



HAL
open science

Interaction entre des mutants hrp d'Erwinia amylovora, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité

Sophie Cesbron

► To cite this version:

Sophie Cesbron. Interaction entre des mutants hrp d'Erwinia amylovora, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. Biologie végétale. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00455109

HAL Id: tel-00455109

<https://theses.hal.science/tel-00455109>

Submitted on 9 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*,
agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante
hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement
le 22 janvier 2009
à Angers

par **Sophie Delaunay-Cesbron**

devant le jury ci-dessous :

Fabienne Baillieul (Rapporteur), Professeur, Université de Reims
Nicole Orange (Rapporteur), Professeur, Université de Rouen
Florence Val (Examinateur), Maître de Conférence, Agrocampus Ouest Rennes
Bruno Lapied (Examinateur), Professeur, Université d'Angers
Michel Tharaud (Examinateur), Maître de Conférence, Agrocampus Ouest, Angers
Jean-Pierre Paulin (Directeur de thèse), Directeur de Recherches, INRA, Angers

UMR 077 Pathologie Végétale INRA-Agrocampus Ouest-Université d'Angers
42 rue Georges Morel, BP60057, 49071 Beaucouzé cedex

REMERCIEMENTS

Je remercie Fabienne Baillieul et Nicole Orange qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire mon mémoire et de participer à ma soutenance en tant que rapporteurs. Merci également à Florence Val et Bruno Lapied d'avoir accepté le rôle d'examineur.

Mes remerciements vont également à l'équipe GEFIN de l'UMR PaVé qui m'a soutenue tout au long de ces années de thèse. Je remercie tout d'abord infiniment Marie-Noëlle Brisset et Jean-Pierre Paulin, qui m'ont permis d'entreprendre cette formation dans leur laboratoire. Vous m'avez donné l'envie d'entreprendre une thèse et c'est grâce à vous si j'ai pu aller jusqu'au bout ! Je vous suis très reconnaissante pour toute l'aide, les encouragements et les conseils que vous m'avez donnés dans mon travail d'expérimentation ainsi que lors de la rédaction de ce document. J'ai énormément apprécié la liberté que vous m'avez laissée dans la réalisation de ce projet professionnel, ainsi que les aménagements dont j'ai pu bénéficier dans mes fonctions au laboratoire, afin que tout se déroule pour le mieux. Un grand merci également à Michel Tharaud qui a toujours été disponible et attentif pour suivre mon travail de thèse. Merci pour ton soutien et ta rigueur lors de la rédaction du mémoire.

Je tiens à remercier également Patton (Christelle Heintz) et Roland Chartier pour l'aide technique qu'ils m'ont souvent apportée, à chaque fois dans la bonne humeur et la convivialité. Mon implication dans une thèse n'a pas été sans conséquence sur la répartition des tâches collectives pour l'équipe et je vous remercie d'avoir pris le relais, quand j'étais moins disponible.

J'ai également beaucoup apprécié la coopération et les compétences (notamment en qPCR et en informatique) d'Isabelle Pontais et de Thomas Dugé de Bernonville, les deux étudiants en thèse avec qui ça a été un plaisir de travailler, et je les en remercie. Je vous souhaite bonne chance pour la suite...

Merci également à Nadège Macquaire qui m'a donné un bon coup de pouce pour le cDNA-AFLP. Merci aux stagiaires qui ont accepté de travailler avec moi : Renaud, Mathieu, Hélène et Julien. Leur aide m'a été très précieuse.

Je suis également très reconnaissante à Marie-Anne Barny pour l'accueil qu'elle m'a réservé dans son labo et les excellents conseils en biologie moléculaire qu'elle m'a donné en début de thèse. Merci également pour les mutants que tu nous as fournis et qui ont été utilisés dans ce travail.

Le travail de microscopie électronique a été réalisé au Service Commun de Microscopie Electronique d'Angers. Je remercie Robert Filmon de m'avoir accueillie dans son service et de m'avoir très gentiment aidée pour la mise au point de la méthode.

Je tiens à remercier également le service de la formation permanente de l'INRA, représenté notamment par Jean-Luc Gaignard et Christine Templier, pour la coopération et le soutien apportés dans la réalisation de ce projet professionnel.

Enfin je remercie tous mes collègues de l'unité pour leur aide de près ou de loin dans la réalisation de ce projet professionnel. Merci à Elisabeth Dineau pour la gestion des profils bibliographiques et Elisabeth de Loménie pour leur professionnalisme et leur gentillesse.

Merci également à Paul Horeau, Joël Besnard et Sylvain Hanteville pour la qualité du matériel végétal fourni, Jacqueline Gaudin pour les milieux de culture et le reste...

Enfin, je remercie mes proches qui m'ont aidée à en arriver là : mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études ; mon époux, qui a eu énormément de patience pendant ces dernières années et qui a été d'un grand soutien moral ; et mes enfants qui m'ont souvent demandé, quand ils me voyaient travailler, si j'avais bientôt fini...

ABREVIATIONS

ABA	acide abscissique	JA	acide jasmonique
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	JAR	jasmonic acid resistant
ACCS	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	α -LeA	l'acide α -linoléique
ACCO	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	LOX	lipoxygénases
AFLP	amplified fragment length polymorphism	LPS	lipopolysaccharide
AI	autoinducer	MAMP	microbe-associated molecular pattern
<i>ams</i>	amylovoran synthesis	MCP	methyl-accepting chemotaxis proteins
AOC	l'allène oxyde cyclase	MeJA	methyljasmonate
AOS	l'allène oxyde synthase	MES	morpholinoethanesulfonic acid
Avr	avirulence	NB-LRR	nucleotide binding-leucine rich repeat
BET	bromure d'éthidium	OMP	outer membrane proteins
CC	coiled-coiled	ONP	ortho-nitro-phénol
CHS	Chalcone Synthase	ONPG	ortho-nitro-phényl- β -D-galactopyranoside
COI	coronatine insensitive	ORF	open reading frame
CSP	cold shock proteins	12-oxo-PDA	acide 12-oxo-phytodienoïque
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide	pad	phytoalexin deficient
CTR	constitutive triple response	PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
def	défensine	PAI	flot de pathogénicité
DFR	dihydroflavonol reductase	PAL	phenylammonia lyase
ECF	extracytoplasmic function	PAMP	pathogen-associated molecular pattern
EDS	enhanced disease susceptibility	PBS	phosphate saline buffer
EDTA	ethylenediaminetetracetic acid	PFGE	pulse field gel electrophoresis
EF-Tu	elongation factor Tu	PGIP	polygalacturonase-inhibiting proteins
EIN	ethylene insensitive	POD	peroxydase
EPS)	exopolysaccharide	PR	pathogenesis-related
ERF1	ethylene response factor	ProCa	prohexadione-calcium
ERS	ethylene response sensors	RAPD	random amplified polymorphic DNA
ET	éthylène	PRR	pattern recognition receptor
ETR	ethylene response	RLP	receptor-like proteins
FLS	flavonol synthase	RLK	receptor-like kinases
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside	SA	acide salicylique
<i>gapdh</i>	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	SAM	S-adénosylméthionine
GSP	general secretion pathway	SAR	systemic acquired resistance
HAE	<i>hrp</i> -associated enzymes	SDS	sodium dodecyl sulfate
HAP	hook associated protein	sid	salicylic acid induction deficient
HEE	<i>hrp</i> effectors and elicitors	SNP	single polymorphism nucleotide
HR	hypersensibilité	TBE	tris borate EDTA
Hrc	hypersensitive reaction and conserved	TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
<i>hrp-dsp</i>	hypersensitive reaction and pathogenicity- disease specific	TIR	toll-interleukin-1 recepteur
IPTG	isopropyl β -D-thioglucoopyranoside	TLR	toll-like receptors
IR	induced resistance	TPR	tetratricopeptide repeat domain
ISR	induced systemic resistance	T3SS	systèmes de sécrétion de type III
IT	flot de transfert		

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. LE FEU BACTERIEN ET <i>ERWINIA AMYLOVORA</i>	2
1.1 LA MALADIE	2
1.1.1 Cycle de la maladie	2
1.1.2 Lutte contre le feu bactérien	3
1.1.2.1 Lutte chimique	3
1.1.2.2 Lutte biologique	4
1.1.2.3 Lutte génétique	4
1.1.2.4 Stimulation des défenses naturelles de l’hôte	5
1.2 L’AGENT PATHOGENE <i>ERWINIA AMYLOVORA</i>	5
1.2.1 Caractères microbiologiques	5
1.2.2 Diversité génétique et gamme d’hôte	5
1.2.3 Composants de surface cellulaires et extracellulaires : LPS, EPS, flagelles	6
1.2.4 Les facteurs du pouvoir pathogène	7
2. LES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE III CHEZ LES BACTERIES	8
2.1 LE SYSTEME FLAGELLAIRE : CAS DES ENTEROBACTERIES	8
2.1.1 Structure du flagelle	9
2.1.2 Organisation des gènes flagellaires	10
2.1.3 Assemblage du flagelle et sécrétion	10
2.2 LE SYSTEME <i>HRP</i> CHEZ LES BACTERIES PHYTOPATHOGENES : CAS DU GROUPE I	11
2.2.1 Architecture et assemblage du système Hrp	12
2.2.2 L’îlot de pathogénicité d’ <i>E. amylovora</i>	13
2.2.3 Les effecteurs de type III chez <i>E. amylovora</i>	14
2.3 CONNECTIONS ENTRE LE SYSTEME DE SECRETION LIE A LA VIRULENCE ET LE SYSTEME FLAGELLAIRE	15
3. MECANISMES DE L’INTERACTION PLANTE-BACTERIE CONDUISANT A LA COMPATIBILITE	16
3.1 LA RESISTANCE DES PLANTES	16
3.1.1 La résistance non spécifique, liée aux MAMPs	17
3.1.1.1 Les MAMPs de bactéries à Gram négatif	17
3.1.1.1.1 Le LPS	17
3.1.1.1.2 La flagelline	18
3.1.1.1.3 Autres MAMPs	19
3.1.1.2 Les récepteurs des MAMPs	19
3.1.2 La résistance spécifique liée à une interaction de type R/Avr	20
3.1.2.1 Les effecteurs produits par les gènes d’avorulence (effecteurs Avr)	20
3.1.2.2 Les récepteurs des effecteurs de type Avr	21
3.1.3 Les réactions de défense	21
3.1.3.1 La voie de l’acide salicylique	22
3.1.3.2 La voie de l’acide jasmonique	22
3.1.3.3 La voie de l’éthylène	22
3.2 MECANISMES DE LA SUPPRESSION DE LA RESISTANCE CONDUISANT A LA COMPATIBILITE	23
3.2.1 Evasion de la reconnaissance non spécifique	23
3.2.2 Evasion de la reconnaissance spécifique	23
3.2.3 Répression des réactions de défense	24

3.3 CAS D'ERWINIA AMYLOVORA	24
4. MODULATION DE L'INTERACTION ERWINIA/ POMMIER PAR DES MUTANTS HRP ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	25
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	27
1. MATERIEL	27
1.1 MATERIEL BIOLOGIQUE	27
1.1.1 Matériel végétal	27
1.1.2 Matériel bactérien	27
1.2 MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS	27
2. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES ET BIOTESTS BACTERIE/PLANTE	27
2.1 PREPARATION ET DENOMBREMENT DES INOCULA	27
2.2 TEST DE MOBILITE BACTERIENNE	28
2.3 TEST DE FORMATION D'AGREGATS	28
2.4 INOCULATION DES PLANTES	28
2.4.1 Inoculation	28
2.4.1.1 Co-inoculation : dépôt de goutte sur blessure	28
2.4.1.2 Co-inoculation : pulvérisation	28
2.4.1.3 Inoculation séquencée : infiltration sous vide puis dépôt de goutte sur blessure	28
2.4.2 Notation des symptômes	29
2.4.3 Mesure des fuites d'électrolytes	29
3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE	29
3.1 EXTRACTION DES PROTEINES FLAGELLAIRES	29
3.2 DOSAGE DES PROTEINES	29
3.3 ELECTROPHORESE	30
3.4 PREPARATION D'UN SERUM POLYCLONAL ANTI-FLAGELLINE	30
3.5 TRANSFERT SUR MEMBRANE ET REVELATION DES PROTEINES TRANSFEREES	30
3.6 DOSAGE DE L'ACTIVITE β-GALACTOSIDASE D'E. AMYLOVORA EN CULTURE LIQUIDE	31
4. TECHNIQUE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	32
5. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	32
5.1 LOCALISATION DU SITE D'INSERTION DU PROPHAGE MU DANS LE CHROMOSOME DU MUTANT FB2208	32
5.1.1 Extraction d'ADN génomique d' <i>E. amylovora</i>	32
5.1.2 Digestion et transformation de l'ADN génomique	32
5.2 MUTAGENESE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE	33
5.3 EXTRACTION DES ARN TOTAUX	33
5.3.1 Extraction des ARN totaux de plantules	33
5.3.2 Extraction des ARN totaux de bactéries	34
5.4 REVERSE TRANSCRIPTION DES ARN	34
5.4.1 Réverse transcription des ARN de plantules	34
5.4.2 Réverse transcription des ARN de bactéries	34
5.5 AFLP A PARTIR D'ADNc DE BACTERIES	35
5.5.1 Synthèse de l'ADNc double brin	35
5.5.2 Restriction	35
5.5.3 Ligation	35
5.5.4 Amplification	35
5.5.5 Electrophorèse sur gel d'acrylamide et révélation au nitrate d'argent	35
5.5.6 Préparation des bactéries compétentes et clonage	36
5.5.6.1 Préparation des bactéries compétentes	36

5.5.6.2 Clonage	36
5.6 EXPRESSION DES CANDIDATS AFLP SELECTIONNES	37
5.7 DESSIN D'AMORCES POUR LES PCR	37
5.8 AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR QUANTITATIVE (qPCR)	37
6. ANALYSE DE DONNEES	38
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	39
1 MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DE LA PROTECTION ET ANALYSE DU PARTENAIRE PLANTE	39
1.1 COMPARAISON DE DIFFERENTS BIOTESTS	39
1.2 RECHERCHE DE GENES DE DEFENSE INDUITS CHEZ LA PLANTE	40
1.2.1 Analyse de variance	40
1.2.2 Analyse en composantes principales (ACP)	41
1.3 ETUDE DE LA DUREE DE LA PROTECTION	41
1.4 DISCUSSION	42
2 ANALYSE DU PARTENAIRE BACTERIEN	44
2.1 RECHERCHE D'UN EFFET ANTAGONISTE DIRECT ENTRE LES 2 PARTENAIRES BACTERIENS	44
2.1.1 Dynamique des populations en coculture	45
2.1.2 Interaction physique entre les cellules	45
2.1.3 Expression des gènes <i>hrp</i> de la souche sauvage seule ou en mélange avec le mutant <i>hrp</i> protecteur	45
2.2 ACTIVITE METABOLIQUE DES MUTANTS DANS LA PROTECTION	46
2.2.1 Absence de protection par des bactéries tuées à la chaleur	46
2.2.2 Absence de protection en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique	46
2.3 LOCALISATION EXTRACELLULAIRE DE FACTEURS A L'ORIGINE DE LA PROTECTION CHEZ LES MUTANTS	46
2.4 RECHERCHE DE GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES ENTRE SOUCHE SAUVAGE ET MUTANTS DE REGULATION	47
2.4.1 Mise au point de l'extraction des ARN totaux bactériens	47
2.4.2 Recherche avec <i>a priori</i> : gènes liés à des fonctions extracellulaires, au chimiotactisme ou au quorum sensing	48
2.4.2.1 Expression de gènes liés à des fonctions extracellulaires	48
2.4.2.2 Expression de 3 gènes impliqués dans le chimiotactisme	49
2.4.2.3 Expression de 3 gènes impliqués dans le quorum sensing	49
2.4.3 Recherche sans <i>a priori</i> par le cDNA-AFLP	50
2.4.3.1 Optimisation de la technique de cDNA-AFLP	50
2.4.3.2 Analyse des séquences	50
2.4.3.3 Mesure de l'expression quantitative de quelques gènes mis en évidence par le cDNA-AFLP	51
2.4.3.3.1 Comparaison de l'expression de quelques gènes entre la souche sauvage et ses différents mutants en milieu <i>hrp</i> -inducteur	51
2.4.3.3.2 Comparaison de l'expression de quelques gènes chez la souche sauvage cultivée en milieu <i>hrp</i> - ou non <i>hrp</i> - inducteur	51
2.5 DISCUSSION	52
3 CAS PARTICULIER DU (DES) SYSTEME(S) FLAGELLAIRE(S) D'ERWINIA AMYLOVORA	57
3.1 REGULATION NEGATIVE EXERCEE PAR HrpL SUR LE SYSTEME FLAGELLAIRE	57
3.2 ROLE DE LA FLAGELLINE DANS LA PROTECTION	58
3.3 RECHERCHE <i>IN SILICO</i> DES GENES FLAGELLAIRES D'<i>E. AMYLOVORA</i>	58
3.3.1 Mise en évidence des deux systèmes Flag-1 et Flag-2	58
3.3.2 Répartition de Flag-1 et Flag-2 chez différentes espèces d' <i>Erwinia</i>	60
3.4 ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES PRESENTS DANS LES CLUSTERS DES 2 SYSTEMES EN MILIEU HRP-INDUCTEUR CHEZ LES DIFFERENTS MUTANTS	60

3.5 DISCUSSION	61
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68
LISTE DES COMMUNICATIONS	83

AVANT-PROPOS

Le Feu bactérien, dû à *Erwinia amylovora*, est une maladie qui affecte les Maloïdées (sous-famille des Rosacées) comprenant les arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier...) et des arbustes d'ornement (aubépine, *Pyracantha*, amélanchier...). C'est une maladie sporadique qui peut provoquer des dommages considérables, car elle est nécrogène et évolue très rapidement. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et qu'une attaque de feu bactérien peut avoir des répercussions sur plusieurs années. Il est probable que cet impact économique soit croissant, en effet la maladie est en constante progression dans le monde et il n'existe pas de moyen de lutte chimique facile à employer contre le feu bactérien. D'importantes zones de production comme l'Asie, et en particulier la Chine, premier producteur mondial, ainsi que l'Amérique du Sud sont pour l'instant épargnées.

Beaucoup de connaissances sont réunies sur cette maladie au niveau de l'épidémiologie et du comportement des génotypes hôtes. Les bases moléculaires de la spécificité d'hôte sont cependant moins connues. L'agent pathogène est également bien caractérisé : on connaît les facteurs du pouvoir pathogène, et les caractères génétiques et phénotypiques des souches sont bien décrits. Il reste cependant de nombreuses interrogations concernant l'évolution des systèmes de sécrétion, sur leur régulation spatio-temporelle et sur la fonction des protéines sécrétées par ces systèmes.

