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*. Detection of Restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response *Mol Plant Microbe Interact* **2**: 113-121
- Corbaz R** (1990) *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. PPUR presses polytechniques
- Cornelis GR, Van Gijsegem F** (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735-774
- Costa MA, Collins RE, Anterola AM, Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG** (2003) An *in silico* assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry* **64**: 1097-1112

- Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang ZY** (2006) Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* -transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* **223**: 1344-1354
- Cunnac S, Boucher C, Genin S** (2004) Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **186**: 2309-2318
- Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A** (2009) *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol* **12**: 53-60
- Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S** (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* **53**: 115-128
- Dangl JL, Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- Day B, Graham T** (2007) The plant host pathogen interface: cell wall and membrane dynamics of pathogen-induced responses. *Ann N Y Acad Sci* **1113**: 123-134
- de Wit PJ** (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2726-2732
- Deakin WJ, Broughton WJ** (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**: 312-320
- Deavours BE, Dixon RA** (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiol* **138**: 2245-2259
- Denny TP** (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 173-197
- Denny TP, Baek SR** (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 198-206
- Desender S, Andrivon D, Val F** (2007) Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cell Microbiol* **9**: 21-30
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, 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, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y** (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 2404-2409
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y** (1998) Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 659-667
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K** (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol* **9**: 435-445
- Desveaux D, Singer AU, Dangl JL** (2006) Type III effector proteins: doppelgangers of bacterial virulence. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 376-382
- Dettmer J, Elo A, Helariutta Y** (2009) Hormone interactions during vascular development. *Plant Mol Biol* **69**: 347-360

- Dhandaydham M, Charles L, Zhu H, Starr JL, Huguet T, Cook DR, Prosperi JM, Opperman C** (2008) Characterization of Root-Knot Nematode Resistance in *Medicago truncatula*. *J Nematol* **40**: 46-54
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang LJ** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**: 371-390
- Dixon RA, Lamb CJ, Masoud S, Sewalt VJ, Paiva NL** (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses--a review. *Gene* **179**: 61-71
- Djebali N** (2008) Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées: *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Université Paul Sabatier, école doctorale SEVAB, Toulouse
- djebali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathé C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Aouani ME, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B, Huguet T, Jacquet C** (2009) Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Mol Plant Microbe Interact* *in press*
- Dugardeyn J, Vandebussche F, Van Der Straeten D** (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *J Exp Bot* **59**: 1-16
- Ellwood SR, Kamphuis LG, Oliver RP** (2006) Identification of Sources of Resistance to *Phoma medicaginis* Isolates in *Medicago truncatula* SARDI Core Collection Accessions, and Multigene Differentiation of Isolates. *Phytopathology* **96**: 1330-1336
- Elphinstone JG, Aley P** (1993) Integrated control of bacterial wilt of potato in the warm tropics of peru. In GL Hartman, AC Hayward, eds, *Bacterial wilt: proceedings of an international symposium, Taiwan*, pp 276-283
- Enstone DE, Peterson CA, Fengshan M** (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function and responses to the environment. *journal of Plant Growth Regulation* **21**: 335-351
- Esquerre-Tugaye MT** (1979) Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions: I. A Structural Investigation of Cell Wall Hydroxyproline-rich Glycoproteins Which Accumulate in Fungus-infected Plants. *Plant Physiol* **64**: 314-319
- Esquerre-Tugaye MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touze A** (1979) Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions: II. Evidence for the Accumulation of Hydroxyproline-rich Glycoproteins in the Cell Wall of Diseased Plants as a Defense Mechanism. *Plant Physiol* **64**: 320-326
- Flavier AB, Ganova-Raeva LM, Schell MA, Denny TP** (1997) Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* **179**: 7089-7097
- Flor H** (1971) Current status of gene for gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **8**: 265-276
- Flores-Cruz Z, Allen C** (2009) *Ralstonia solanacearum* Encounters an Oxidative Environment During Tomato Infection. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 773-782
- Fowler JH, Narvaez-Vasquez J, Aromdee DN, Pautot V, Holzer FM, Walling LL** (2009) Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic Acid. *Plant Cell* **21**: 1239-1251
- Franks A, Mark-Byrne GL, Dow JM, O'Gara F** (2008) A putative RNA-binding protein has a role in virulence in *Ralstonia solanacearum* GMI1000. *Mol Plant Pathol* **9**: 67-72