Une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires conduisant à la maladie ou au contraire à la résistance des plantes hôtes, pourrait permettre d'envisager de nouvelles méthodes de lutte, que ce soit en lutte par stimulation des défenses naturelles des plantes ou en lutte génétique (obtention de variétés résistantes). C'est le thème du programme de recherche engagé par l'équipe GEFIN (génomique fonctionnelle de l'interaction) de l'UMR pathologie végétale INRA/Agrocampus Ouest/Université d'Angers, en collaboration avec le laboratoire de Pathologie Végétale et Moléculaire d'AgroParisTech et l'UMR Génétique et Horticulture de l'INRA d'Angers. C'est dans ce cadre que se situe mon travail de thèse.

Tableau I.1 : Principaux pays producteurs de pommes en 2007 (source : <http://faostat.fao.org/>)

Pays	Production annuelle en milliers de tonnes
Chine	27500
Etats-Unis	4237
Iran	2660
Turquie	2266
Italie	2072
Inde	2001
France	1800
Chili	1390
Argentine	1300
Brésil	1093
Pologne	1039
Allemagne	911
Monde	64248

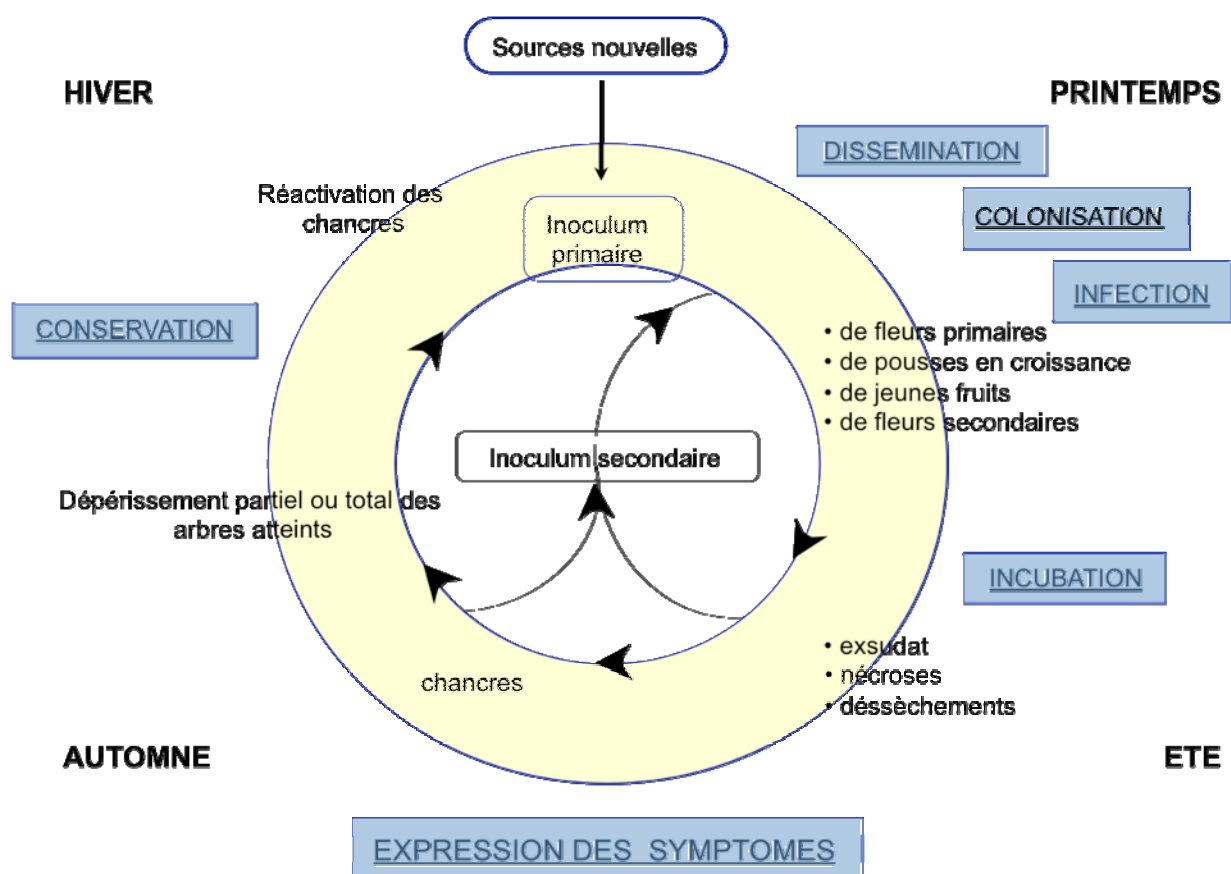


Figure 1.1 : Cycle du feu bactérien des Maloïdées, causé par la bactérie *Erwinia amylovora* (d'après Paulin, 1996).

CHAPITRE 1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique se divise en quatre parties. La première décrit la maladie : le feu bactérien, et son agent pathogène : la bactérie *Erwinia amylovora*. Cette bactérie possède plusieurs systèmes de sécrétion de type III (T3SS) dont un système impliqué dans la virulence appelé système Hrp (Hypersensitive Reaction and Pathogenicity) et un système impliqué dans la mobilité appelé système flagellaire. La seconde partie expose les connaissances disponibles dans la littérature concernant les T3SS chez les Protéobactéries telles qu'*Erwinia amylovora* et les liens possibles entre les différents systèmes. La troisième partie décrit les mécanismes de l'interaction plante-bactérie conduisant à la compatibilité (sensibilité) ou à l'incompatibilité (résistance). Dans le cas du pathosystème *E. amylovora*/ Pommier, certains mutants du système Hrp d'*E. amylovora*, en particulier les mutants de régulation, sont capables de modifier l'interaction compatible avec le pommier et protègent la plante contre la maladie : la quatrième partie résume les résultats précédemment obtenus dans notre équipe sur les modifications de l'interaction par des mutants *hrp* et expose les objectifs de la thèse.

1. LE FEU BACTERIEN ET *ERWINIA AMYLOVORA*

1.1 LA MALADIE

Le feu bactérien a été décrit pour la première fois aux USA en 1780 et s'est étendu depuis sur tout le continent nord américain, en Nouvelle-Zélande (depuis 1920), en Europe en 1966 et sur le pourtour est méditerranéen. Cette maladie est maintenant présente dans 45 pays. Elle atteint spécifiquement une tribu de la famille des Rosacées : les Maloïdées (arbres et arbustes ayant des fruits à pépins). Cette tribu regroupe des arbres fruitiers importants économiquement comme le pommier et le poirier, et des espèces ornementales comme l'aubépine et le *Pyracantha*. La pomme est l'un des fruits les plus consommés au monde après les agrumes, la banane et le raisin : en 2007, la production mondiale de pommes a atteint environ 64 millions de tonnes (contre 20 millions de tonnes pour les poires) (source : <http://faostat.fao.org/>). Le premier producteur est la Chine, la France se situant au 7^e rang (tableau I.1).

1.1.1 CYCLE DE LA MALADIE

Le cycle de la maladie est présenté en figure 1.1 (Paulin, 1996). La bactérie se dissémine à partir de lésions actives via des insectes pollinisateurs pendant la période de floraison, ou grâce à des phénomènes physiques (vent, pluie...). Elle pénètre dans l'hôte par des ouvertures naturelles (nectaires, stomates) ou accidentelles (blessures) en période de floraison ou de croissance des pousses. Une fois dans l'apoplaste, elle se multiplie préférentiellement dans les tissus jeunes en croissance, ce qui peut se traduire par l'apparition à leur surface de gouttelettes d'exsudat, mélange de polysaccharides bactériens et de cellules bactériennes. Cet exsudat permet une rapide dissémination de la maladie. Les tissus atteints se nécrosent, les rameaux et les feuilles flétrissent et se dessèchent (figure 1.2). La bactérie peut envahir l'ensemble de la plante en se multipliant dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux

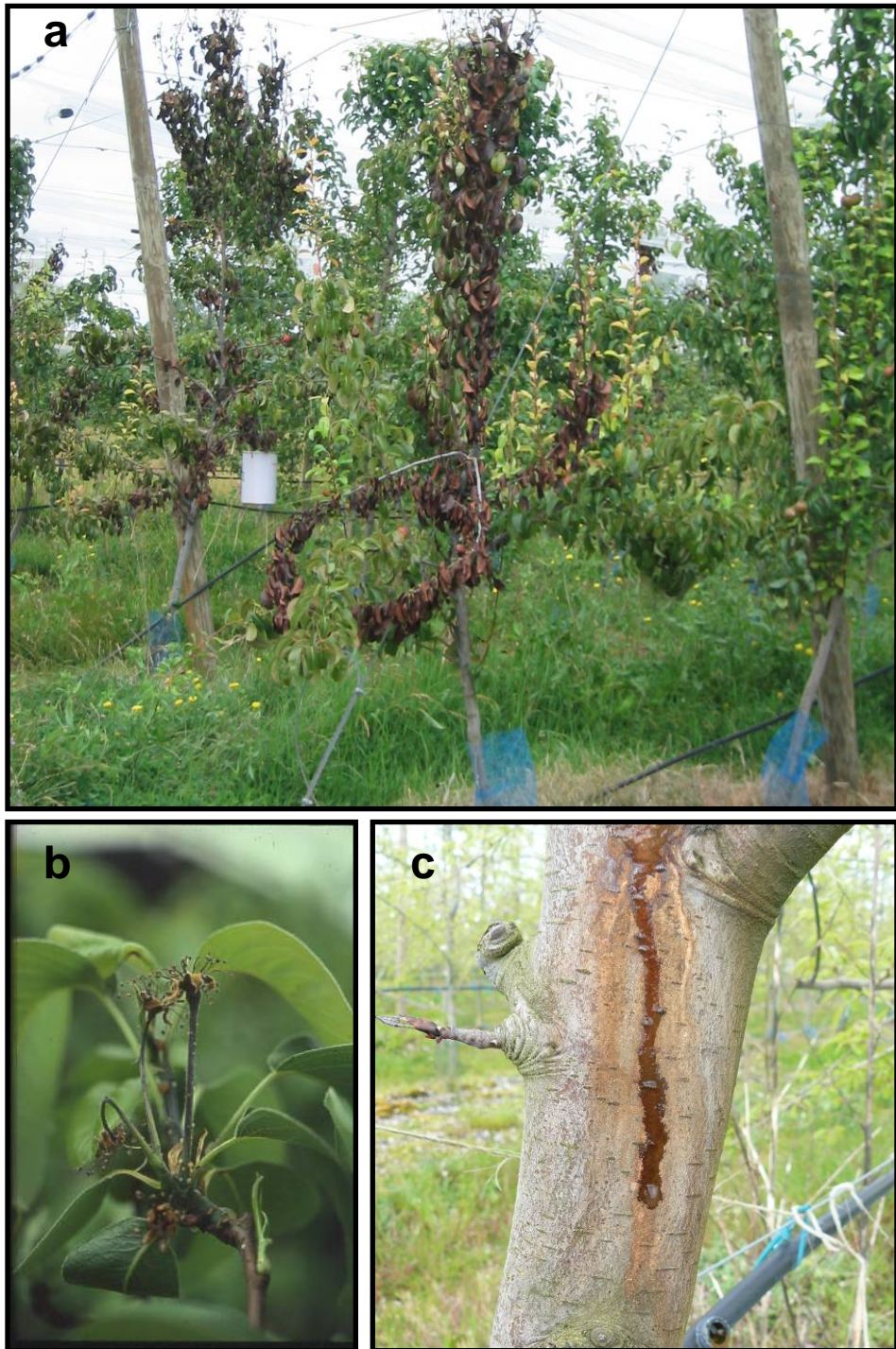


Figure 1.2 : Symptômes du feu bactérien sur poirier, (a) nécroses sur pousses, (b) nécroses et exsudat sur fleurs, (c) exsudat sur tronc

ascendant de sève (Bogs *et al.*, 1998). La maladie peut se transmettre très facilement d'une plante à l'autre par l'intermédiaire de l'exsudat. En fin de croissance végétative, il se forme des chancres sur les branches ou le tronc, dans lesquels la bactérie peut se conserver pendant la période de repos végétatif. Elle reprend sa multiplication au printemps suivant. La gravité de la maladie reste difficile à prédire. De fortes épidémies peuvent être suivies de plusieurs années sans attaque ou avec de faibles attaques si les conditions climatiques sont défavorables à la maladie.

Sur plante non hôte, comme le tabac, *E. amylovora* provoque une réaction d'hypersensibilité typique (HR), c'est-à-dire une mort cellulaire rapide et locale qui confine la pathogène au site d'infection (Klement, 1963).

1.1.2 LUTTE CONTRE LE FEU BACTERIEN

Toute méthode de lutte contre cette maladie doit s'accompagner de mesures d'éradication (suppression manuelle de pousses voire arrachage d'arbres) et le préjudice financier est important compte tenu de l'importance économique de certaines plantes hôtes. Les méthodes de lutte actuelles sont diverses mais chacune est d'efficacité limitée. La lutte chimique est appliquée à titre préventif et est considérée comme peu respectueuse de l'environnement. C'est pourquoi de nombreux travaux portent sur la recherche d'agents de lutte, écologiquement plus acceptables, tels que des microorganismes antagonistes. La sélection de génotypes résistants, par hybridation classique entre génotypes caractérisés est une méthode longue sur plante pérenne, et coûteuse même si l'utilisation de la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) permet d'augmenter son efficacité. D'autres approches plus récentes existent, qui visent à modifier la sensibilité des plantes aux bioagresseurs soit par élicitation des défenses naturelles de la plante, soit par transgénèse. Cette dernière méthode de lutte nécessite une connaissance assez précise des mécanismes de l'interaction plante/pathogène pour être mise au point.

1.1.2.1 LUTTE CHIMIQUE

Les produits utilisables en traitement phytosanitaire contre les bactérioses sont les produits cupriques (par exemple la bouillie bordelaise) et les antibiotiques, et n'ont d'efficacité que s'ils sont appliqués en préventif. L'action du cuivre est bactériostatique (Psallidas et Tsiantos, 2000). Ce métal ne se dégrade pas dans le sol et se lessive peu, une utilisation répétée peut donc conduire à une accumulation du cuivre à des concentrations toxiques pour les microorganismes du sol et pour la plante elle-même. Plusieurs antibiotiques, non autorisés en France, comme la streptomycine, l'oxytétracycline et la kasugamycine ont été utilisés en verger. Ils bloquent la multiplication bactérienne en agissant sur la synthèse protéique. La streptomycine est considérée comme l'antibiotique le plus efficace contre le feu bactérien mais son utilisation a finalement été interdite dans de nombreux pays du fait de l'apparition de résistances plasmidiques chez *E. amylovora* (Moller *et al.*, 1972). Elle est autorisée en Amérique du Nord, en Israël et en Nouvelle-Zélande, ainsi qu'en Hollande, en Allemagne et en Suisse selon des règles restrictives précises (McManus *et al.*, 2002). L'oxytétracycline a une efficacité inférieure à celle de la streptomycine (McManus et Jones, 1994). La kasugamycine montre une efficacité variable (Psallidas et Tsiantos, 2000). Son usage est restreint du fait de sa forte phytotoxicité sur pommier et poirier aux doses recommandées pour le contrôle de la maladie. Elle est néanmoins utilisée aux USA en mélange avec la streptomycine, afin de diminuer les risques d'apparition de souches résistantes. La fluméquine et l'acide oxolinique sont des composés de synthèse qui agissent sur la réplication de l'ADN des procaryotes. Aucune résistance plasmidique ni phytotoxicité n'ont été observées avec la fluméquine. Ce produit est autorisé en France, uniquement sur

prescription des services officiels. L'acide oxolinique a été utilisé en Israël en verger à partir de 1998 pour remplacer la streptomycine (Shtienberg *et al.*, 2001). Cependant des souches d'*E. amylovora* résistantes à ce produit ont été isolées dès 2000 (Manulis *et al.*, 2003).

Une autre molécule, autorisée en France contre le feu bactérien, est le fosétyl aluminium. Il s'agit d'une molécule qui, outre une action antifongique, présente une efficacité, irrégulière, contre le feu bactérien (Tsiantos et Psallidas, 2002). Elle aurait un pouvoir éliciteur de défenses qui n'a toutefois pas été mis en évidence dans le cas du feu bactérien. C'est un préventif à court terme car à la différence du cuivre, elle est rapidement absorbée par les feuilles.

1.1.2.2 LUTTE BIOLOGIQUE

Les organes les plus sensibles à l'infection par *E. amylovora* étant les fleurs, le contrôle biologique du feu bactérien cherche à établir des bactéries antagonistes au niveau de ces organes avant l'arrivée du pathogène. Il s'agit donc d'un moyen préventif de combattre la maladie. Différents microorganismes ont été expérimentés, pour lesquels les mécanismes de l'antagonisme avec *E. amylovora* ne sont pas toujours connus. *Pantoea agglomerans* (anciennement *Erwinia herbicola*) par exemple, produit des composés inhibant la croissance d'*E. amylovora* (Wodzinski et Paulin, 1994). Deux antibiotiques (pantocines A et B) ont été caractérisés chez certaines souches et les gènes impliqués dans leur production ont été déterminés (Wright *et al.*, 2001). BlightBan C9-1 commercialisé au Canada contient la souche de *Pantoea agglomerans* C9-1. Une autre espèce, *Pseudomonas fluorescens*, a été largement étudiée. Elle agirait par compétition nutritive (Wilson et Lindow, 1993). La souche A506 de cette espèce est commercialisée aux USA sous le nom de BlightBan A506TM. Des espèces de *Bacillus*, microorganismes de la rhizosphère présents aussi en surface des plantes, peuvent également inhiber la croissance d'*E. amylovora* (Jock *et al.*, 2002). Serenade WPO renferme la souche QST 713 de *Bacillus subtilis* et est commercialisé dans divers pays (mais pas la France). D'autres bactéries épiphytes du pommier et du poirier dont *Erwinia billingiae*, sont également des antagonistes d'*E. amylovora* (Jakovljevic *et al.*, 2006). Le mécanisme de cet antagonisme pourrait être aussi une compétition nutritive.

Des variants avirulents sauvages de l'agent pathogène sont également capables de bloquer l'infection (Goodman, 1967). Ils n'ont pas fait l'objet d'une commercialisation. Par ailleurs, des mutants avirulents d'*E. amylovora*, altérés dans la région *hrp*, sont capables expérimentalement de bloquer l'infection par la souche virulente lorsqu'ils sont inoculés avant ou en même temps que celle-ci (Tharaud *et al.*, 1997, Faize *et al.*, 1999 ; Faize *et al.*, 2006). Ce même type d'observation a été rapporté pour d'autres pathosystèmes comme *Ralstonia solanacearum*/ tomate (Etchebar *et al.*, 1998) ou *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*/ tomate (Moss *et al.*, 2007) sans qu'un mécanisme n'ait été proposé pour expliquer ce phénomène.

1.1.2.3 LUTTE GENETIQUE

Chez le pommier et le poirier, un programme de création variétale par hybridation classique, pour la résistance au feu bactérien, a été entrepris depuis plusieurs années en France à l'INRA d'Angers et aux USA à l'Université Cornell (Geneva). Ce type de programme est long sur ce type de plantes (pérennes à cycle long), lourd en investissements et difficile à réaliser. L'utilisation de la transgénèse visant à introduire un gène d'intérêt dans un fond génétique connu peut être une alternative intéressante. Différentes approches sont explorées. Elles consistent à faire produire à la plante :

- des substances antibactériennes (Mourgues *et al.*, 1998)
- des substances inhibitrices de facteurs du pouvoir pathogène (Malnoy *et al.*, 2005)

- des réactions de défense surexprimées (Malnoy *et al.*, 2007)
- des protéines-cibles d'effecteurs modifiées (Borejsza-Wysocka *et al.*, 2006).

Au-delà de l'acceptabilité sociétale du transgène, l'efficacité et la durabilité de la résistance conditionnent le succès de cette approche. C'est pourquoi il est important d'avoir une connaissance précise des mécanismes de l'interaction *E. amylovora*-plante hôte, qui conduisent à la résistance ou à la sensibilité. Aucune résistance monogénique n'a été identifiée à ce jour pour ce pathosystème. Les résistances seraient d'origine multigénique ou tout au moins oligogénique. Elles sont d'intensités diverses : certaines variétés de pommier et poirier (comme Evereste ou Old Home) présentent une résistance quasi-totale à *Erwinia amylovora*.

1.1.2.4 STIMULATION DES DEFENSES NATURELLES DE L'HOTE

L'acibenzolar-S-méthyl est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, inducteur de la SAR (systemic acquired resistance) chez un grand nombre de plantes (Friedrich *et al.*, 1996 ; Kunz *et al.*, 1997). En application préventive, il assure un niveau de protection contre le feu bactérien d'environ 50% (Brisset *et al.*, 2000 ; Maxson-Stein *et al.*, 2002). Ce produit est autorisé en Italie pour la lutte contre le feu bactérien sur poirier.

L'application d'un régulateur de croissance tel que le prohexadione-calcium (ProCa) peut réduire la sensibilité au feu bactérien chez le pommier (Buban *et al.*, 2003). Ce produit est un analogue structural (et inhibiteur spécifique) de monooxygénases impliquées dans la synthèse de gibbérélines et dans le métabolisme des flavonoïdes (Rademacher, 2000). Il induit une modification du métabolisme des flavonoïdes et en particulier une accumulation de lutéoliflavan ainsi qu'une synthèse accrue de son précurseur le lutéoforol (Roemmelt *et al.*, 2003). Ce précurseur présente un effet biocide à large spectre, qui pourrait expliquer une partie de son efficacité vis-à-vis du feu bactérien (Spinelli *et al.*, 2005).

D'autres composés agissant comme stimulateurs des réactions de défense de la plante sont en cours d'étude, certains donnent des résultats encourageants. Ces composés sont d'origine naturelle ou obtenus par synthèse (Brisset *et al.*, 2005).

1.2 L'AGENT PATHOGENE *ERWINIA AMYLOVORA*

1.2.1 CARACTERES MICROBIOLOGIQUES

Le genre *Erwinia* appartient à la famille des Entérobactéries qui comprend de nombreuses espèces pathogènes d'animaux, d'insectes ou de plantes. Il comprend des espèces pathogènes comme *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. mallotivora*, *E. papayae*, *E. psidii*, *E. rhapontici*, ou épiphytes comme *E. billingiae*, *E. toletana*, *E. trachaephila*, *E. aphidicola*, *E. persicina*, et *E. tasmaniensis* (dont le génome est séquencé). Le génome d'*Erwinia amylovora* est en cours d'annotation (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_amylovora/).

Les colonies sur milieu KB solide (King *et al.*, 1954) sont blanches, bombées, brillantes avec un anneau central dense après 2 à 3 jours de culture à 27°C. La croissance d'*E. amylovora* en anaérobiose est faible, ce qui la différencie des autres Entérobactéries. Elle est également incapable de réduire les nitrates en nitrites. En milieu minimum, la présence d'acide nicotinique est nécessaire à sa croissance.

1.2.2 DIVERSITE GENETIQUE ET GAMME D'HOTE

L'espèce *E. amylovora* est très homogène. La majorité des souches sont agressives sur l'ensemble des plantes de la gamme d'hôte. Il existe cependant quelques exceptions : certaines souches peuvent infecter les plantes du genre *Rubus* mais pas le genre *Malus* ou le

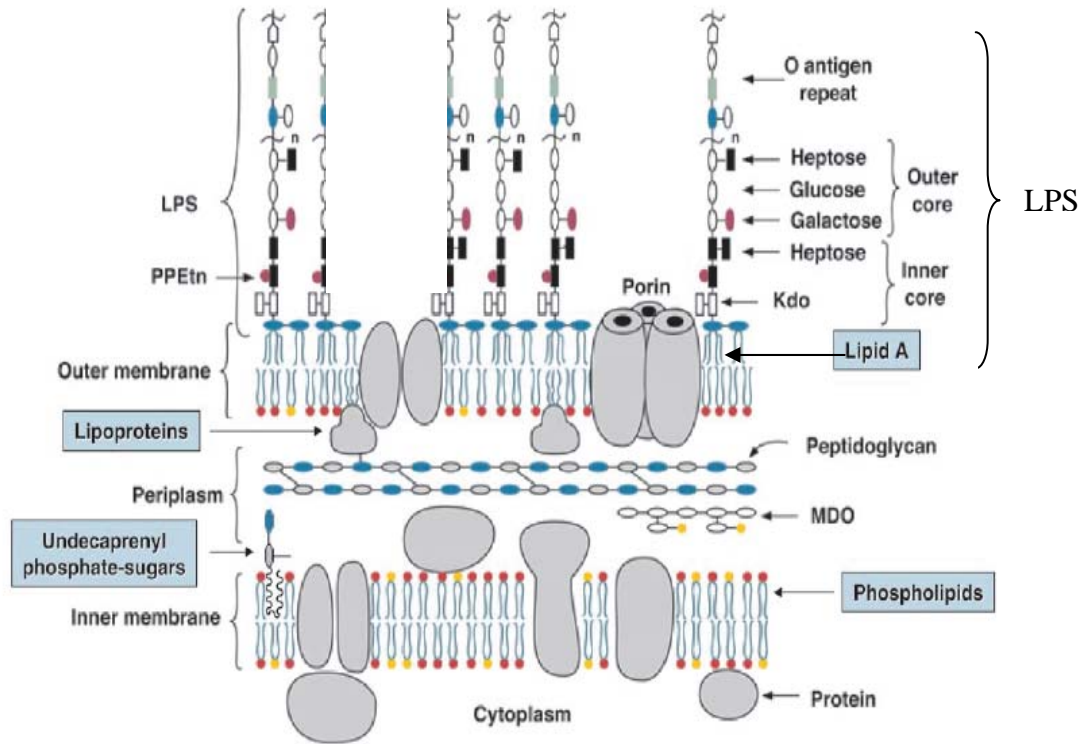


Figure 1.3 : Modèle des membranes interne et externe chez *E. coli* K12 (d'après Raetz *et al.*, 2002).

genre *Pyrus* (Momol et Aldwinckle, 2000). Entre une souche isolée de *Rubus* et une souche pathogène de pommier/poirier, des différences au niveau d'un gène de biosynthèse des polysaccharides et des gènes de protéines hypothétiques ont été mises en évidence par hybridation soustractive (Triplett *et al.*, 2006). De même, la comparaison phylogénétique d'une souche isolée d'*Amelanchier* avec des souches isolées d'autres Maloïdées montre une divergence de cette souche au sein de l'espèce (Barionovi *et al.*, 2006). Les différences restent cependant ponctuelles malgré de nombreuses tentatives d'analyses par RAPD, ribotyping, PFGE ou AFLP.

Par ailleurs, *E. amylovora* possède un plasmide (pEA29) (29 kb), conservé chez la plupart des souches sauvages (Falkenstein *et al.*, 1988 ; McGhee et Jones, 2000). Les souches curées de ce plasmide ont une agressivité légèrement réduite et leur croissance sur milieu minimum sans thiamine est altérée (Falkenstein *et al.*, 1989 ; Laurent *et al.*, 1989). Certaines souches possèdent aussi d'autres plasmides de taille variable comme pCPP60 (56 kb) (Steinberger *et al.*, 1990), deux petits plasmides pEA1.7 (1,7 kb) et pEA2.8 (2,8 kb) (McGhee *et al.*, 2002), pEa34 (34 kb) portant une des formes de la résistance à la streptomycine (Chiou et Jones, 1991 ; Chiou et Jones, 1993) et pEa8,7 (8,7 kb) (Palmer *et al.*, 1997), pEU30 (30 kb) et pEL60 (60 kb) (Foster *et al.*, 2004), ou pEI70 (70 kb) (Llop *et al.*, 2006) dont les rôles ne sont pas connus.

1.2.3 COMPOSANTS DE SURFACE CELLULAIRES ET EXTRACELLULAIRES : LPS, EPS, FLAGELLES

Le lipopolysaccharide (LPS) est le composé de surface majoritaire des bactéries à Gram négatif. C'est une macromolécule tripartite composée d'un lipide (le lipide A) ancré dans la membrane externe, d'un oligosaccharide (ou « core ») et d'un polysaccharide appelé antigène-O (ou chaîne O) (figure 1.3) (Raetz *et al.*, 2002). Le LPS peut être considéré comme une protection physique des cellules bactériennes qui contribue à réduire la perméabilité membranaire, permettant ainsi la croissance bactérienne dans un environnement défavorable : les mutants affectés dans la synthèse du LPS ont en effet une sensibilité accrue aux antibiotiques et leur croissance *in planta* est limitée (Kingsley *et al.*, 1993 ; Dow *et al.*, 1995). La composition et la structure du LPS d'*E. amylovora* ont été déterminées par Ray *et al.* en 1987 : la fraction lipidique est composée de glucosamine phosphate et de trois acides gras (12 : O, 14 : O et 3-OH-14 : O) qui sont communs aux Entérobactéries. La fraction carbohydre est composée :

- d'une chaîne courte (chaîne O ou antigène O) composée de sous-unités répétées de trois sucres neutres : fucose, glucose et galactose,
- d'un « core » contenant des oligosaccharides (heptose, glucose et acide uronique), des composés aminés et du 3-desoxy-2-octulosonic acid (KDO).

Chez *E. amylovora*, la cellule bactérienne est entourée d'une couche de polysaccharides (galactose, glucose, mannose et acide uronique) organisée en capsule, formant l'exopolysaccharide (EPS) appelé amylovorane et essentiel à la virulence (§ 1.2.4) (Bugert et Geider, 1995). Un mutant affecté dans la synthèse d'EPS est avirulent. Contrairement au LPS, l'EPS n'est pas immunogène. *E. amylovora* produit un autre polysaccharide, un homopolymère de fructose appelé levane. Les mutants affectés dans la synthèse du levane restent virulents. Ils sont moins agressifs que la souche sauvage (Geier et Geider, 1993).

E. amylovora porte des flagelles péritriches nécessaires à la mobilité (2 à 7 par cellule), comme la plupart des Entérobactéries. La synthèse des flagelles dépend de facteurs externes comme la température et le pH (Raymundo et Ries, 1980, 1981). Sur plante, la mobilité a été observée en surface de stigmate mais par contre n'a pas été mise en évidence dans les espaces intercellulaires de tissus infectés (Raymundo et Ries, 1980 ; Thomson, 1986). Expérimentalement, la mobilité facilite l'infection des bouquets floraux de pommier lorsque

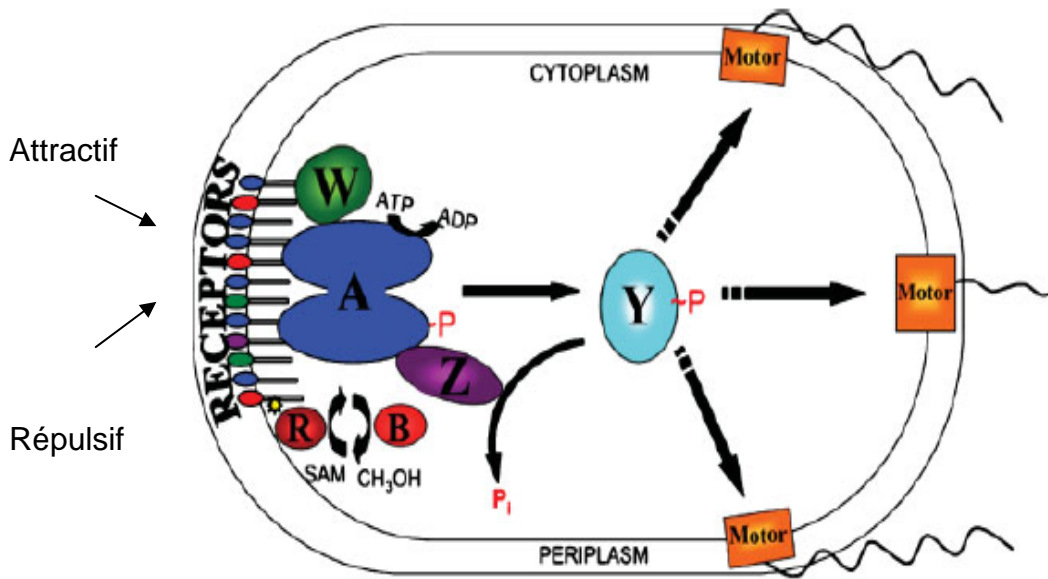


Figure 1.4 : Système du chimiotactisme chez *E. coli* (Baker *et al.*, 2006)

la bactérie est inoculée par pulvérisation. Elle n'intervient plus lorsque le pathogène est inoculé à la seringue directement dans les pousses puisque que, quelle que soit la mobilité de la souche, on obtient dans ce cas le même taux d'infection (Bayot et Ries, 1986). La structure et la synthèse du flagelle chez les Entérobactéries seront développées au § 2.1. En lien avec la mobilité, les bactéries montrent un comportement complexe appelé chimiotactisme qui leur permet de percevoir des composés chimiques du milieu et de se déplacer vers les produits attractifs ou de fuir les produits répulsifs (Blair, 1995). Chez *E. amylovora*, le chimiotactisme dépend de la température et du pH avec un optimum situé entre 20 et 28°C et un pH de 6 à 8 (Raymundo et Ries, 1980). *E. amylovora* présente un chimiotactisme positif pour le nectar de pomme, pour un acide aminé (aspartate) et pour plusieurs acides organiques (fumarate, malate, maleate, malonate, oaxaloacétate et succinate) mais pas pour les sucres suivants : fructose, galactose, glucose, lactose, mannitol, raffinose, ribose, sorbitol et sucrose (Raymundo et Ries, 1980). Le chimiotactisme a été bien étudié chez *E. coli* (Macnab, 1996 ; Wadhams et Armitage, 2004). Brièvement, des chemorécepteurs transmembranaires ou MCPs (methyl-accepting chemotaxis proteins) détectent des changements de concentrations de produits attractifs ou répulsifs, et répondent en changeant de conformation via les protéines CheR (méthyltransférase) et CheB (méthylestérase) qui ajoutent ou enlèvent respectivement un groupement méthyl sur chaque récepteur (figure 1.4) (Baker *et al.*, 2006). Ce changement modifie l'activité d'autophosphorylation de l'histidine kinase cytoplasmique CheA qui forme un complexe avec le récepteur grâce à une protéine de couplage CheW. L'autophosphorylation de CheA est inhibée par la détection d'un attractant alors qu'elle est stimulée par celle d'un produit répulsif. CheA phosphorylée transfère son phosphate à CheY, un régulateur de réponse cytoplasmique. CheY phosphorylée interagit avec le moteur flagellaire pour influencer son sens de rotation et favoriser un mouvement vers les molécules attractives. La phosphatase CheZ est nécessaire pour augmenter le niveau de déphosphorylation spontanée de CheY et permet un arrêt rapide du signal.

1.2.4 LES FACTEURS DU POUVOIR PATHOGENE

Trois déterminants ont été identifiés à ce jour : le système d'acquisition du fer, l'EPS et les protéines sécrétées par un système de sécrétion de type III, codées par les gènes *hrp-dsp* (Hypersensitive Reaction and Pathogenicity- Disease Specific).

- *Erwinia amylovora* possède un système d'acquisition du fer composé de sidérophores de type hydroxamate et d'un récepteur FoxR (Kachadourian *et al.*, 1996 ; Expert, 2000). Ce système est important pour la survie de la bactérie en milieu carencé en fer comme l'apoplaste. Le sidérophore majoritairement produit par *E. amylovora* est cyclique (DFO E) mais de petites quantités d'autres sidérophores du même type, cycliques (DFO D, X) ou linéaires (DFO G), sont synthétisées (Feistner *et al.*, 1993 ; Kachadourian *et al.*, 1996). Le sidérophore se lie au Fe³⁺ pour former la ferrioxamine et l'ensemble est réinternalisé grâce à FoxR. Un mutant *dfoA*, affecté dans la synthèse du sidérophore, est incapable d'utiliser le citrate ferrique (principal transporteur de fer dans la plante) comme source de fer (Kachadourian *et al.*, 1996). Sur fleurs, les mutants *dfoA* et *foxR* montrent une capacité de colonisation des fleurs plus faible que la souche sauvage et induisent un niveau moindre de maladie (Dellagi *et al.*, 1998). Ce système est donc impliqué dans l'agressivité de la bactérie.
- La biosynthèse de l'EPS ou amylovorane requiert un grand nombre de gènes. La plupart de ces gènes sont localisés dans une région du chromosome d'environ 17kb appelée *ams* (pour *amylovoran synthesis*) (Bugert et Geider, 1995). Les quantités d'EPS synthétisées varient selon les souches mais aussi en fonction de la

température, du pH, de la concentration en sels du milieu et de la source de carbone. Les mutants altérés dans la synthèse de l'amylovorane, donc dépourvus de capsule, sont non pathogènes (Bernhard *et al.*, 1993) ce qui fait de l'amylovorane un facteur de virulence.

- Les systèmes de sécrétion de type III impliqués dans la sécrétion de protéines de virulence sont présents chez de nombreuses bactéries pathogènes des plantes et des animaux (Hueck, 1998), ainsi que chez des bactéries symbiotiques des plantes comme *Rhizobium* spp. (Freiberg *et al.*, 1997) ou des animaux comme *Sodalis glossinidius* (Dale *et al.*, 2001) et *Photorhabdus luminescens* (Ffrench-Constant *et al.*, 2000). Chez *E. amylovora*, les gènes *hrp-dsp* codent un système de sécrétion de type III, nécessaire pour l'induction de la maladie sur plante hôte et de l'hypersensibilité sur plante non-hôte. La plupart des mutations dans les gènes *hrp* conduisent à la perte de la virulence (Willis *et al.*, 1991). Ce système est utilisé pour délivrer des protéines appelées effecteurs directement dans les cellules de l'hôte (développé en § 2.2.3 pour *E. amylovora*). Les gènes *hrp-dsp* peuvent être classés en trois catégories selon leur fonction : gènes de régulation, gènes de structure et gènes de protéines sécrétées. Les protéines de régulation contrôlent l'expression des autres gènes *hrp-dsp*, les protéines de structure forment l'appareil de sécrétion par lequel transitent les protéines sécrétées impliquées dans le parasitisme de l'hôte (Tang *et al.*, 2006).