- Frey P, Prior P, Marie C, Kotoujansky A, Trigalet-Demery D, Trigalet A** (1994) Hrp Mutants of *Pseudomonas solanacearum* as Potential Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3175-3181
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 280-300
- Galan JE, Wolf-Watz H** (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573
- Gao LL, Klingler JP, Anderson JP, Edwards OR, Singh KB** (2008) Characterization of pea aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **146**: 996-1009
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 711-724
- Garg RP, Huang J, Yindeeoungyeon W, Denny TP, Schell MA** (2000) Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **182**: 6659-6666
- Gaspers LD, Thomas AP** (2008) Calcium-dependent activation of mitochondrial metabolism in mammalian cells. *Methods* **46**: 224-232
- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B** (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol Plant Pathol* **8**: 539-548
- Genin S, Boucher C** (2002) *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Mol Plant Pathol* **3**: 111-118
- Genin S, Boucher C** (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 107-134
- Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y** (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J* **36**: 353-365
- Gohre V, Robatzek S** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189-215
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-284
- Gonzalez ET, Brown DG, Swanson JK, Allen C** (2007) Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3779-3786
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**: 872-877
- Grant MR, Jones JD** (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750-752
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL** (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449
- Greenberg JT, Yao N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 201-211
- Grimault V, Prior P, Anais G** (1995) A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Phytopathology* **143**: 349-352
- Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA** (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* **149**: 1017-1027

- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S, Boucher C** (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J Bacteriol* **189**: 377-387
- Guo X, Stotz HU** (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1384-1395
- Gupta V, Willits MG, Glazebrook J** (2000) *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 503-511
- Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, Ranall MV, Kettler G, Greenberg JT** (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**: 1722-1726
- Halim VA, Altmann S, Ellinger D, Eschen-Lippold L, Miersch O, Scheel D, Rosahl S** (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J* **57**: 230-242
- Halim VA, Eschen-Lippold L, Altmann S, Birschwilks M, Scheel D, Rosahl S** (2007) Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1346-1352
- Hammerschmidt R** (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology* **37**: 285-306
- Hammond-Kosack KE, Parker JE** (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177-193
- Hardham AR, Jones DA, Takemoto D** (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 342-348
- Hauck P, Thilmoney R, He SY** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8577-8582
- Hayward AC** (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**: 65-87
- He LY, Kang YW** (1986) Induced resistance to bacterial wilt of peanut by using avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* and fluorescent pseudomonads. *ACIAR bacterial wilt newsletter* **1**: 3
- He P, Chintamanani S, Chen Z, Zhu L, Kunkel BN, Alfano JR, Tang X, Zhou JM** (2004) Activation of a COII-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J* **37**: 589-602
- He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nurnberger T, Sheen J** (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**: 563-575
- He SY** (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 363-392
- He SY, Huang HC, Collmer A** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**: 1255-1266
- Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, van Kammen A, Bisseling T** (1997) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* **124**: 1781-1787
- Hernandez-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sanchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, Keller H, Barlet X, Sanchez-Rodriguez C, Anderson LK,**