Chez *E. amylovora*, l'expression des gènes *hrp-dsp* est activée *in planta* et en milieu minimum, et réprimée en milieu riche (Wei *et al.*, 1992a). Les signaux environnementaux qui affectent l'expression des gènes incluent les sources de carbone et d'azote, le pH, la température et l'osmolarité (Wei *et al.*, 1992a ; Gaudriault *et al.*, 1997). L'organisation et la régulation de ces gènes seront détaillées en paragraphe 2.2.

2. LES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE III CHEZ LES BACTERIES

La sécrétion des protéines vers des compartiments extracytoplasmiques est impliquée dans d'importants processus de la physiologie des bactéries pathogènes comme l'adhésion et l'invasion des tissus hôtes, la mobilité cellulaire ou la virulence. La sécrétion et l'assemblage de structures de surface sont des phénomènes complexes nécessitant la synthèse de sous-unités structurales dans un ordre précis. Nous allons développer deux systèmes de sécrétion de type III : le système flagellaire et le système Hrp.

2.1 LE SYSTEME FLAGELLAIRE : CAS DES ENTEROBACTERIES

Le système flagellaire des Entérobactéries a été très bien étudié chez les organismes modèles tel *Salmonella typhimurium*, bactérie pourvue de flagelles péritriches (Macnab, 1996). La mobilité flagellaire est décrite chez plus de 80% des bactéries connues possédant ces organes. C'est un des processus permettant aux microorganismes de survivre à des conditions environnementales variées (pour revue voir Stock et Surette 1996 ; Armitage, 1999 ; Aizawa *et al.*, 2000). Le flagelle est une structure hélicoïdale rigide, avec une fréquence de rotation d'environ 300 Hz, capable de propulser la bactérie en milieu liquide (swimming) à une vitesse d'environ $10\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ou dans des milieux visqueux et sur des surfaces (swarming) (Bardy *et al.*, 2003 ; Harshey, 2003). Chez de nombreuses bactéries, le swarming est associé à la production de multiples flagelles latéraux et surtout à un comportement non plus cellulaire

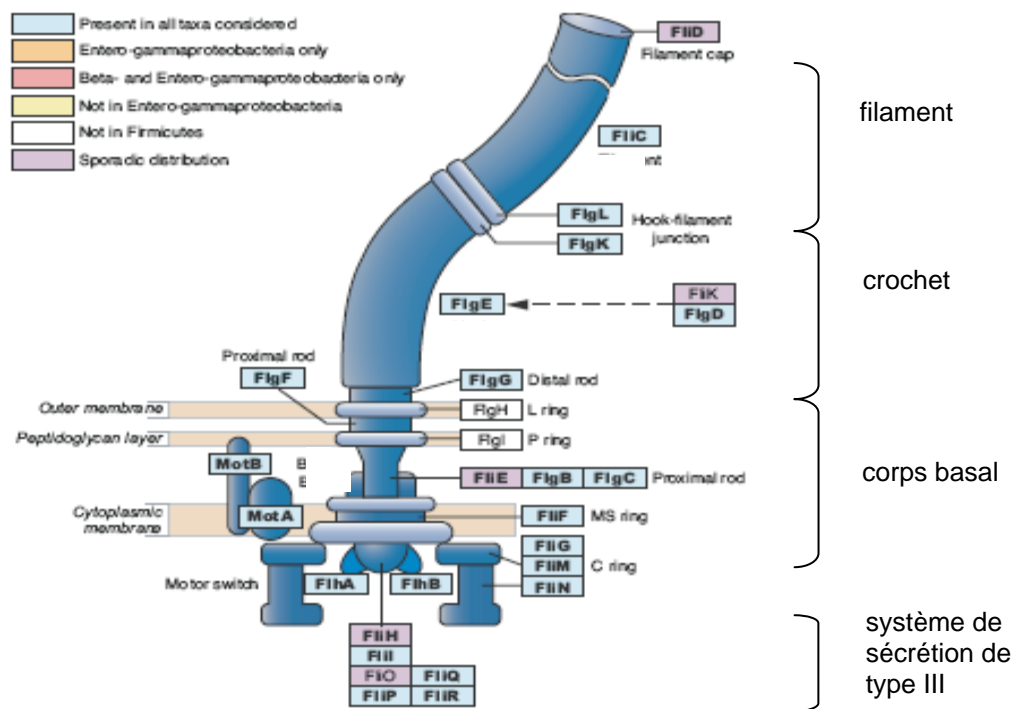


Figure 1.5 : Distribution des protéines flagellaires parmi les espèces bactériennes portant des flagelles (d'après Liu et Ochman, 2007).

mais communautaire. Les flagelles peuvent se répartir sur la cellule bactérienne de deux manières : polaire ou latérale-péritriche (Fujii *et al.*, 2008). Les flagelles latéraux et péritriches se distinguent par la forme plus ou moins vrillée de l'hélice (Fujii *et al.*, 2008).

La température, le pH, l'osmolarité, les sucres sont autant de facteurs régulant l'expression des gènes flagellaires (Soutourina et Bertin, 2003). La mobilité bactérienne représente un avantage pour la bactérie en lui permettant de se diriger vers des conditions favorables. Le flagelle joue également un rôle très important dans l'adhésion et la formation de biofilm (Korber *et al.*, 1989 ; Kirov *et al.*, 2003). La mobilité des microorganismes pathogènes est considérée comme un facteur de virulence essentiel à la colonisation de l'hôte. Cependant, les filaments flagellaires ont des propriétés antigéniques révélées lors du contact avec les animaux et les plantes hôtes. De plus, la mobilité flagellaire est très coûteuse en énergie pour la cellule en raison du nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle et de son fonctionnement. Par conséquent, il n'est pas surprenant que la synthèse du flagelle soit régulée par des facteurs externes, incluant l'interaction des cellules bactériennes avec leur hôte. Certaines bactéries pathogènes de l'homme comme *Bordetella pertussis* ou *Yersinia pestis* ont ainsi perdu la capacité de synthétiser des flagelles, contrairement à des bactéries qui leur sont pourtant apparentées comme *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* ou *Yersinia enterocolitica* (Parkhill *et al.*, 2001 ; Parkhill *et al.*, 2003). Cette absence de mobilité pourrait être le reflet d'une adaptation particulière.

2.1.1 STRUCTURE DU FLAGELLE

Le flagelle est l'une des structures protéiques les plus complexes connues chez les bactéries. Il est généralement décrit comme étant composé de trois parties : un corps basal complexe composé d'un cylindre central et d'une série d'anneaux superposés, une structure courte incurvée appelée crochet et un long filament hélicoïdal (figure 1.5) (Macnab, 2003 ; Liu et Ochman, 2007). Seuls le crochet et le filament émergent de la cellule alors que le corps basal est ancré dans l'enveloppe cellulaire, l'anneau inférieur dépassant de la membrane interne dans le cytoplasme.

Le corps basal est composé d'un cylindre central et de trois protéines anneaux appelées MS pour membrane, P pour peptidoglycane (PG) et L pour LPS. L'anneau MS semble inséré sous la membrane interne alors que les anneaux L et P sont ancrés dans la membrane externe et le peptidoglycane. Ces anneaux sont le résultat de la polymérisation d'environ 26 sous-unités des protéines FliF, FlgI et FlgH pour les anneaux MS, P et L respectivement. Le cylindre central est composé de quatre protéines différentes (FlgB, FlgC, FlgF et FlgG). Un dernier anneau connecté à l'anneau MS, appelé anneau C (pour cytoplasmique), est formé des protéines de rotation du moteur : FliG, FliM et FliN. Deux protéines sont nécessaires à la rotation du flagelle mais pas à son assemblage : MotA et MotB. Elles forment un anneau autour du corps basal et fonctionnent comme un ancrage au PG et comme un canal à protons du périplasme vers le cytoplasme. Ce flux de protons fournit l'énergie de la rotation flagellaire, qui demande jusqu'à plusieurs centaines de protons par révolution. Le sens de rotation du moteur peut être horaire ou antihoraire et a des conséquences sur le déplacement de la cellule : dans le sens horaire, la cellule se réoriente de façon aléatoire alors que dans le sens antihoraire, le déplacement est en avant.

Le crochet est une structure cylindrique similaire au filament mais construit à partir d'une sous-unité spécifique : FlgE. Le crochet est le résultat de la polymérisation d'environ 130 sous-unités FlgE et sa longueur (50-60 nm) est régulée par l'addition des protéines de jonction FlgK et FlgL au bout du crochet lors de l'assemblage du flagelle.

Le filament est le composant majeur du flagelle puisqu'il est construit à partir de la polymérisation de 10000 à 40000 copies d'une seule sous-unité protéique : la flagelline FliC

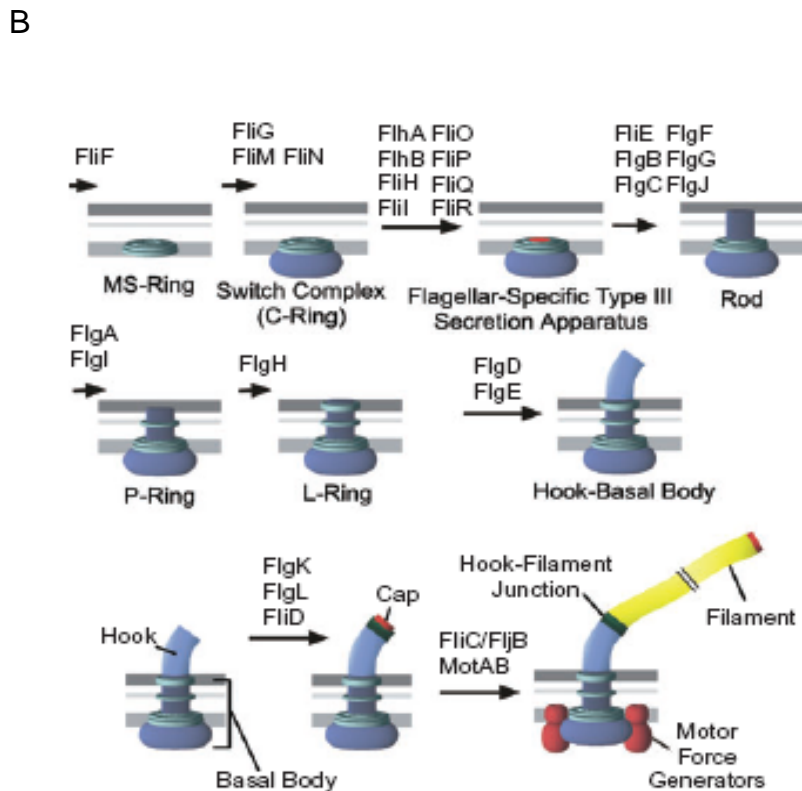
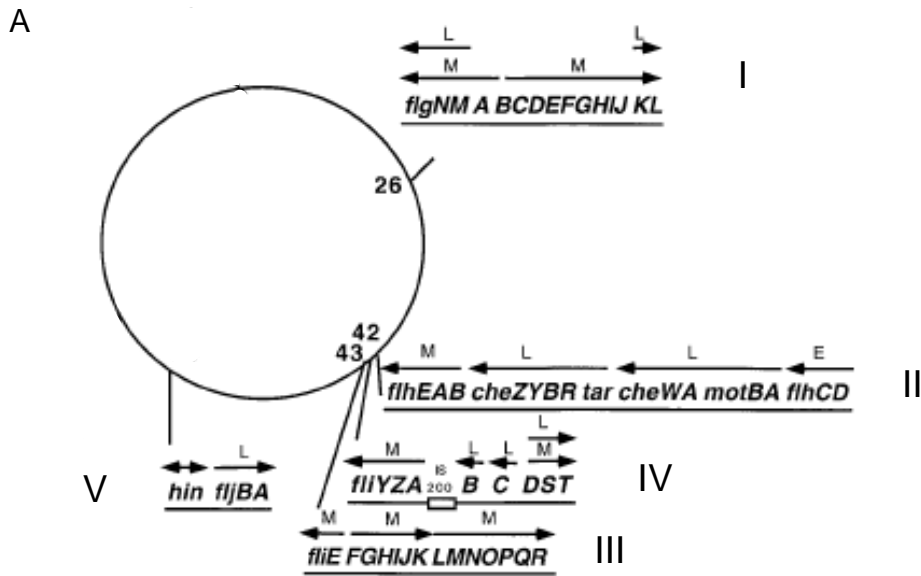


Figure 1.6 : A) Localisation chromosomique des opérons formant le régulon flagellaire chez *S. typhimurium*. Les opérons sont notés E (early), M (middle) ou L (late) selon leur ordre d'expression dans le temps (d'après Chilcott et Hughes, 2000). B) Assemblage du flagelle chez *Salmonella* sp. (d'après Aldridge *et al.*, 2006).

(Kondoh et Hotani, 1974). Le filament est un tube étroit de diamètre constant (environ 15 à 20 nm) et de longueur variable (5 à 10 μm , selon le nombre de sous-unités de flagelline assemblées. Le rôle spécifique du filament est celui d'un propulseur, avec par conséquent une certaine rigidité pendant la rotation pour pousser la cellule. La séquence des flagellines peut être divisée en trois modules fonctionnels : les domaines N- et C- terminaux responsables des interactions entre sous-unités et de leur polymérisation, et un domaine central dépassant à la surface du filament et portant l'antigène flagellaire. Cet aspect sera développé dans le § 3.1.1.1.2. Les mutations affectant la structure du filament sont toujours localisées dans les domaines terminaux.

2.1.2 ORGANISATION DES GENES FLAGELLAIRES

Compte tenu de la structure complexe du flagelle, sa synthèse nécessite de nombreux gènes. Chez les organismes modèles *E. coli* et *S. typhimurium*, environ 60 gènes sont organisés en 15 et 17 opérons, respectivement, regroupés en quatre ou cinq clusters sur le chromosome (figure 1.6, A) (Chilcott et Hughes, 2000 ; Macnab, 2003). Le cluster I inclut les gènes codant les protéines de structure du flagelle nommés *flgA-M*. Le cluster II inclut les gènes codant les protéines participant à la régulation et à l'assemblage du flagelle (gènes *flh*), les gènes du moteur flagellaire (*mot*) et les gènes du chimiotactisme (*che*). Les clusters III et IV comprennent les gènes codant les protéines de l'appareil de sécrétion, la flagelline et les facteurs σ spécifiques du flagelle (*fliA*, *fliT*). Chez *S. typhimurium*, il existe un cinquième cluster codant pour une flagelline alternative (*fljB*).

La biogénèse du flagelle est un processus complexe qui se déroule dans un ordre précis. Les promoteurs du régulon flagellaire sont organisés en trois classes selon leur expression dans le temps (figure 1.6, A). Le promoteur de classe E (E pour « Early ») dirige la transcription de l'opéron *flhDC* qui code un activateur de transcription des promoteurs de classe M (M pour « Middle »). La majorité des gènes possédant ces promoteurs codent pour les composants de la structure et de l'assemblage du corps basal et du crochet, ainsi qu'un facteur σ^{28} , FliA, et son facteur anti-sigma, FlgM. Les gènes possédant les promoteurs de classe L (L pour « Late ») ont besoin du complexe σ^{28} -RNA polymérase pour leur transcription. FlgM est associé à σ^{28} et empêche la transcription des gènes possédant les promoteurs de classe L tant que la construction de la structure corps basal-crochet n'est pas achevée. FlgM peut alors être sécrétée, elle libère FliA (σ^{28}) et la transcription des gènes ayant les promoteurs de classe L commence. Ces gènes sont ceux de la flagelline et des protéines associées au crochet, ainsi que des protéines nécessaires au chimiotactisme et à la rotation du flagelle.

2.1.3 ASSEMBLAGE DU FLAGELLE ET SECRETION

L'assemblage du flagelle est bien connu (Macnab, 2003 ; Aldridge *et al.*, 2006). L'addition des composants flagellaires a lieu à l'extrémité distale de la structure. La première structure assemblée est l'anneau MS (figure 1.6, B). Le mécanisme utilisé par la cellule pour déterminer la localisation et le nombre d'anneaux, ainsi que le moment choisi pour initier l'assemblage du flagelle, reste inconnu. L'anneau C est ensuite assemblé, ce qui permet alors l'assemblage du cylindre central puisque les mutants dans l'anneau C en sont incapables (Kubori *et al.*, 1997). La sécrétion des protéines composant le cylindre semble se faire à travers le pore formé par l'anneau MS. Lorsque le cylindre est mature, FlgD joue un rôle d'échafaudage et permet à la protéine du crochet FlgE d'initier sa polymérisation. La croissance du crochet est vite stoppée par la membrane externe (Kubori *et al.*, 1992) et les anneaux P (FlgI) et L (FlgH) doivent alors être assemblés. La sécrétion de FlgI et FlgH dans le périplasme et la membrane externe respectivement se fait selon la voie de sécrétion

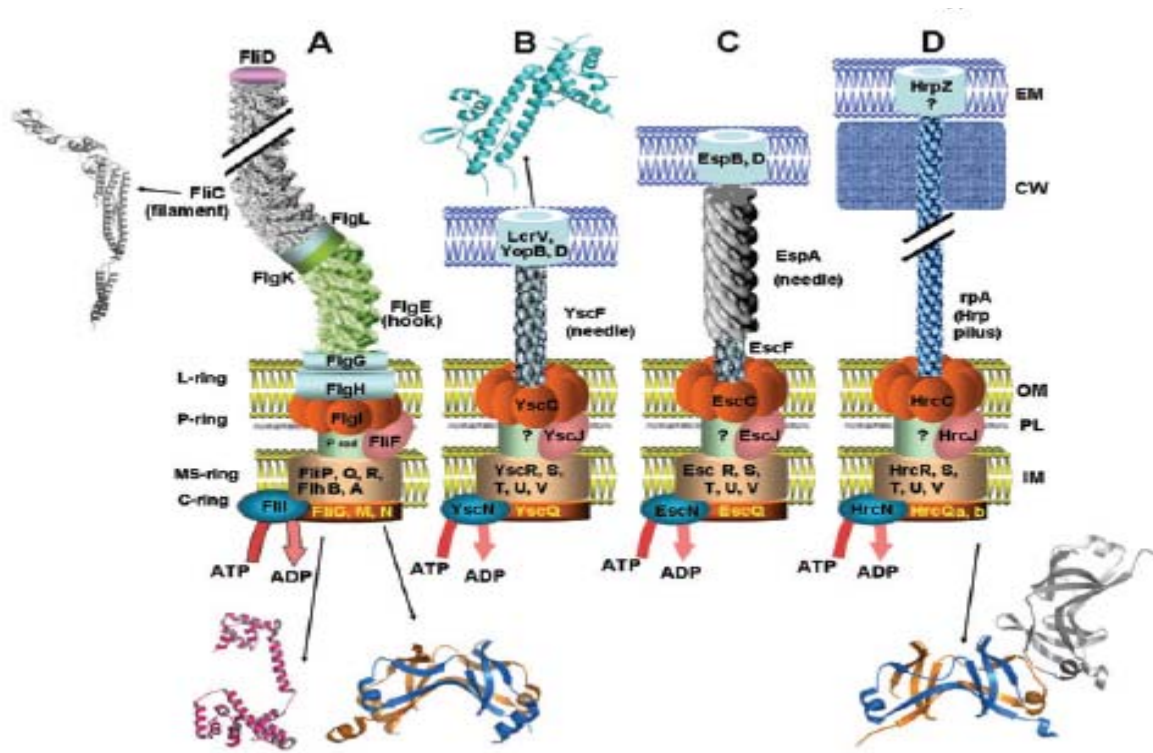


Figure 1.7 : Représentation schématique du flagelle bactérien (A) et des systèmes de sécrétion de type III liés à la virulence chez *Yersinia* sp. (B), *Escherichia coli* (C) et *Pseudomonas syringae* (D). Seules les protéines conservées dans les T3SS et leurs homologues flagellaires sont dessinées et positionnées de façon homologue avec la même couleur (d'après Tampakaki *et al.*, 2004).

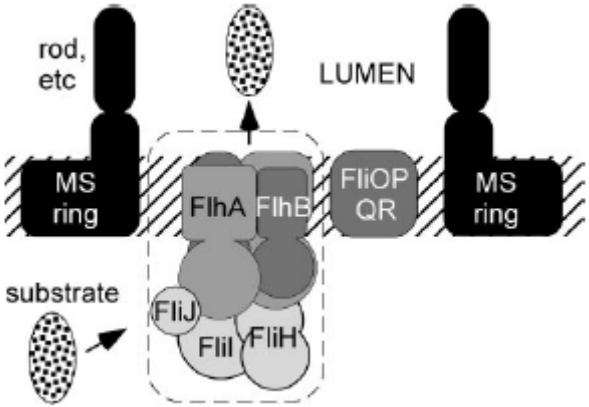


Figure 1.8 : Représentation des protéines de l'appareil d'export flagellaire (d'après Macnab, 2003).

générale (GSP) (Jones *et al.*, 1989). Le nombre de sous-unités FlgE additionnées au crochet est apparemment contrôlé par FliK puisqu'un mutant *fliK* est affecté dans la longueur du crochet. Lorsque le crochet est complet, le facteur anti- σ FlgM est sécrété, ce qui libère FliA (σ^{28}). FliA permet la transcription des opérons de classe III codant la flagelline FliC et les protéines associées au crochet (appelées HAP pour Hook Associated Protein) FlgK, FlgL et FliD. FlgK se polymérise au bout du crochet, en remplaçant FlgD. Ceci permet la polymérisation immédiate d'un ou plusieurs anneaux formés par FlgL au-dessus de FlgK. FliD est ensuite additionnée et l'incorporation de la flagelline s'initie à la jonction FlgL-FliD. La longueur du filament semble varier selon la quantité de flagelline synthétisée. Le mouvement de la flagelline à l'intérieur du filament nécessite une ATPase FliI.

A l'exception des composants des anneaux P et L sécrétés par la GSP, la sécrétion des autres protéines flagellaires est phylogénétiquement proche du T3SS utilisé par les bactéries pathogènes pour la sécrétion de facteurs de virulence, c'est-à-dire que la sécrétion emploie une structure bien définie en forme de conduit et les sous-unités de cette structure sont assemblées à l'extrémité distale. De nombreuses protéines flagellaires ont d'ailleurs des homologues avec des composants du système Hrp (Tampakaki *et al.*, 2004) (figure 1.7). Les composants du système d'export se répartissent en deux classes : les protéines solubles et les protéines associées à la membrane. Parmi les protéines solubles, certaines fonctionnent comme des chaperonnes spécifiques de substrat : FlgN chaperonne FlgK et FlgL, FliT chaperonne FliD et FliS chaperonne FliC (Bennett *et al.*, 2001), d'autres non (FliH, FliI, FliJ). Il y a six composants membranaires (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR) qui forment un complexe dans l'anneau MS (figure 1.8) dont la masse totale avoisinerait 380 kDa.

FliI est l'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire au processus d'export, son domaine N-terminal interagit avec le domaine C-terminal de FliH, son régulateur négatif pour former un complexe hétérotrimérique (FliH)₂(FliI). Une mutation dans le site catalytique de FliI ou l'inhibition de l'association à FliH abolissent la mobilité. Chez *Salmonella*, un mutant FliH peut encore être légèrement mobile (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2002). Le complexe (FliH)₂(FliI) s'arrimerait à FlhA et FlhB pour former un super complexe. Le rôle exact de FliJ n'est pas connu, elle est nécessaire à l'export des protéines flagellaires du crochet et du filament, et interagit avec FliH, et moins fortement avec FliI. FlhA est une protéine d'environ 75kDa qui interagirait avec l'anneau MS, ce qui ancrerait l'appareil d'export au corps basal. FlhB joue un rôle critique dans la détermination des protéines devant être exportées à un stade donné. Peu de choses sont connues sur l'évènement de translocation lui-même. FlhA et FlhB interagissent avec les substrats (Minamino et Macnab, 2000) mais cela n'implique pas que ces protéines constituent une partie physique du système de translocation.

2.2 LE SYSTEME Hrp CHEZ LES BACTERIES PHYTOPATHOGENES : CAS DU GROUPE I

Le système Hrp est une structure ressemblant à une seringue, composée d'anneaux, membranaires et d'un filament extracellulaire appelé pilus Hrp chez les bactéries phytopathogènes (Roine *et al.*, 1997 ; Kubori *et al.*, 1998) qui sert au transport à longue-distance de protéines sécrétées à travers la paroi des cellules de la plante. Certains composants du système Hrp sont conservés chez les bactéries pathogènes des plantes et des animaux, ce qui suggère que l'architecture de base est similaire chez les différentes espèces bactériennes. La première démonstration de l'injection de protéines directement dans les cellules hôtes a été faite chez *Yersinia* (Rosqvist *et al.*, 1994). Chez les bactéries pathogènes de plantes, un premier cluster de gènes *hrp* a été identifié en 1986 chez *Pseudomonas syringae* (Lindgren *et al.*, 1986) et la fonction de sécrétion de protéines de ces gènes *hrp* a été établie (Arlat *et al.*, 1994). Puis il a été démontré que les effecteurs de type III de *Pseudomonas syringae* et *Xanthomonas campestris* étaient sécrétés directement dans le cytosol de l'hôte, de la même

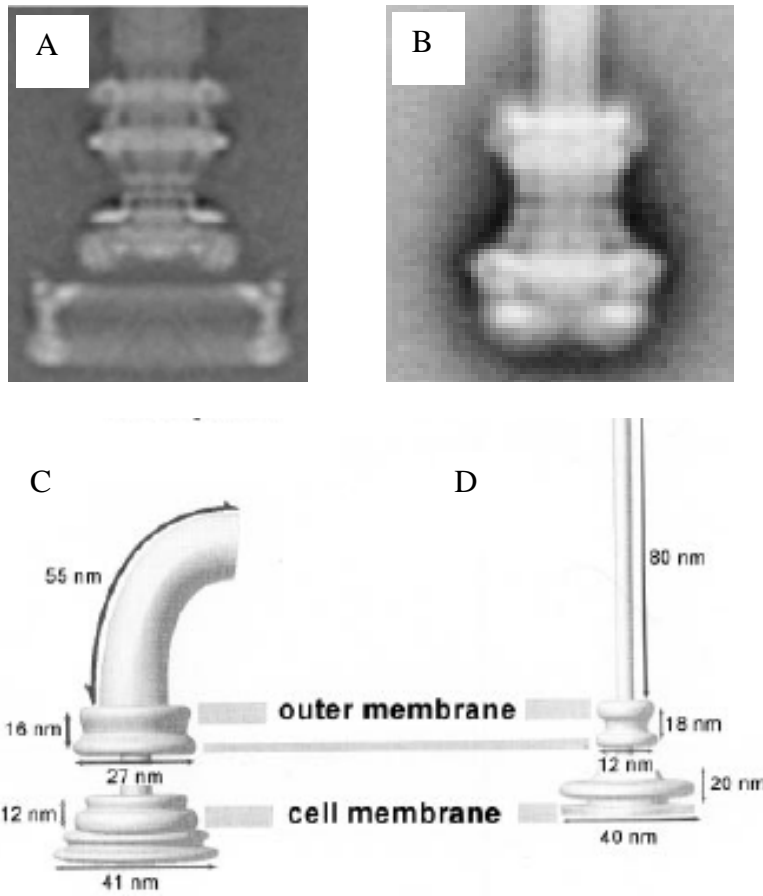


Figure 1.9 : Structures basales du système de sécrétion de type III de *Shigella flexneri* (A et C) et du flagelle de *Salmonella* (B et D) (d'après Blocker *et al.*, 2001 ; Blair, 2003 ; Macnab, 2003).

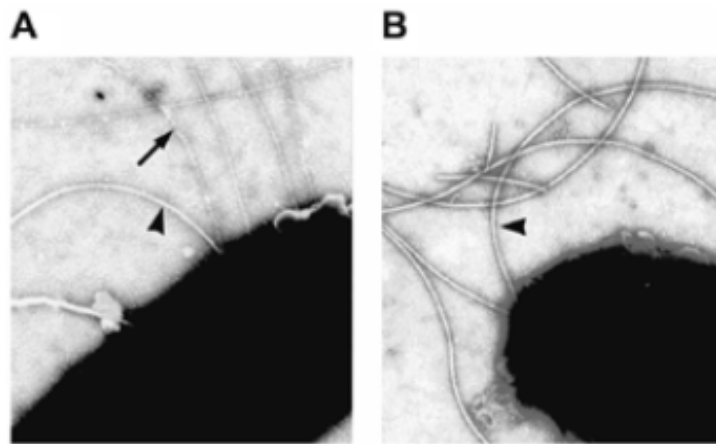


Figure 1.10 : Examen de *P. syringae* DC3000 par microscopie électronique à transmission. A, DC3000 ; B, *Ps hrpA*. Pointe de flèche = flagelle (15 à 18nm de diamètre). Flèche = pilus Hrp (8 à 10 nm de diamètre). Barre = 100 nm (d'après Hu *et al.*, 2001).

façon que chez *Yersinia* (Gopalan *et al.*, 1996 ; Leister *et al.*, 1996, Van den Ackerveken, 1996). Le T3SS des bactéries pathogènes des animaux doit traverser trois membranes biologiques : les membranes bactériennes interne et externe et la membrane plasmique de l'hôte (Cornelis, 2006). On pense que le percement de la membrane plasmique implique un complexe formant un pore ou translocon (Büttner et Bonas, 2002). Le T3SS des bactéries pathogènes des plantes doit en plus traverser la paroi de la cellule végétale qui peut mesurer plusieurs centaines de nanomètres. Il est donc possible que le processus de translocation soit plus complexe que chez les bactéries pathogènes des animaux. Chez les bactéries phytopathogènes, plusieurs protéines sont des composants du translocon puisqu'elles sont nécessaires à la translocation des effecteurs mais pas à leur sécrétion (Rossier *et al.*, 2000 ; Büttner *et al.*, 2002 ; Meyer *et al.*, 2006 ; Kvitko *et al.*, 2007).

De nombreuses bactéries semblent ne posséder qu'un seul T3SS associé à la virulence mais certaines en possèdent plusieurs comme *Salmonella typhimurium* (notés SPI-1 à -12 ; Hensel, 2004), ou *Yersinia pestis* (Parkhill *et al.*, 2001). Chez *E. amylovora*, en dehors du T3SS majeur impliqué dans la virulence, les composants de deux copies d'un système putatif de sécrétion de type III homologue à l'îlot de symbiose SSR-1 de *Sodalis glossinidius* ont été identifiés (Triplett *et al.*, 2006). Leur rôle n'est pas décrit à ce jour.

Les analyses phylogénétiques amènent à classer les gènes *hrp* du T3SS présents chez les bactéries phytopathogènes et liés à la virulence, en deux groupes : le groupe 1 comprend les clusters *hrp* des pathovars de *P. syringae*, *Erwinia* sp. et *Pantoea stewartii* (Alfano et Collmer, 1997 ; Frederick *et al.*, 2001) et le groupe 2 comprend les T3SS de *Xanthomonas* sp. et *Ralstonia solanacearum* (Alfano et Collmer, 1997). Ces deux groupes se différencient par l'arrangement des gènes dans les opérons. Chaque groupe possède certains gènes *hrp* spécifiques et des systèmes de régulation distincts. Les opérons *hrp* du groupe 1 sont activés par HrpL, un facteur sigma de type ECF (extracytoplasmic function) alors que ceux du groupe 2 sont activés par des activateurs de transcription de type AraC (HrpB chez *R. solanacearum* ou HrpX chez *X. campestris*). Les gènes codant les T3SS sont presque toujours groupés en cluster sur le chromosome ou sur un plasmide (par exemple chez *Ralstonia*) formant un îlot de pathogénicité (PAI) (Hacker et Kaper, 2000). Ces PAIs ont souvent un pourcentage en G+C différent du reste du chromosome et sont fréquemment flanqués d'éléments mobiles, ce qui suggère qu'ils ont été acquis par un transfert horizontal.

2.2.1 ARCHITECTURE ET ASSEMBLAGE DU SYSTEME Hrp

La structure du T3SS chez *S. typhimurium* ressemble au corps basal flagellaire avec deux anneaux interagissant avec la membrane externe, deux anneaux internes situés au niveau de la membrane cytoplasmique, et une extension extracellulaire de 8 nm de diamètre et 80 nm de long (figure 1.9) (Kubori *et al.*, 1998 ; Blocker *et al.*, 2001 ; Blair, 2003). Les mêmes structures ont été retrouvées chez *Y. enterocolitica* (Hoiczky et Blobel, 2001), *Shigella* (Tamano *et al.*, 2000) et chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) (Sekiya *et al.*, 2001). Chez les bactéries phytopathogènes, l'appendice extracellulaire ou pilus Hrp a été observé en microscopie électronique (figure 1.10) (Roine *et al.*, 1997 ; Jin *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002). Chez *Salmonella*, cinq protéines sont associées à la structure basale du T3SS dont deux présentent des homologies avec HrcC et HrcJ, protéines conservées chez les bactéries phytopathogènes. Les représentations schématiques du système de sécrétion de type III pour *P. syringae* (groupe Hrp1) sont basées sur des homologies de séquence avec les protéines flagellaires (Tampakaki *et al.*, 2004). Il existe en effet de remarquables similarités entre l'architecture du filament flagellaire et celle du T3SS (Blocker *et al.*, 2003). Cordes et ses collaborateurs (2003) ont montré chez *Shigella flexneri* que les sous-unités MxiH étaient organisées en filament cylindrique hélicoïdal d'un diamètre externe de 7 nm et interne de 2

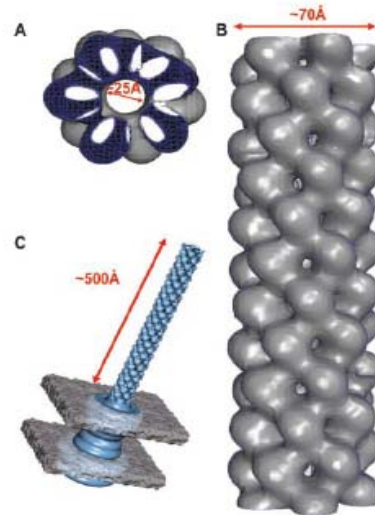
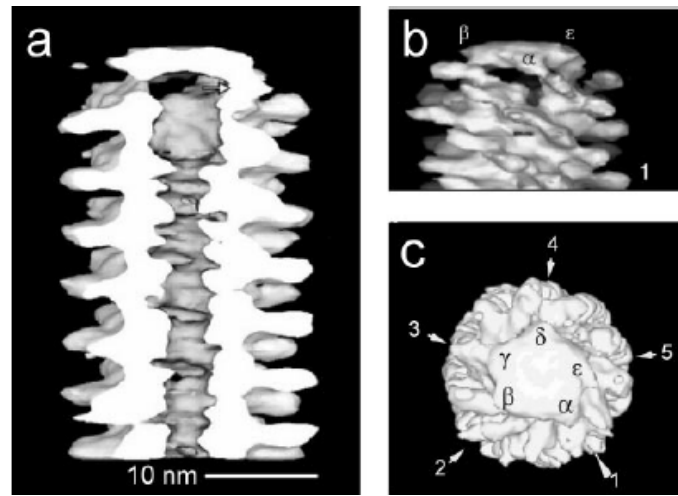


Figure 1.11 : Vues tridimensionnelle du filament flagellaire (vues de côté (a) et (b) ; vue du dessus (c)) et du filament du T3SS chez *Shigella flexneri* (vues du dessus (A), de côté (B) et (C) (d'après Cordes *et al.*, 2003 et Macnab, 2003).

nm, ce qui est assez proche du filament flagellaire (figure 1.11). Le pilus Hrp d'*E. amylovora* a environ le même diamètre (8 nm) que le T3SS de *Shigella* mais il est beaucoup plus long (plusieurs μm) (Jin *et al.*, 2001).

L'assemblage chez *Salmonella* débiterait avec la formation des deux anneaux internes, probablement équivalents à l'anneau MS du flagelle (Kimbrough et Miller, 2000 ; Sukhan *et al.*, 2001), puis la formation du double anneau au niveau de la membrane externe. L'extension se poursuit dans la membrane interne avec d'autres protéines très conservées (HrcN, HrcQ, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU) (Cornelis et Van Gijsegem, 2000 ; Hueck, 1998). Tous les T3SS possèdent une ATPase (HrcN) qui pourrait fonctionner comme une pompe de sécrétion (Pozidis *et al.*, 2003). L'assemblage du pilus Hrp est réalisé avec des sous-unités de petite taille (HrpA, 6,5KDa chez *E. amylovora* et 11KDa chez *P. syringae* pv *tomato*) (Jin *et al.*, 2001 ; Taira *et al.*, 1999) dont les séquences sont très variables mais pour lesquelles les structures secondaires restent similaires. Les expériences de marquage *in situ* montrent que le pilus Hrp est impliqué spécifiquement dans la sécrétion des effecteurs. Cette sécrétion se déroule tout au long de l'assemblage du pilus Hrp. Comme pour le filament flagellaire et la flagelline, il a été démontré que le pilus Hrp fonctionnait comme un conduit permettant d'acheminer les effecteurs et s'allongeait par l'extrémité distale (Li *et al.*, 2002).