- Somerville S, Marco Y, Molina A** (2007) Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**: 890-903
- Hirsch J, Deslandes L, Feng DX, Balague C, Marco Y** (2002) Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylen-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **92**: 1142-1147
- Hoefle C, Huckelhoven R** (2008) Enemy at the gates: traffic at the plant cell pathogen interface. *Cell Microbiol* **10**: 2400-2407
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB** (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol* **50**: 377-389
- Hotson A, Mudgett MB** (2004) Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 384-390
- Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* **3**: e2589
- Huang J, Carney BF, Denny TP, Weissinger AK, Schell MA** (1995) A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **177**: 1259-1267
- Huang JH, Schell MA** (1990) DNA sequence analysis of *pglA* and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **172**: 3879-3887
- Huang JS** (1986) Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu Rev Phytopathol* **24**: 141-157
- Hueck CJ** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433
- Ingham JL** (1982) A New Isoflavanone Phytoalexin from *Medicago rugosa*. *Planta Med* **45**: 46-47
- Iwama A, Yamashino T, Tanaka Y, Sakakibara H, Kakimoto T, Sato S, Kato T, Tabata S, Nagatani A, Mizuno T** (2007) AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **48**: 375-380
- Jamir Y, Guo M, Oh HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A, Alfano JR** (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* **37**: 554-565
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**: 387-405
- Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT** (2007) A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol* **17**: 499-508
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* **19**: 4004-4014
- Johnson TL, Abendroth J, Hol WG, Sandkvist M** (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 175-186
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kable EP, Kierner AK** (2005) Non-invasive live-cell measurement of changes in macrophage NAD(P)H by two-photon microscopy. *Immunol Lett* **96**: 33-38
- Kanda A, Ohnishi S, Tomiyama H, Hasegawa H, Yasukohchi M, Akinori K, Ohnishi K, Okuno T, Hikichi Y** (2003) Type III secretion machinery-deficient mutants of

- Ralstonia solanacearum* lose their ability to colonize resulting in loss of pathogenicity. Journal of general plant pathology **69**: 250-257
- Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP** (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Mol Microbiol **46**: 427-437
- Kangasjarvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. Plant Cell Environ **28**: 1021-1036
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. Embo J **6**: 3209-3212
- Kay S, Bonas U** (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Curr Opin Microbiol **12**: 37-43
- Keen NT** (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu Rev Genet **24**: 447-463
- Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, Mengiste T, Betsuyaku S, Parker JE, Mussig C, Thomma BP, Albrecht C, de Vries SC, Hirt H, Nurnberger T** (2007) The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. Curr Biol **17**: 1116-1122
- Kim KS, Min JY, Dickman MB** (2008) Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. Mol Plant Microbe Interact **21**: 605-612
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D** (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. Cell **121**: 749-759
- Kim YJ, Lin NC, Martin GB** (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. Cell **109**: 589-598
- Kjemtrup S, Nimchuk Z, Dangl JL** (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. Current Opinion in Microbiology **3**: 73-78
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF, Kunkel BN** (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. Plant J **26**: 509-522
- Koenig K, Krasieva TB, Bauer E, Fielder U, Berns M, Tromberg GJ, Greulich K-O** (1996) UVA-induced oxidative stress in single cells probed by autofluorescence modifications, cloning assay and comet assay. Proc SPIE **2628**
- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol **5**: 325-331
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI** (2006) The role of reactive oxygen species in hormonal responses. Plant Physiol **141**: 323-329
- Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, Grimsley N, 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
- Lee J, Klessig DF, Nurnberger T** (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. Plant Cell **13**: 1079-1093
- Lee J, Klusener B, Tsiamis G, Stevens C, Neyt C, Tampakaki AP, Panopoulos NJ, Noller J, Weiler EW, Cornelis GR, Mansfield JW, Nurnberger T** (2001) HrpZ(Psph)