De même que pour le système flagellaire, il existe des protéines solubles, appelées chaperonnes, appartenant au système d'export. A la différence des chaperonnes flagellaires, qui interagissent avec la partie C-terminale de leur substrat, les chaperonnes liées à la virulence se lient avec l'extrémité N-terminale de leur effecteur. Ce sont des protéines de bas poids moléculaire (<170 acides aminés), acides (pI<5,5) et riches en leucine. Les chaperonnes de classe I interagissent spécifiquement avec un ou plusieurs effecteurs et sont nécessaires à la sécrétion de ces derniers. La classe II comprend les chaperonnes des protéines du translocon (Parsot *et al.*, 2003). Les chaperonnes des bactéries phytopathogènes ont surtout été identifiées chez *E. amylovora* et chez *P. syringae* (Büttner et Bonas, 2006). Ces protéines contribuent à la stabilité et/ou à la sécrétion de l'effecteur partenaire.

2.2.2 L'ÎLOT DE PATHOGENICITE D'*E. AMYLOVORA*

Le cluster *hrp-dsp* d'*E. amylovora* fait partie d'un îlot de pathogénicité (PAI) de 62 Kb divisé en quatre parties (figure 1.12) (Oh et Beer, 2005) :

- l'îlot de transfert (IT) dont le rôle est mal connu,
- la région HAE (Hrp-associated enzymes) dont les gènes pourraient coder pour des enzymes impliquées dans la synthèse de peptides,
- la région HEE (Hrp effectors and elicitors),
- la région *hrp/hrc* codant les protéines régulatrices telles que HrpL, HrpS et HrpXY ainsi que les protéines du système de sécrétion conservées chez d'autres organismes et notées Hrc (Hr et conserved).

Le cluster *hrp-dsp* inclut ces deux dernières régions. Le GC% du PAI est en moyenne de 53,2%, peu différent de celui de l'ADN génomique (53,6 à 54,1). Toutefois, le GC% varie le long du locus IT et s'écarte souvent significativement de la moyenne (figure 1.12). Par contre, le GC% de la région contenant le cluster *hrp* reste relativement constant mais légèrement plus élevé que la moyenne du génome.

HrpL est la protéine clé pour le contrôle des gènes *hrp* et *hrc* chez les bactéries du groupe Hrp1. C'est un facteur sigma qui régule des fonctions extracytoplasmiques (Lonetto *et al.*, 1992) et qui active tous les opérons de sécrétion, les gènes de harpine et les gènes *dsp* (Wei et Beer, 1995 ; Gaudriault *et al.*, 1997). Les protéines HrpL sont très conservées au niveau de la séquence en acides aminés et reconnaissent la « *hrp box* » (Innes *et al.*, 1993), une séquence consensus (GGAACC-N15/16-CCACNNA) située dans le promoteur des

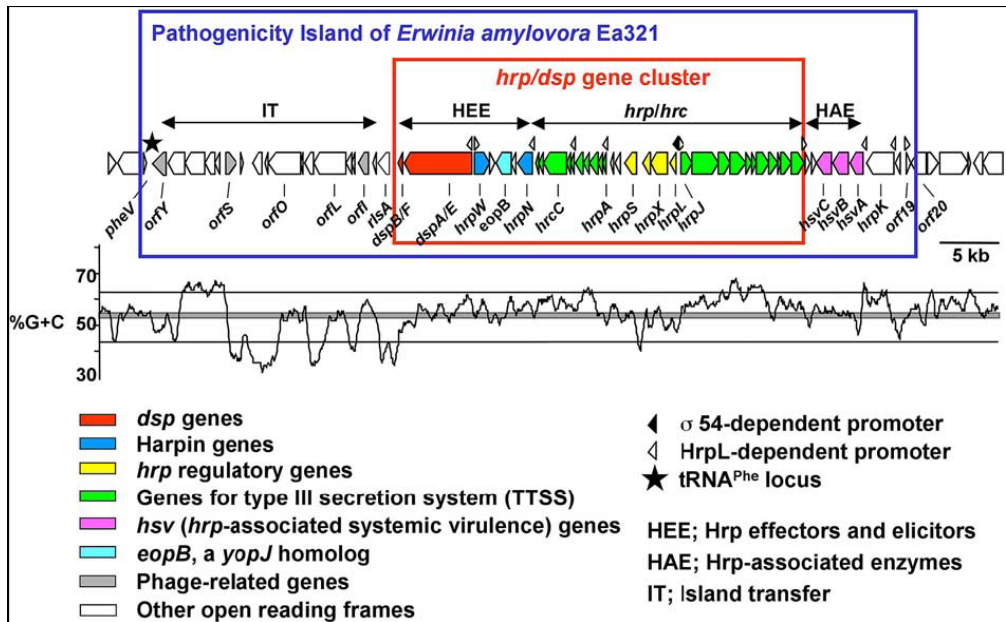


Figure 1.12 : Ilot de pathogénicité d'*E. amylovora* incluant le cluster *hrp/dsp* (d'après Oh et Beer, 2005)

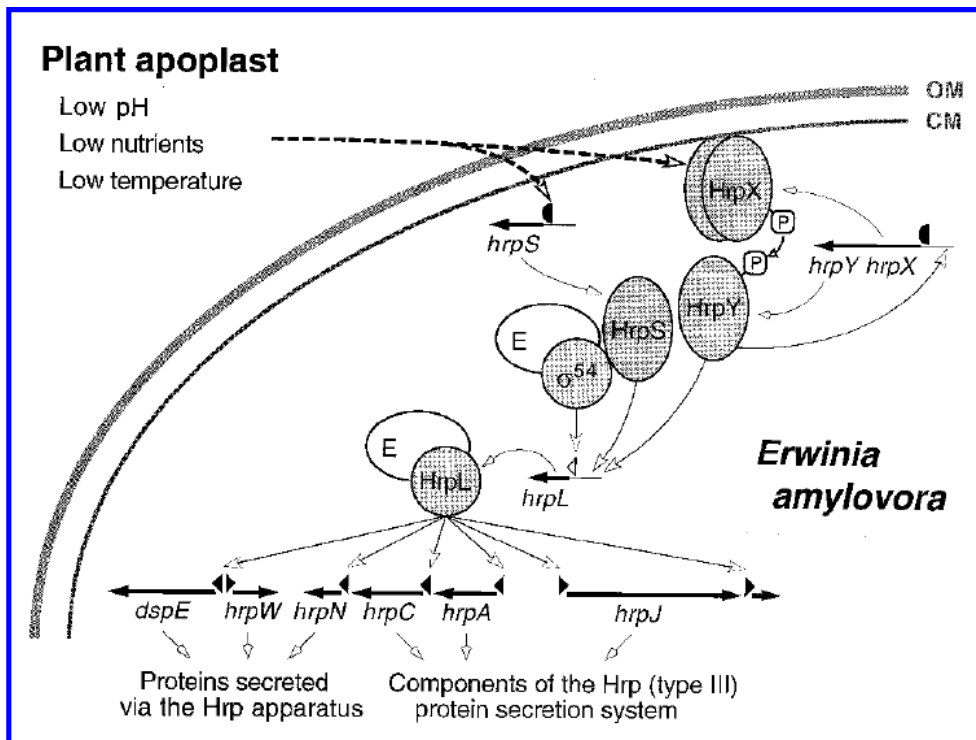


Figure 1.13 : Modèle de la cascade de régulation des gènes *hrp* chez *E. amylovora* CM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe ; E : RNA polymérase, demi-cercle : promoteur σ_{70} ; triangle vide : promoteur σ_{54} ; triangle plein : promoteur HrpL (Wei *et al.*, 2000).

opérons *hrp* et des effecteurs de type 3 (Fouts *et al.*, 2002). Les cinq premiers nucléotides (**GGAAC**) de la *hrp* box ainsi que les trois derniers (**ACNNA**) sont essentiels à l'activité du promoteur chez *Pantoea agglomerans* (Nissan *et al.*, 2005). L'induction de *hrpL* nécessite HrpS chez *Erwinia* spp. et *Pantoea stewartii* (Wei *et al.*, 2000 ; Merighi *et al.*, 2003). HrpS appartient à la famille NtrC des σ 54-EBP (Enhancer Binding Protein).

Un modèle de l'expression des gènes *hrp* d'*E. amylovora* a été proposé (Wei *et al.*, 2000) (figure 1.13). Un système à deux composants (*hrpX* et *hrpY*) agit en amont de la cascade HrpX-HrpL. *hrpX* code une histidine kinase alors que *hrpY* code une protéine de régulation. L'analyse par mutagenèse indique que la phosphorylation de HrpY par HrpX, est cruciale pour l'activation de la cascade HrpS-HrpL-*hrp*. Des modèles similaires ont été proposés pour d'autres espèces d'*Erwinia* ou chez *Pantoea* (Nizan-Koren *et al.*, 2003 ; Merighi *et al.*, 2003). Certaines conditions environnementales comme la température, le pH et la composition du milieu affectent l'expression des gènes du T3SS (Wei *et al.*, 1992a). Ainsi, l'expression des gènes *hrp* est abolie en milieu riche et induite en milieu mimant l'apoplaste (i.e. en milieu minimum). Les milieux inducteurs sont pauvres et ne contiennent qu'une seule source de carbone. Le galactose en milieu M9 est un bon inducteur des gènes *hrp* (Gaudriault *et al.*, 1997) chez *E. amylovora*. Chez *P. syringae* pv *phaseolicola*, l'induction d'*hrpL* est beaucoup plus importante *in planta* qu'en milieu inducteur, ce qui suggère la présence d'un signal de la plante. Chez *R. solanacearum* (groupe Hrp2), l'induction des gènes *hrp* par la plante est médiée par PrhA, une protéine de membrane similaire à des récepteurs de sidérophores (Marenda *et al.*, 1998) qui agirait comme un récepteur bactérien d'une molécule non diffusible de la paroi (Aldon *et al.*, 2000).

La région HAE contient cinq gènes dont trois sont impliqués dans le caractère systémique de la maladie : *hsvA* (*hrp*-associated systemic virulence), *hsvB*, *hsvC* (Oh *et al.*, 2005). Ces trois ORF sont situées dans un même opéron et sont contrôlées par HrpL (Oh *et al.*, 2005).

La région IT inclut 17 gènes dont trois sont homologues à des gènes de phage, deux seraient des gènes de virulence. La bordure gauche du PAI est très conservée avec le PAI de *Y. pseudotuberculosis*. Aucun promoteur HrpL-dépendant n'a été détecté dans cette région. De plus, un mutant délété de la région IT n'est affecté ni dans l'élicitation de la HR sur tabac, ni dans la réponse à l'inoculation de poire immature (Oh et Beer 2005).

2.2.3 LES EFFECTEURS DE TYPE III CHEZ *E. AMYLOVORA*

Comparées aux bactéries pathogènes des animaux, les bactéries pathogènes des plantes possèdent un arsenal d'effecteurs beaucoup plus large : on connaît plusieurs dizaines d'effecteurs chez les bactéries phytopathogènes (Mudgett, 2005) alors qu'il n'y en a que 6 chez *Yersinia* (Shao, 2008). Leur rôle est souvent difficile à déterminer du fait d'une redondance fonctionnelle.

L'analyse du sécrétome d'*E. amylovora* a permis l'identification d'au moins douze protéines sécrétées par le T3SS (Nissinen *et al.*, 2007). Parmi ces protéines, certaines sont déjà bien caractérisées :

- les harpines HrpN (Wei *et al.*, 1992b) et HrpW (Gaudriault *et al.*, 1998 ; Kim et Beer, 1998), qui sont des protéines riches en glycine et stables à la chaleur
- DspA/E (Gaudriault *et al.*, 1997 ; Bogdanove *et al.*, 1998),
- HrpJ (Bogdanove *et al.*, 1996),
- HrpA qui est la sous-unité structurale du pilus Hrp (Jin *et al.*, 2001),
- EopB (Oh et Beer, 2005) (ou Orf B ; Oh *et al.*, 2005) renommée Eop1 (Nissinen *et al.*, 2007),
- HrpK (Oh *et al.*, 2005),

L'étude de Nissinen *et al.* (2007) a révélé d'autres protéines sécrétées : Eop2, Eop3, Eop4, TraF et FlgL. Enfin, il existe un autre effecteur, HopPtoC_{Ea}, dont le gène est situé à l'extérieur du PAI (Zhao *et al.*, 2005).

Les mutants *hrpN* sont affectés dans leur capacité à induire la nécrose sur plante hôte (Barny, 1995). Un mutant *hrpN* provoque un burst oxydatif plus faible sur plante hôte, que la souche sauvage (Venisse *et al.*, 2003), ce qui suggère que HrpN est impliquée dans la production de formes actives d'oxygène. La démonstration récente de l'implication d'HrpN dans la translocation de DspA chez le tabac (Bocsanczy *et al.*, 2008), suggère que le rôle de HrpN dans le burst oxydatif et la mort cellulaire, est indirect chez la plante hôte.

Sur plante non hôte, HrpN induit un burst oxydatif et une HR sur tabac (Wei *et al.*, 1992b), ainsi qu'une activation de MAPK (Adam *et al.*, 1997), une induction de gènes de défense (Peng *et al.*, 2003), la SAR (Dong *et al.*, 1999) et la modulation de flux ioniques (El Maarouf *et al.*, 2001).

HrpW inhibe la mort cellulaire sur *Arabidopsis thaliana* à de faibles concentrations et a donc un rôle opposé à HrpN (Reboutier *et al.*, 2007). Sur plante hôte, un mutant *hrpW* a le même comportement que la souche sauvage (Gaudriault *et al.*, 1998).

DspA/E a un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène (un mutant *dspA* est non pathogène) (Gaudriault *et al.*, 1997). DebRoy et ses collaborateurs (2004) ont montré que la perte de virulence d'un mutant *dspA* est liée à une incapacité à supprimer les défenses basales de l'hôte, en effet un mutant *dspA* provoque chez le pommier un dépôt de callose bien plus important que la souche sauvage. DspA présente par ailleurs des homologies avec AvrE de *Pseudomonas syringae* (Gaudriault *et al.*, 1997). DspA est aussi impliquée avec HrpN dans la génération du stress oxydant (Venisse *et al.*, 2003). L'expression transitoire de DspA chez le pommier et le tabac induit la mort cellulaire (Boureau *et al.*, 2006).

HrpJ a elle aussi un rôle important dans le pouvoir pathogène puisqu'un mutant *hrpJ* est non pathogène (Nissinen *et al.*, 2007). Cette protéine est nécessaire à l'accumulation extracellulaire de HrpN et HrpW, ainsi qu'à l'élicitation de l'hypersensibilité (Nissinen *et al.*, 2007).

Les mutants *eop1*, *hrpK* et *hopPtoC_{Ea}* ont le même phénotype que celui de la souche sauvage (Kim et Beer, 1998 ; Oh et Beer, 2005, Oh *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005). La fonction de HrpK semble être assez différente de celle de HrpK chez *P. syringae* DC3000 chez qui elle jouerait un rôle dans la translocation : un mutant *hrpK* d'*E. amylovora* n'est pas affecté dans la virulence (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2005). Eop4, nommée AvrRpt2_{Ea} par Zhao *et al.* (2006) est impliquée dans la virulence sur poires immatures. La fonction des autres protéines reste à déterminer.

2.3 CONNECTIONS ENTRE LE SYSTEME DE SECRETION LIE A LA VIRULENCE ET LE SYSTEME FLAGELLAIRE

Plusieurs exemples décrits dans la littérature montrent qu'il existe une régulation coordonnée de la mobilité et des facteurs de virulence. Certains gènes flagellaires régulent positivement des gènes impliqués dans la virulence comme par exemple chez *Salmonella typhi* (Eichelberg et Galán, 2000), *Erwinia carotovora* (Cui *et al.*, 2008) ou *Xenorhabdus nematophila* (Lanois *et al.*, 2008). Au contraire, les gènes flagellaires et les gènes de virulence peuvent être inversement régulés comme chez *Y. enterocolitica* (Horne et Prüss, 2006) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Soscia *et al.*, 2007). Ces connections existent aussi chez des bactéries autres que les γ -protéobactéries comme chez *Campylobacter jejuni* (ϵ -

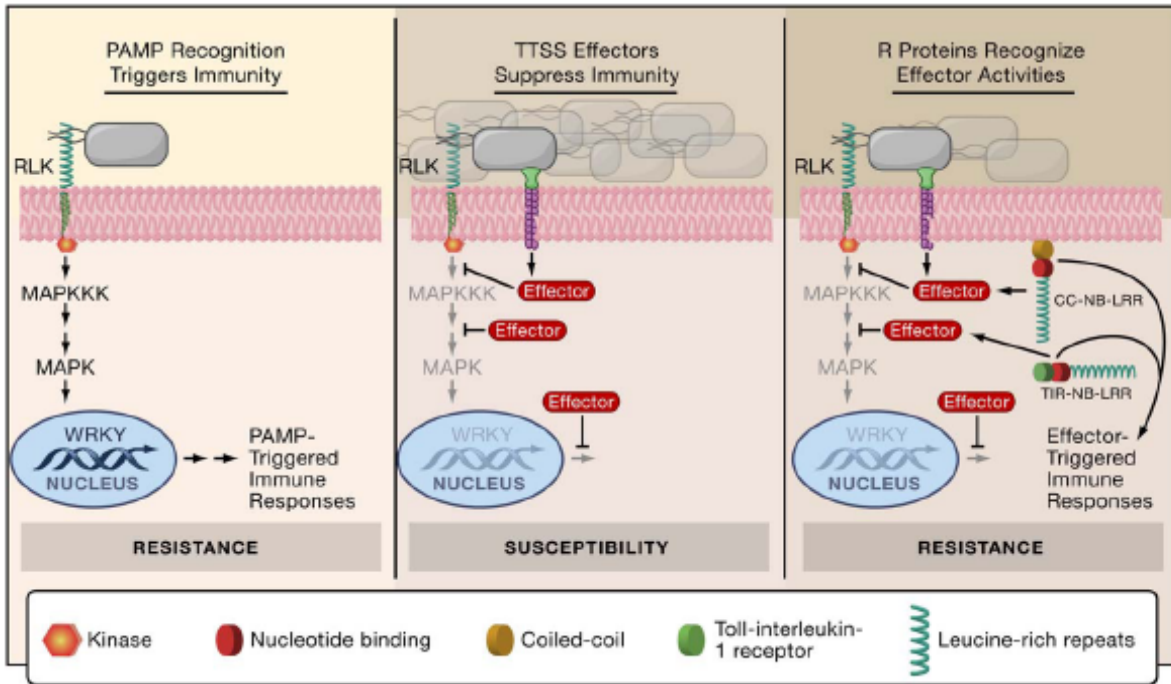


Figure 1.14 : Modèle de l'évolution de la résistance des plantes aux bactéries (d'après Chisholm *et al.*, 2006)

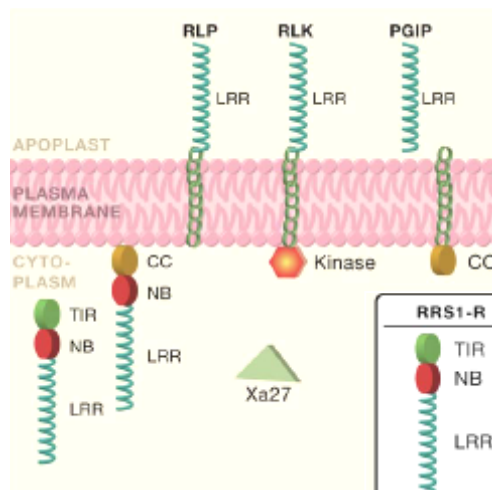


Figure 1.15 : Schéma représentant les différentes classes de protéines de résistance (voir le texte pour les abréviations) (d'après Chisholm *et al.*, 2006).

protéobactérie) (Carrillo *et al.*, 2004) ou chez *Bacillus thuringiensis* (Firmicutes) (Ghelardi *et al.*, 2002).

D'autres liens entre le système flagellaire et le système de virulence sont décrits. Ainsi, bien que le T3SS flagellaire ait surtout un rôle dans la mobilité, il peut être utilisé comme système d'export de protéines de virulence. Chez *Yersinia enterocolitica*, le flagelle sécrète la phospholipase YplA (Young *et al.*, 1999). Chez *Campylobacter jejuni*, il sécrète des protéines d'invasion et la protéine FlaC impliquée dans l'adhésion (Song *et al.*, 2004). Enfin chez *S. enterica*, deux effecteurs peuvent être sécrétés par le flagelle plutôt que par le T3SS de virulence (Lee et Galan, 2004).

Les relations entre les deux systèmes, du point de vue de l'évolution, font débat. Soit le T3SS lié à la virulence dérive du système flagellaire, soit le T3SS et le système flagellaire dérivent d'un ancêtre commun. Les arguments en faveur de la première hypothèse reposent sur l'ubiquité du flagelle alors que la distribution du T3SS est limitée chez les bactéries (Troisfontaines et Cornelis, 2005). Les analyses cladistiques font pencher pour la seconde hypothèse. La présence de caractères partagés est considérée comme un bon indicateur de l'évolution à partir d'un ancêtre commun. De plus, il est difficile d'imaginer comment un système flagellaire, dont les gènes sont répartis en plusieurs clusters, pourrait être l'ancêtre du T3SS lié à la virulence, dont les gènes sont regroupés sur un seul cluster. Le débat se poursuit : Liu et Ochman (2007) ont proposé que les gènes flagellaires aient été assemblés progressivement, via la duplication et la diversification de gènes flagellaires.

3 MECANISMES DE L'INTERACTION PLANTE-BACTERIE CONDUISANT A LA COMPATIBILITE

La plupart des plantes sont résistantes à la plupart des microorganismes potentiellement pathogènes. Elles possèdent des mécanismes de défense physiques pré-formés (cuticule, mur cellulaire) ou biochimiques constitutifs (composés antimicrobiens) (Thordal-Christensen, 2003), qui empêchent l'invasion d'un pathogène potentiel (interaction non hôte). Cependant ces barrières peuvent être surmontées par certains pathogènes (interaction hôte). Si la plante reconnaît l'envahisseur, l'induction rapide de réactions de défense par la plante (résistante) peut empêcher le bioagresseur de se développer : c'est l'interaction incompatible. Par contre, si la plante (sensible) est incapable de reconnaître le pathogène ou si elle y répond trop lentement, la maladie se propage : c'est l'interaction compatible.

3.1 LA RESISTANCE DES PLANTES

On distingue actuellement deux niveaux de résistance chez les plantes (figure 1.14) (pour revues, Abramovitch *et al.*, 2006 ; Chisholm *et al.*, 2006 ; Jones et Dangl, 2006).

La résistance peut être non spécifique : elle résulte de la reconnaissance d'éliciteurs généraux portés par le pathogène ou bien sécrétés par lui, appelés MAMPs (microbe-associated molecular pattern) et qui nous concernent ici. Ces éliciteurs peuvent aussi être issus de la dégradation des parois de la plante ou du pathogène.

La résistance peut aussi être spécifique : elle est alors génétiquement contrôlée par des gènes de résistance R chez la plante et des gènes d'avirulence Avr chez le pathogène. C'est le concept de l'interaction « gène-pour-gène » de Flor (1971).

Différents types de récepteurs sont impliqués dans la perception du pathogène, tous cependant possèdent un domaine LRRs (leucine rich repeats) (figure 1.15, Chisholm *et al.*,

2006). On distingue les récepteurs avec des LRRs extracellulaires (e). Il en existe trois sous-classes : les receptor-like proteins (ou RLPs), les receptor-like kinases (ou RLKs) et les polygalacturonase-inhibiting proteins (ou PGIPs). La plupart de ces récepteurs, appelés PRRs (pattern recognition receptors), reconnaissent les MAMPs. D'autres récepteurs sont intracellulaires, de type NB-LRR (nucleotide binding-leucine rich repeat). Ceux-ci peuvent posséder un domaine N-terminal coiled-coiled (CC) ou Toll-interleukin-1 récepteur (TIR). Cette structure est celle de la plupart des protéines R identifiées à ce jour mais il existe des protéines R avec des domaines différents (Deslandes *et al.*, 2003 ; Tameling et Takken, 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte environ 600 protéines RLK (Shiu *et al.*, 2004), 57 RLP (Wang *et al.*, 2008) et plus de 149 NB-LRR (Belkadir *et al.*, 2004).

3.1.1 LA RESISTANCE NON SPECIFIQUE, LIEE AUX MAMPs

Les MAMPs appelés aussi PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) sont des molécules conservées chez les microorganismes et absentes chez l'hôte. Le terme MAMP est préféré puisque des microorganismes non pathogènes possèdent eux aussi de telles molécules. Les MAMPs sont par ailleurs indispensables à la survie de l'agent pathogène. Ils sont de nature diverse : lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif (Dow *et al.*, 2000) ; flagelline (Felix *et al.*, 1999), facteur d'élongation (EF-Tu) (Kunze *et al.*, 2004) ou cold-shock protéines d'eubactéries (Felix et Boller, 2003) ; peptidoglycanes des bactéries à Gram positif (Gust *et al.*, 2007) ou à Gram négatif (Erbs *et al.*, 2008) ; glycanes (Sharp *et al.*, 1984), chitine (Ren et West, 1992) ou ergostérol de champignons (Lochman et Mikes, 2006). Suite à la reconnaissance de MAMPs, la plante va exprimer des réactions de défenses de nature similaire bien que les MAMPs soient de composition très différente. Ces réactions de défense comprennent des variations de concentration du calcium cytoplasmique, l'activation de cascades MAPK, la production de phytoalexines, de formes actives d'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO), un dépôt de callose pour renforcer la paroi ou encore la fermeture des stomates pour empêcher l'entrée de pathogène et l'activation de PR protéines (He *et al.*, 2007).

3.1.1.1 LES MAMPs DE BACTERIES A GRAM NEGATIF

3.1.1.1.1 LE LPS

Le LPS peut être reconnu par les plantes et induire des réactions de défense puisqu'il n'a pas d'homologue structural chez ces organismes multicellulaires. Le lipide A, le core ainsi que la chaîne O possèdent des propriétés élicitrices (Bedini *et al.*, 2005 ; Braun *et al.*, 2005 ; Silipo *et al.*, 2005).

Chez le tabac, le LPS de *Burkholderia cepacia* induit la synthèse de protéines PR (Coventry et Dubery, 2001) et augmente la perméabilité membranaire des cellules (Gerber *et al.*, 2004) ; il induit également une modification de l'état de phosphorylation de plusieurs protéines potentiellement impliquées dans la transduction de signaux (Gerber *et al.*, 2006). Le LPS de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* induit un burst oxydatif chez des cultures cellulaires de tabac (Meyer *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, le LPS de bactéries non pathogènes, phytopathogènes ou pathogènes d'animaux induit une production rapide de NO et l'expression de gènes PR (Zeidler *et al.*, 2004). De même chez le riz (Desaki *et al.*, 2006), le LPS de bactéries pathogènes de plantes ou non pathogènes induit la production de formes actives d'oxygène et l'expression de réactions de défense. Le LPS de différents *Pseudomonas* est aussi impliqué dans l'induction de la résistance systémique chez le radis (Leeman *et al.*, 1995), chez *Arabidopsis thaliana* (Van Wees *et al.*, 1997), chez le haricot et la tomate

(Meziane *et al.*, 2005). Le LPS de *Rhizobium etli* induit la résistance systémique chez *Solanum tuberosum* (Reitz *et al.*, 2000).

Le LPS peut également potentialiser l'expression de gènes et participer à l'accumulation de composés phénoliques antibactériens. Chez le poivron, un prétraitement avec du LPS de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* permet d'obtenir une accumulation plus précoce et plus importante des composés phénoliques tels que la coumaroyl tyramine et la feruloyl tyramine lors de l'inoculation subséquente par *X. axonopodis* pv *vesicatoria/avrBs1* (interaction incompatible gène pour gène) ou par *X. c.* pv *campestris* (interaction incompatible non hôte) comparé à l'inoculation seule. Les effets sont cependant plus précoces dans l'interaction gène pour gène (Newman *et al.*, 2002). Par contre, le LPS seul n'induit pas l'accumulation des composés phénoliques. Le prétraitement au LPS dans l'interaction incompatible induit également fortement plusieurs gènes de PR protéines (Newman *et al.*, 2002). Dans l'interaction compatible, le prétraitement au LPS provoque également une accumulation de composés phénoliques mais à un niveau très faible.

Le LPS peut retarder ou empêcher la réaction d'hypersensibilité (HR) du tabac induite par une bactérie en situation incompatible. La réaction d'hypersensibilité est généralement associée à une diminution du nombre de bactéries viables. Chez le poivron, le prétraitement au LPS de *X. c.* pv *campestris* supprime la HR (Newman *et al.*, 1997) et modifie la cinétique de croissance de la bactérie *X. c.* pv *campestris* (situation incompatible) : celle-ci se maintient alors au lieu de chuter (Newman *et al.*, 2002). De façon similaire, un prétraitement de feuilles de tabac avec du LPS de *Pseudomonas syringae* pv *aptata* empêche la HR normalement induite par la bactérie incompatible *Erwinia amylovora* (Minardi, 1995). De plus, Minardi démontre que c'est l'expression des gènes *hrp* d'*E. amylovora*, réduite dans des plants de tabac prétraités avec le LPS, qui empêche cette bactérie de provoquer la HR. Les effets du LPS en situation compatible (*Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria/* poivron) sont moins prononcés, la croissance de la bactérie virulente peut être néanmoins atténuée (Newman *et al.*, 2002).

3.1.1.1.2 LA FLAGELLINE

Le flagelle bactérien est un long filament hélicoïdal creux, ancré à la surface de la cellule par un moteur et composé de molécules de flagelline. Les extrémités N- et C-terminales de la flagelline sont très conservées et servent à l'assemblage du filament alors que la portion centrale de la flagelline est très variable en taille et en séquence (cf § 2.1.1). L'épitope de la flagelline d'eubactéries qui agit comme éliciteur des réactions de défense sur des cellules de plantes est un motif conservé de 22 acides aminés dans le domaine N-terminal (Felix *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis thaliana*, un peptide de 22 acides aminés appelé Flg22 et correspondant à l'épitope de la flagelline est reconnu par le récepteur FLS2 de type LRR kinase (Gómez-Gómez et Boller, 2000) ce qui entraîne des réactions de défense variées incluant la fermeture des stomates (Melotto *et al.*, 2006), l'activation de MAP kinase (Asai *et al.*, 2002 ; Mészáros *et al.*, 2006) et de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la transcription (Zipfel *et al.*, 2004), l'induction de changements rapides de l'état de phosphorylation des protéines de membrane plasmique (Benschop *et al.*, 2007). Parmi les protéines phosphorylées, on trouve des protéines impliquées dans le burst oxydatif, des kinases, des protéines de transport et de fusion de vésicules comme les syntaxines. Ceci suggère un changement dynamique au niveau des membranes dans la résistance non spécifique, qui prépare les cellules au renforcement de la paroi et à la sécrétion de molécules de défense. En effet, les cellules des plantes attaquées doivent être capable de potentialiser leurs défenses et de fournir par leurs voies de sécrétion (Kwon *et al.*, 2008), les composés de défense au niveau du site de l'attaque par le pathogène. La taille minimale du peptide capable

d'élucider des défenses est de 15 acides aminés. Des peptides tronqués dans leur extrémité C-terminale perdent leur pouvoir éliciteur mais agissent alors comme antagonistes spécifiques de la flagelline (Felix *et al.*, 1999). Deux études récentes ont montré que Flg22 se fixe directement à FLS2 (Chinchilla *et al.*, 2006) et que FLS2 est localisé dans les racines, les tiges et les fleurs mais aussi dans les cellules de l'épiderme foliaire et les cellules de garde des stomates (points d'entrées fréquents des pathogènes) (Robatzek *et al.*, 2006). Cette localisation au niveau des stomates confirme que FLS2 fonctionne à un stade précoce de la détection du pathogène. Elle explique aussi pourquoi des mutants FLS2 d'*Arabidopsis thaliana* sont plus sensibles à *Pseudomonas syringae* pv *tomato* s'il est inoculé par pulvérisation plutôt que par infiltration puisqu'il n'y a plus reconnaissance et activation de la résistance non spécifique (Zipfel *et al.*, 2004).

3.1.1.1.3 AUTRES MAMPs

Un autre MAMP bactérien, l'Elongation Factor Tu (EF-Tu) est reconnu par les cellules d'*Arabidopsis thaliana* (Kunze *et al.*, 2004). EF-Tu est la protéine la plus abondante dans les cellules bactériennes et son rôle est fondamental dans la traduction des protéines dans le cytoplasme. Chez les bactéries phytopathogènes, EF-Tu a été identifié dans le sécrétome de *Xanthomonas campestris* (Watt *et al.*, 2005), *Pseudomonas fluorescens* (Singh *et al.*, 2004) et *Erwinia chrysanthemi* (Kazemi-Pour *et al.*, 2004). Il est aussi associé à la surface de *Mycoplasma pneumoniae* (Dallo *et al.*, 2002) et de *Lactobacillus johnsonii* (Granato *et al.*, 2004) où il joue un rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes des mammifères. L'activité élicitrice se situe dans la partie N-terminale de la protéine et comprend les 18 premiers acides aminés. Chez *Arabidopsis thaliana*, le récepteur de EF-Tu est un récepteur kinase (comme FLS2) appelé EFR (Kunze *et al.*, 2004). La reconnaissance de EF-Tu par EFR provoque la production accrue de formes actives d'oxygène et la synthèse d'éthylène. Bien qu'ils soient perçus par 2 récepteurs distincts, la flagelline et EF-Tu élicitent les mêmes types de réponses chez *Arabidopsis thaliana* : en culture cellulaire, alcalinisation du milieu extracellulaire et augmentation de l'activité kinase ; *in planta*, ralentissement de la croissance du pathogène virulent *P. syringae* DC3000 (Kunze *et al.*, 2004). L'étude du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* au niveau génomique, après traitement par ces 2 MAMPs, montre qu'il n'y aurait pas de gènes spécifiquement régulés par l'un ou l'autre de ces 2 MAMPs (Zipfel *et al.*, 2006).

Les Cold Shock Proteins (CSP) sont décrites comme inducteurs des réactions de défense des Solanacées (Felix et Boller, 2003). Ce sont des petites protéines, d'environ 7,4 kDa, présentes chez de nombreuses bactéries, impliquées dans des processus cellulaires variés tels que la croissance ou la résistance aux stress thermiques. Les CSP se fixent sur les acides nucléiques et ont une fonction de chaperonne et d'anti-terminateur de traduction chez *E. coli* (Bae *et al.*, 2000). Le domaine actif dans l'élicitation des défenses contient un motif conservé chez les CSP d'eucaryotes se liant aux acides nucléiques. De la même façon que Flg22, les peptides de synthèse contenant un motif modifié perdent l'activité élicitrice et deviennent des antagonistes compétitifs pour les éliciteurs de type CSP. L'appartenance des CSPs aux MAMPs font débat : elles sont localisées dans le cytoplasme bactérien et n'ont jamais été décrites comme des protéines pouvant être sécrétées ou exposées en surface de cellule, et par conséquent, il est peu probable qu'elles puissent être directement détectées par les PRRs de la plante.

3.1.1.2 LES RECEPTEURS DES MAMPs

Un concept commun à la recherche sur le végétal et à celle sur l'animal propose que les gènes de l'hôte codant les récepteurs de MAMP sont relativement stables et héréditaires, de

sorte que la capacité à détecter rapidement les infections microbiennes est préservée et transmise de générations en générations (Janeway et Medzhitov, 2002).

Chez les vertébrés, les PRRs les plus importants sont les Toll-like receptors (TLRs). La fonction primaire des TLRs est de fournir une protection immédiate contre les pathogènes en activant notamment la voie du complément, la production de cytokines inflammatoires et de composés antimicrobiens ainsi que la phagocytose (Pasare et Medzhitov, 2004 ; Akira *et al.*, 2006).

Chez les plantes, les moyens de défense sont une résistance non spécifique présente dans chaque cellule. A ce jour, la fonction de plusieurs PRRs a été définie chez les plantes (figure 1.15): LeEix est un RLP chez la tomate qui reconnaît une xylanase dérivée de champignon (Ron et Avni, 2004) ; LeFLS2 est un RLK de tomate qui perçoit la flagelline (Robatzek *et al.*, 2007) ; EFR et FLS2 sont des RLK d'*Arabidopsis thaliana* qui perçoivent respectivement EF-Tu (Zipfel *et al.*, 2006) et la flagelline (Gomez-Gomez et Boller, 2000 ; Bauer *et al.*, 2001). Lorsque des mutants *fls2* d'*Arabidopsis thaliana* sont traités avec des extraits bactériens contenant de la flagelline, la croissance du pathogène *P. syringae* DC3000 est réduite malgré l'absence du récepteur de la flagelline. Ceci montre que d'autres MAMPs présents dans les extraits sont reconnus par d'autres récepteurs (Zipfel *et al.*, 2004).

Robatzek *et al.* (2006) ont montré que FLS2 subit une endocytose après perception de Flg22. Le récepteur s'accumule alors dans des vésicules intracellulaires. L'internalisation de FLS2 nécessite une activité kinase. L'endocytose semble jouer un rôle non seulement dans l'immunité de base due aux MAMPs mais aussi dans l'immunité due aux effecteurs. Par exemple chez la tomate, les RLPs Ve (qui conditionnent la résistance à *Verticillium*), et Cf4 et Cf9 (qui interviennent dans la résistance à *Cladosporium fulvum* via Avr4 et Avr9), possèdent la signature YxxΦ, impliquée dans l'endocytose, au niveau de la queue cytoplasmique (Kawchuk *et al.*, 2001). La présence de cette signature, chez LeEix2 et EFR (Ron et Avni, 2004 ; Zipfel *et al.*, 2006), suggère que le processus d'endocytose des récepteurs de la résistance non spécifique des plantes pourrait être un phénomène général de la signalisation et de la régulation des défenses des plantes (Robatzek, 2007).