- from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 289-294
- Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6750-6754
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RA, Ritsema T, Pieterse CM** (2009) Ethylene modulates the role of *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1* in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* **149**: 1797-1809
- Lepoivre P** (2003) *Phytopathologie*, Bruxelles
- Li HB, Zhou MX, Liu CJ** (2009) A major QTL conferring crown rot resistance in barley and its association with plant height. *Theor Appl Genet* **118**: 903-910
- Liang J, Wu WL, Liu ZH, Mei YJ, Cai RX, Shen P** (2007) Study the oxidative injury of yeast cells by NADH autofluorescence. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **67**: 355-359
- Lin YM, Chou IC, Wang JF, Ho FI, Chu YJ, Huang PC, Lu DK, Shen HL, Elbaz M, Huang SM, Cheng CP** (2008) Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1261-1270
- Loake GJ, Choudhary AD, Harrison MJ, Mavandad M, Lamb CJ, Dixon RA** (1991) Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *Plant Cell* **3**: 829-840
- Loh J, Pierson EA, Pierson LS, 3rd, Stacey G, Chatterjee A** (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 285-290
- Loria R, Coombs J, Yoshida M, Kers J, Bukhalid R** (2003) A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 65-72
- Love J, Bjorklund S, Vahala J, Hertzberg M, Kangasjarvi J, Sundberg B** (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5984-5989
- Lozano-Baena MD, Prats E, Moreno MT, Rubiales D, Perez-de-Luque A** (2007) *Medicago truncatula* as a model for nonhost resistance in legume-parasitic plant interactions. *Plant Physiol* **145**: 437-449
- Lund ST, Stall RE, Klee HJ** (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**: 371-382
- Ma W, Guttman DS** (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 412-419
- Marie C, Broughton WJ, Deakin WJ** (2001) *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 336-342
- Mayer AM, Staples RC, Gil-ad NL** (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**: 33-41
- Mazel A, Levine A** (2001) Induction of cell death in arabidopsis by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Radic Biol Med* **30**: 98-106
- McCann HC, Guttman DS** (2008) Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* **177**: 33-47
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 101-122

- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980
- Meyer D, Cunnac S, Gueneron M, Declercq C, Van Gijsegem F, Lauber E, Boucher C, Arlat M** (2006) PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol* **188**: 4903-4917
- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G** (1990) Secretion of Yop proteins by Yersiniae. *Infect Immun* **58**: 2840-2849
- Mino M, Murata N, Date S, Inoue M** (2007) Cell death in seedlings of the interspecific hybrid of *Nicotiana glauca* and *N. tabacum*; possible role of knob-like bodies formed on tonoplast in vacuolar-collapse-mediated cell death. *Plant Cell Rep* **26**: 407-419
- Mithofer A** (2002) Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends in Plant Science* **7**: 440-444
- Mitra RM, Shaw SL, Long SR** (2004) Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10217-10222
- Mole BM, Baltrus DA, Dangl JL, Grant SR** (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **15**: 363-371
- Monici M** (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 227-256
- Mudge J, Cannon SB, Kalo P, Oldroyd GE, Roe BA, Town CD, Young ND** (2005) Highly syntenic regions in the genomes of Soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **5**: 15
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768-785
- Mukaihara T, Tamura N, Murata Y, 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
- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM** (2001) Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hrp gene-dependent and hrp gene-independent mechanisms. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 785-792
- Nicholson RL, Hammerschmidt R** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **30**: 369-389
- Nieves-Brun C** (1985) Infection of roots of *Dieffenbachia maculata* by the foliar blight and soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathology* **34**: 139-145
- Niki T, Mitsuhashi L, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y** (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* **39**: 500-507
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BF, 3rd, Dangl JL** (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet* **37**: 579-609
- Nimchuk Z, Marois E, Kjemtrup S, Leister RT, Katagiri F, Dangl JL** (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**: 353-363
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumphill N, Jones J, He SY** (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**: 220-223
- Nomura K, Melotto M, He SY** (2005) Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 361-368

- Nyamsuren O** (2003) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 17-26
- Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C** (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 938-949
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **42**: 479-488
- Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR** (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835-1849
- Orth K** (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* **5**: 38-43
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE** (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**: 1594-1597
- Pan J, Zhu M, Chen H** (2001) Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. *Environ Exp Bot* **46**: 71-79
- Paulin JP, Ride M, Prunier JP** (2001) [Discovery of phytopathogenic bacteria 100 years ago: transatlantic controversies and polemics]. *C R Acad Sci III* **324**: 905-914
- Penmetza RV, Cook DR** (1997) A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* **275**: 527-530
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Mettraux JP, Broekaert WF** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 2103-2113
- Perez-de-Luque A, Gonzalez-Verdejo CI, Lozano MD, Dita MA, Cubero JI, Gonzalez-Melendi P, Risueno MC, Rubiales D** (2006) Protein cross-linking, peroxidase and beta-1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. *J Exp Bot* **57**: 1461-1469
- Perez-de-Luque A, Lozano MD, Maldonado AM, Jorriin JV, Dita MA, Roman B, Rubiales D** (2007) *Medicago truncatula* handbook - Root parasitic plants and legumes,
- Pérez-de-Luque A, Lozano MD, Moreno MT, Testillano PS, Rubiales D** (2007) Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. *Annals of Applied Biology* **151**: 89-98
- Perrin DR, Bottomley W** (1961) Pisatin: an antifungal substance from *Pisum sativum* L. *Nature* **191**: 76-77
- Pilet-Nayel ML, Prosperi JM, Hamon C, Lesne A, Lecointe R, Le Goff I, Herve M, Deniot G, Delalande M, Huguet T, Jacquet C, Baranger A** (2009) *AER1*, a Major Gene Conferring Resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Phytopathology* **99**: 203-208
- Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, van den Elzen PJ, Melchers LS, Cornelissen BJ** (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* **104**: 109-118
- Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel AC, Boucher C, Genin S** (2009) Two Type III Secretion System Effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 Determine Host-Range Specificity on Tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 538-550

- Poueymiro M, Genin S** (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* **12**: 44-52
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A** (2000) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* **146 ( Pt 7)**: 1679-1692
- Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J** (1999) Genetic diversity of african and worldwide strains of *ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hrp gene region. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2184-2194
- Pre M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147**: 1347-1357
- Prentki P, Krisch HM** (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313
- Prior P** (2003) Informations nécessaires à l'Analyse du risque phytosanitaire de *Ralstonia solanacearum* race 2 pour les zones Antilles, Guyane, Réunion. *Analyse du risque phytosanitaire- INRA juillet*: 1-31
- Prior P, Fegan M** (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum*" species complex? In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. the american phytopathological society, Minnesota
- Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, Kufner I, Engelhardt S, Gust AA, Luberacki B, Seitz HU, Stahl D, Rauhut T, Glawischnig E, Schween G, Lacombe B, Watanabe N, Lam E, Schlichting R, Scheel D, Nau K, Dodt G, Hubert D, Gijzen M, Nurnberger T** (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**: 3721-3744
- Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S** (2002) Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiol* **130**: 1908-1917
- Ramu SK, Peng HM, Cook DR** (2002) Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 522-528
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD** (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 372-379
- Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, Fortnum BA, Kluepfel DA** (2004) Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1376-1384
- Roden J, Eardley L, Hotson A, Cao Y, Mudgett MB** (2004) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 633-643
- Romantschuk MR, Taira S** (2001) hrp pilus: reaching the plant cell wall. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 153-160
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, Martin GB** (2007) A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**: 370-374
- Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y** (2007) New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol* **9**: 1902-1908
- Saddler GS** (2005) Management of bacterial wilt disease. In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. The American Phytopathological Society, St-Paul, Minnesota

- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, 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, Boucher CA** (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497-502
- Samadi L, Shahsavan Behboodi B** (2006) Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Planta* **225**: 223-234
- Sanabria N, Goring D, Nurnberger T, Dubery I** (2008) Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol* **178**: 503-514
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A** (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 86-89
- Schell MA** (2000) Control of Virulence and Pathogenicity Genes of *Ralstonia Solanacearum* by an Elaborate Sensory Network. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 263-292
- Schuchmann S, Kovacs R, Kann O, Heinemann U, Buchheim K** (2001) Monitoring NAD(P)H autofluorescence to assess mitochondrial metabolic functions in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Brain Res Brain Res Protoc* **7**: 267-276
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* **46**: 941-950
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RA** (2008) Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell* **20**: 1169-1183
- Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA** (2003) Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* **64**: 153-161
- Shao F, Golstein C, Ade J, Stoutemyer M, Dixon JE, Innes RW** (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**: 1230-1233
- Shaw SL, Long SR** (2003) Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiology* **132**: 2196-2204
- Simard M, Rioux D, Laflamme G** (2001) Formation of Ligno-Suberized Tissues in Jack Pine Resistant to the European Race of *Gremmeniella abietina*. *Phytopathology* **91**: 1128-1140
- Simonich MT, Innes RW** (1995) A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 637-640
- Smith JJ, Murimi ZK, Offord LC, Clayton S, Mienie N, Gouws NR, Priou S, Olanya M, Simons S, Saddler GS** (2005) Processes in the development of a biocontrol agent against bacterial wilt. In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, Bacterial wilt disease development and the *Ralstonia solanacearum* species complex, Vol ed. The American phytopathological society, Minnesota, pp 61-73
- Soto MJ, Dominguez-Ferreras A, Perez-Mendoza D, Sanjuan J, Olivares J** (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**: 381-388
- Soto MJ, Sanjuan J, Olivares J** (2006) Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**: 3167-3174
- Spletzer ME, Enyedi AJ** (1999) Salicylic Acid Induces Resistance to *Alternaria solani* in Hydroponically Grown Tomato. *Phytopathology* **89**: 722-727

- Spoel SH, Dong X** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* **3**: 348-351
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Mettraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770
- Staal J, Dixelus C** (2009) Plant innate immunity. In JW Sons, ed, *Encyclopedia of life science*, Chichester, pp 1-9
- Stavrinos J, McCann HC, Guttman DS** (2008) Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell Microbiol* **10**: 285-292
- Steffens B, Sauter M** (2005) Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* **139**: 713-721
- Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM** (2005) A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2230-2242
- Strecker T, Maisa A, Daffis S, Eichler R, Lenz O, Garten W** (2006) The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virology* **3**: 93
- Stulemeijer IJ, Joosten MH** (2008) Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 545-560
- Sun P, Tian QY, Zhao MG, Dai XY, Huang JH, Li LH, Zhang WH** (2007) Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **48**: 1229-1235
- Sundin GW** (2007) Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 129-151
- Swiderski MR, Innes RW** (2001) The *Arabidopsis PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J* **26**: 101-112
- Tamas L, Budikova S, Huttova J, Mistrik I, Simonovicova M, Siroka B** (2005) Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. *Plant Cell Rep* **24**: 189-194
- Tampakaki AP, Fadoulglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M** (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ** (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPsph produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1366-1374
- Tans-Kersten J, Brown D, Allen C** (2004) Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 686-695
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C** (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* **183**: 3597-3605
- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD** (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 637-648
- Thevissen K, Terras FR, Broekaert WF** (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5451-5458
- Thomas NA, Finlay BB** (2004) Pathogens: bacterial needles ruled to length and specificity. *Curr Biol* **14**: R192-194

- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF** (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**: 1093-1102
- Thomma BP, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**: 163-171
- Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ** (2006) Annual Medicago: from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Ann Bot (Lond)* **98**: 1117-1128
- Torregrosa C, Cluzet S, Fournier J, Huguet T, Gamas P, Prosperi JM, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B, Jacquet C** (2004) Cytological, genetic, and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 909-920
- Trigalet A, Demery D** (1986) Invasiveness in tomato plants of Tn5-induced avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **28**: 423-430
- Trigalet A, Trigalet-Demery D** (1990) Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**: 27-38
- Tsai FW, Hsu SH, Chen LC** (1985) Bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas syringae* and their effect on development of bacterial wilt of tomato. *plant protection bulletin (taiwan)* **27**: 267-278
- Tuffi Santos LD, Sant'Anna-Santos BF, Meira RM, Ferreira FA, Tiburcio RA, Machado AF** (2009) Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. *Braz J Biol* **69**: 129-136
- Turner M, Jauneau A, Genin S, Tavella MJ, Vaillau F, Gentzbittel L, Jardinaud MF** (2009) Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development *Plant Physiol* **150**: 1713-1722
- Underwood W, Melotto M, He SY** (2007) Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol* **9**: 1621-1629
- Vaillau F, Sartorel E, Jardinaud MF, Chardon F, Genin S, Huguet T, Gentzbittel L, Petitprez M** (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 159-167
- Valls M, Genin S, Boucher C** (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog* **2**: e82
- Van Breusegem F, Dat JF** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* **141**: 384-390
- Van der Biezen EA, Jones JD** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456
- Van der Hoorn RA, Kamoun S** (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**: 2009-2017
- Van Gijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, Barberis P, German S, Castello P, Boucher C** (1995) The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* **15**: 1095-1114

- Van Gijsegem F, Vasse J, Camus JC, Marena M, Boucher C** (2000) *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol Microbiol* **36**: 249-260
- Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ** (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **11**: 184-191
- Van Spronsen PC, Tak T, Rood AM, van Brussel AA, Kijne JW, Boot KJ** (2003) Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 83-91
- Vasse J** (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* **4**: 555-566
- Vasse J, Danoun S, Trigalet A** (2005) Microscopic studies of root infection in resistant Tomato cultivar Hawaii7996. In C Allen, P Prior, AC Hayward, eds, Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. The American Phytopathological Society, St-Paul, Minnesota
- Vasse J, Frey P, Trigalet A** (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 241-251
- Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B** (2000) The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 259-267
- Venisse JS, Gullner G, Brisset MN** (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* **125**: 2164-2172
- Venisse JS, Malnoy M, Faize M, Paulin JP, Brisset MN** (2002) Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1204-1212
- Vivader AK, Lambrecht PA** (2004) Bacteria as plant pathogens. In,
- Vivian A, Murillo J, Jackson RW** (2001) The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology* **147**: 763-780
- Volgger M, Lang I, Ovecka M, Lichtscheidl I** (2009) Plasmolysis and cell wall deposition in wheat root hairs under osmotic stress. *Protoplasma*
- Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL** (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455-482
- Wallwork H, Butt M, Cheong JPE, Williams KJ** (2004) Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants. *Aust Plant Pathol* **33**: 1-7
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley NH** (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 6-13
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85-88
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P** (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6790-6801
- Wroblewski T, Caldwell KS, Piskurewicz U, Cavanaugh KA, Xu H, Kozik A, Ochoa O, McHale LK, Lahre K, Jelenska J, Castillo JA, Blumenthal D, Vinatzer BA, Greenberg JT, Michelmore RW** (2009) Comparative large-scale analysis of

- interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. *Plant Physiol*
- Wubben MJ, Jin J, Baum TJ** (2008) Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent pathogenesis-related gene expression in roots. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 424-432
- Wydra K, Beri H** (2006) Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *R. solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 41-50
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou JM** (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74-80
- Xing W, Zou Y, Liu Q, Liu J, Luo X, Huang Q, Chen S, Zhu L, Bi R, Hao Q, Wu JW, Zhou JM, Chai J** (2007) The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature* **449**: 243-247
- Xu Y, Chang P, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA** (1994) Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **6**: 1077-1085
- Yang B, White FF** (2004) Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1192-1200
- Yang B, Zhu W, Johnson LB, White FF** (2000) The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9807-9812
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X** (2007) AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *J Biol Chem* **282**: 18116-18128
- Yao J, Allen C** (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **188**: 3697-3708
- Yap MN, Rojas CM, Yang CH, Charkowski AO** (2006) Harpin mediates cell aggregation in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **188**: 2280-2284
- Young ND** (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* **34**: 479-501
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **137**: 1174-1181
- Young ND, Udvardi M** (2009) Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 193-201
- Zhang N, Hasenstein KH** (1999) Initiation and elongation of lateral roots in *Lactuca sativa*. *Int J Plant Sci* **160**: 511-519
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* **23**: 283-333
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA** (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* **36**: 485-499
- Zhou JM, Chai J** (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* **11**: 179-185
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC** (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**: 3885-3895

- Zipfel C, Rathjen JP** (2008) Plant immunity: AvrPto targets the frontline. *Curr Biol* **18**: R218-220
- Zolobowska L, Van Gijsegem F** (2006) Induction of lateral root structure formation on petunia roots: A novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in *hrp* mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 597-606
- Zong N, Xiang T, Zou Y, Chai J, Zhou JM** (2008) Blocking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Plant Signal Behav* **3**: 583-585

# RESUME

Nous présentons l'étude de l'interaction entre la bactérie pathogène racinaire *Ralstonia solanacearum* et la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Un pathosystème avec les lignées A17 et F83005.5, respectivement sensible et résistante à la souche GMI1000, a été mis en place avec une procédure d'inoculation sur racine intacte. Ce dispositif expérimental nous a permis de suivre le processus infectieux, de la pénétration de la bactérie par l'extrémité racinaire au développement des symptômes foliaires. L'analyse des étapes précoces de l'interaction a permis de décrire l'apparition de symptômes racinaires qui se mettent en place rapidement après l'infection, que les lignées soient résistantes ou sensibles à la bactérie. Un arrêt de croissance de la racine s'observe dès 24 heures post-inoculation, ainsi qu'une mortalité de l'épiderme de l'extrémité racinaire. Ces phénotypes sont notés suite à des inoculations avec de faibles concentrations bactériennes, et ce sur plusieurs espèces hôtes ou non-hôtes testées. La mise en place des symptômes racinaires est dépendante de l'appareil de sécrétion de type III. Un crible de mutants d'effecteurs de type III de la souche GMI1000, basé sur l'apparition des symptômes racinaires, a permis de montrer que des pools différents d'effecteurs interviennent dans ce phénotype chez les lignées A17 et F83005.5. Chez la lignée sensible A17, deux effecteurs sont principalement impliqués, Gala7 et AvrA. L'étude de la colonisation de cette lignée a montré que le mutant *gala7* ne pénètre pas la plante et n'induit pas de symptômes de flétrissement. Le mutant *avrA* s'est révélé capable d'induire la maladie chez la lignée A17, mais de manière nettement réduite par rapport à la souche sauvage. L'analyse des extrémités racinaires des lignées sensible et résistante infectées par la souche GMI1000 a révélé qu'au niveau des parois de l'endoderme, la présence de lignine est induite de manière plus précoce chez la lignée résistante. Des phénomènes de divisions cellulaires ont été identifiés autour du cylindre central et semblent également liés à une restriction de la propagation bactérienne. Au niveau du contenu cellulaire, une autofluorescence et une production de ROS semblent liées à une phase nécrotrophe de la bactérie lors de sa propagation dans la zone corticale de l'extrémité racinaire. L'étude de la colonisation bactérienne en s'affranchissant de l'étape de pénétration a révélé que des mécanismes de résistance peuvent intervenir au niveau de collet chez la lignée F83005.5 et lors de la colonisation racinaire des vaisseaux conducteurs suite à une inoculation avec le mutant *gala7*.