3.1.2 LA RESISTANCE SPECIFIQUE LIEE A UNE INTERACTION DE TYPE R/AVR

Les plantes possèdent un système de résistance spécifique reconnaissant l'action des effecteurs de type III ou ces effecteurs eux-mêmes. Cette reconnaissance est génétiquement déterminée par la complémentarité d'un produit d'un gène d'avirulence (Avr) chez le pathogène avec un produit d'un gène de résistance (R) chez la plante. L'absence ou la déficience de l'un de ces gènes conduit à la maladie (compatibilité).

3.1.2.1 LES EFFECTEURS PRODUITS PAR LES GENES D'AVIRULENCE (EFFECTEURS AVR)

Les infections par des bactéries à Gram négatif exposent les plantes à une large variété d'effecteurs de type III. Ces effecteurs contribuent à la virulence du pathogène, souvent en mimant ou en inhibant des fonctions cellulaires des eucaryotes. Cependant, si ces effecteurs sont reconnus par l'hôte, ils peuvent induire des réactions de défense (Jones et Dangl, 2006). La reconnaissance R/Avr conduit à une réaction qui culmine souvent en HR suite à la production rapide de formes actives d'oxygène (ROS, NO) pouvant avoir un effet antimicrobien direct, et servant d'autre part de signal d'activation pour d'autres réactions de défense (Lamb et Dixon, 1997). Cette réaction est plus rapide que la reconnaissance des MAMPs. L'HR ne s'étend pas au-delà des cellules infectées au niveau desquelles elle retarde la croissance du pathogène. La résistance R/Avr est associée également à des dépôts de callose, à l'expression de protéines PR et à la SAR (Durrant et Dong, 2004 ; Van Loon *et al.*, 2006a).

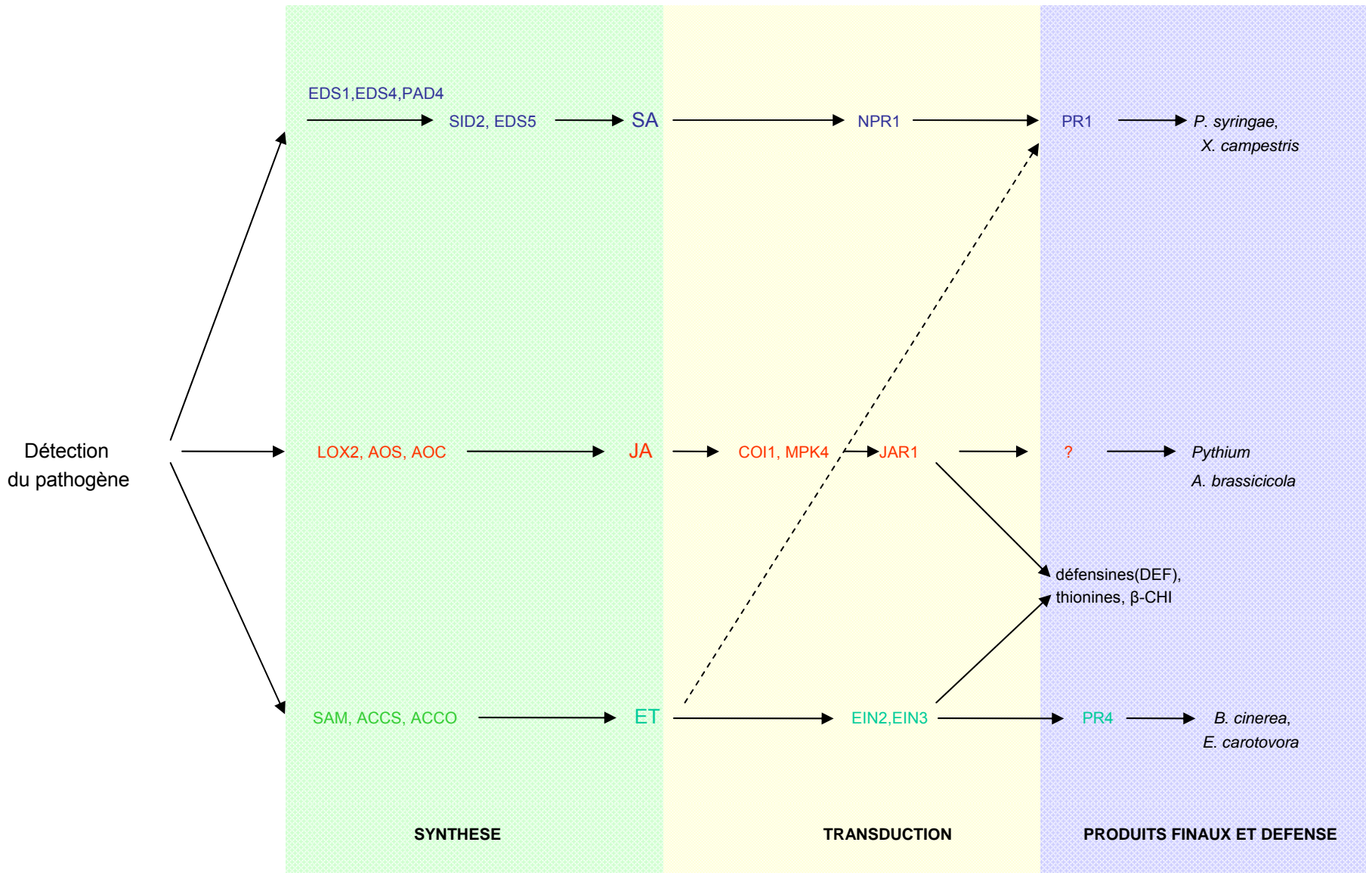


Figure 1.16 : Voies de défense chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Kunkel et Brooks, 2002). Voir le texte pour les abréviations.

3.1.2.2 LES RECEPTEURS DES EFFECTEURS DE TYPE AVR

De nombreux produits des gènes de résistance sont de type NB-LRR (Jones et Dangl 2006 ; Tameling et Takken, 2008). Chaque récepteur peut reconnaître un ou plusieurs effecteurs. Les produits des gènes de résistance peuvent ne pas se lier directement aux produits des gènes d'avirulence, mais détecter des altérations de protéines « hôtes », causées par les produits du pathogène. C'est l'hypothèse des cellules de garde (van der Hoorn *et al.*, 2002). La preuve de la reconnaissance moléculaire indirecte du pathogène, chez *Arabidopsis thaliana*, a été fournie par les travaux de Shao *et al.* (2003), avec AvrPphB, une cystéine protéase exprimée par *P. syringae*. Cette étude a démontré que AvrPphB clivait PBS1, une protéine de l'hôte. Ce clivage est perçu par la protéine de résistance RPS5, qui active les mécanismes de résistance. Il en est de même pour la résistance Rpm1/AvrRpm1 (même pathosystème) dont le mécanisme de reconnaissance est indirectement activé par la modification de l'état de phosphorylation de RIN4 (Mackey *et al.*, 2002).

3.1.3 LES REACTIONS DE DEFENSE

Les plantes peuvent activer, outre des défenses au niveau local, des réactions de résistance systémique, dans la plante entière. Ces réactions de défense non spécifiques en des sites éloignés du site initial d'infection permettent une résistance accrue lors de la confrontation avec d'autres pathogènes. Différents types de résistance systémique sont décrits chez les plantes : la SAR (systemic acquired resistance) causée par un pathogène dont l'infection est généralement limitée par une HR (Durrant et Dong, 2004), l'ISR (induced systemic resistance) induite par des rhizobactéries non pathogènes (Van Loon *et al.*, 1998) ou l'IR (induced resistance) provoquée par des blessures d'insectes (Kessler et Baldwin, 2002). Plusieurs phytohormones interviennent dans la mise en place de ces défenses dont l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Glazebrook, 2005 ; Van Loon *et al.*, 2006b) pour les mieux connues. D'autres hormones sont impliquées mais moins souvent citées : l'acide abscissique (ABA), les brassinostéroïdes et l'auxine (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

Il est généralement admis que les parasites biotrophes sont plus sensibles aux défenses SA-dépendantes et que les nécrotrophes sont plus sensibles aux défenses JA- et ET-dépendantes (figure 1.16). Toutefois ces voies de signalisation peuvent interagir, de façon antagoniste ou synergique (Glazebrook, 2005). Plusieurs exemples suggèrent que cette régulation s'exerce par une modulation différentielle de l'activité de facteurs de transcription par ces différentes hormones. Ainsi, l'antagonisme entre les voies SA et JA nécessite l'activation de protéines comme NPR1 ou WRKY70 qui activent les gènes SA-dépendants et répriment les gènes JA-dépendants (Spoel *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2004). La coopération entre JA et ET pourrait être expliquée par leur action concertée sur ERF1 (ethylene response factor), qui induit l'expression de gènes de défense et la résistance des plantes (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002 ; Lorenzo *et al.*, 2003).

La relation entre les défenses induites par les MAMPs et les réponses provoquées via SA, JA ou ET ne sont pas toujours claires. Certaines études suggèrent que les MAMPs stimulent des voies de défense indépendantes du SA, JA ou ET : c'est le cas de la résistance à *Pseudomonas syringae* induite par un pré-traitement d'*Arabidopsis thaliana* avec Flg22 (Zipfel *et al.*, 2004). D'autres études rapportent une stimulation de la production de JA et de ET et de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces hormones ou codant des protéines PR liées à des réponses SA-dépendantes (Gomez-Gomez *et al.*, 1999 ; Kunze *et al.*, 2004, Moscattiello *et al.*, 2006). Une étude récente montre l'augmentation du SA en réponse à Flg22 chez *Arabidopsis thaliana* (Tsuda *et al.*, 2008)

3.1.3.1 LA VOIE DE L'ACIDE SALICYLIQUE

SA serait synthétisé chez les plante selon 2 voies : soit à partir de la phénylalanine (voie des phénylpropanoïdes), soit à partir du chorismate via l'isochorismate (Wildermuth *et al.*, 2001, Loake et Grant, 2007). Le réseau de signalisation SA-dépendant a été identifié chez *A. thaliana* : deux gènes seraient impliqués dans la synthèse de SA (*sid2* [SA induction déficient] et *eds5* [enhanced disease susceptibility], trois autres gènes réguleraient cette synthèse (*eds1*, *eds4* et *pad4* [phytoalexin déficient]). En aval, il semble qu'il y ait deux voies possibles d'activation. L'une implique la protéine de régulation NPR1. Chez *Arabidopsis thaliana*, les changements de statut rédox cellulaire induit par SA régulent la localisation nucléocytoplasmique de NPR1. Une fois dans le noyau, NPR1 contrôle l'expression de gènes de protéines PR comme la PR1 ou la PR5. NPR1 régule également des gènes impliqués dans la sécrétion de protéines (Wang *et al.*, 2005). Spoel et ses collaborateurs (2007) ont montré que NPR1 avait un rôle crucial dans la signalisation SA/JA en réprimant la voie JA-dépendante. L'autre voie est indépendante de NPR1 et impliquerait l'activation de facteurs de transcription de type Whirly (Durrant et Dong, 2004 ; Eulgem, 2005).

3.1.3.2 LA VOIE DE L'ACIDE JASMONIQUE

JA existe sous des formes variées dont le méthylester (MeJA) (Farmer et Ryan, 1990), ou des formes conjuguées aux acides aminés. Ces différentes formes sont généralement appelés jasmonates, et appartiennent à la famille des oxylipines. Ce sont des régulateurs cellulaires impliqués dans divers processus comme la croissance des racines, la production de pollen et la résistance aux insectes et aux microorganismes pathogènes (Creelman et Mullet, 1997 ; Kessler et Baldwin, 2002 ; Kang *et al.*, 2006). Les jasmonates sont synthétisés dans les plantes par la voie des octadécanoïdes. Leur synthèse dérive de l'acide α -linoléique (18 : 3) (α -LeA) relargué par les membranes des chloroplastes, sous l'action de phospholipases. L'acide linoléique est oxydé par les lipoxygénases (LOXs) et ensuite converti en acide 12-oxo-phytodienoïque (12-oxo-PDA) par l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC). JA est synthétisé à partir du 12-oxo-PDA et catabolisé en MeJA, sa forme volatile (Creelman et Mullet, 1997). JA induit des gènes de défense comme les défensines (PDF1.2), les β -chitinases, les thionines (Epple *et al.*, 1995 ; Thomma *et al.*, 1998 ; Kunkel et Brooks, 2002) ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires antimicrobiens (alcaloïdes, terpènes...) (Blechert *et al.*, 1995) en agissant sur des facteurs de transcription ou sur la stabilité de protéines (pour revue, Pauw et Memelink, 2005). La transduction du signal se ferait via COI1 (coronatine insensitive), puis via JAR1 (jasmonic acid resistant) (Turner *et al.*, 2002).

3.1.3.3 LA VOIE DE L'ETHYLENE

L'éthylène est une molécule gazeuse impliquée dans différents processus de développement de la plante comme la sénescence des fleurs, le mûrissement des fruits climactériques et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Czarny *et al.*, 2006 ; Van Loon *et al.*, 2006b).

La biosynthèse de l'éthylène nécessite la S-adénosylméthionine (SAM), abondante dans les tissus des plantes. La conversion de la SAM en 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) est catalysée par l'ACC synthase. L'ACC est ensuite oxydé en éthylène par l'ACC oxydase (Yang et Hoffman, 1984). Les éléments essentiels à la perception de l'éthylène et à la transduction du signal sont conservés parmi les plantes, ce qui suggère leur importance dans leur développement et leur survie. On connaît cinq protéines réceptrices de l'éthylène chez

Arabidopsis thaliana : ETR1 (ethylene response) et ETR2, ERS1 (ethylene response sensors) et ERS2, et EIN4 (ethylene insensitive) (Guo et Ecker, 2004). L'expression de *ers1*, *ers2* et *etr2* est induite par l'éthylène. La voie de l'éthylène est négativement régulée : en présence d'éthylène, le récepteur subit un changement de conformation et interagit avec CTR1 (constitutive triple response 1), un régulateur négatif de la voie de transduction contrôlé par l'éthylène. L'inactivation de CTR1 en présence d'éthylène lève l'inhibition de la cascade kinase et aboutit à l'activation de EIN2, une protéine clé dans la régulation positive de la voie de signalisation par l'éthylène (Stepanova et Alonso, 2005). EIN2 active des facteurs de transcription comme ERF1.

3.2 MECANISMES DE LA SUPPRESSION DE LA RESISTANCE CONDUISANT A LA COMPATIBILITE

La co-évolution de l'interaction plante-microbe a conduit certains agents pathogènes à acquérir des moyens pour supprimer la résistance non spécifique, en interférant avec la reconnaissance au niveau de la membrane plasmique ou en sécrétant des protéines effecteurs dans le cytoplasme des plantes devenues hôtes (Abramovitch et Martin, 2004). Ces plantes sont alors devenues aptes à la colonisation par le pathogène et donc sensibles à la maladie (pour revue, Chisholm *et al.*, 2006).

3.2.1 EVASION DE LA RECONNAISSANCE NON SPECIFIQUE

Certains pathogènes ont mis au point des stratégies de contournement des défenses en modifiant leurs MAMPs, par exemple en variant leur flagelline, en masquant ou en perdant leurs flagelles. Ainsi une variabilité de la séquence N-terminale de la flagelline a été détectée parmi différentes souches d'un même pathovar de *X. campestris* pv. *campestris*. Pourtant la variabilité de la flagelline est limitée par des contraintes structurales pesant sur les monomères de cette protéine pour la constitution du filament flagellaire. Ce polymorphisme se traduit par une élicitation différentielle des réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana* (Sun *et al.*, 2006). Par ailleurs, Takeuchi et ses collaborateurs (2003) ont montré que des modifications post-traductionnelles de la flagelline comme la glycosylation intervenaient dans la spécificité d'hôtes. Ces variations dans la glycosylation de la flagelline pourraient refléter un mécanisme d'évasion des défenses de l'hôte.

Il a été proposé que les exopolysaccharides ont non seulement un rôle dans la protection contre un stress osmotique ou contre des composés antimicrobiens, mais interviennent aussi dans le camouflage des épitopes bactériens susceptibles d'induire des réactions de défense (D'Haeze et Holsters, 2004).

3.2.2 EVASION DE LA RECONNAISSANCE SPECIFIQUE

Il existe de nombreux changements adaptatifs au niveau des effecteurs qui peuvent permettre l'évasion de la détection par l'hôte. Un effecteur peut être perdu ou dégénéré, sa fonction peut être compensée par celle d'un autre effecteur.

Ainsi la perte d'un effecteur a été mise en évidence chez *P. syringae* pv. *phaseolicola*, lorsque la bactérie est face à une pression de sélection consistant à la soumettre à plusieurs passages sur feuilles de haricot résistant, où elle subit une HR (réaction gène pour gène). L'interaction est passée d'une réaction incompatible, de type R/Avr, à une réaction compatible (Pitman *et al.*, 2005).

Chez *Pseudomonas syringae*, AvrRpt2 modifie une cible commune avec AvrRpm1 (RIN4) ce qui bloque l'activation de RPM1, une protéine de résistance de type NB-LRR (Kim *et al.*, 2005).

La pathoadaptation est aussi un aspect important du changement intervenant dans l'interaction plante-pathogène. La pathoadaptation décrit le processus de sélection sur le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs) ainsi que les insertions/délétions survenant chez des gènes impliqués dans la maladie comme les adhésines (Sokurenko *et al.*, 1998 ; Weissman *et al.*, 2003). Chez *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, Yang et ses collaborateurs (2005) ont montré que des mutations dans la région répétée de l'effecteur AvrXa7 (famille des effecteurs AvrBs3) conduisent à l'altération de sa fonction et donc à la suppression de la reconnaissance spécifique. Un autre exemple récent a été décrit chez *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* suite à l'introduction du gène de résistance Bs2 chez des variétés cultivées de tomate. Cette bactérie sécrète l'effecteur AvrBs2. La pression de sélection créée par l'introduction de Bs2 a conduit à l'émergence de formes mutées de *avrBs2* portant des insertions/délétions de répétitions de 5 pb ainsi que des SNPs qui permettent à la bactérie d'échapper à la reconnaissance par Bs2 (Wichmann *et al.*, 2005). Chez *P. syringae*, plusieurs variants alléliques naturels de l'effecteur HopX ont été identifiés dont certains ont perdu leur rôle de facteur d'avirulence, conduisant ainsi à une interaction compatible (Stevens *et al.*, 1998).

Le transfert horizontal de gènes est également un moyen d'évoluer pour les effecteurs et les interactions hôte-pathogène. La famille d'effecteurs HopZ chez *P. syringae* par exemple, comprend HopZ1 dont il existe plusieurs formes alléliques ou dégénérées, et des homologues de HopZ2, HopZ3 importées d'autres bactéries phytopathogènes vers *P. syringae* par transfert horizontal, ce qui autorise l'évasion de la détection par l'hôte, tout en maintenant un rôle dans la virulence (Ma *et al.*, 2006).

3.2.3 REPRESSION DES REACTIONS DE DEFENSE

Les effecteurs bactériens contribuent à la virulence en inhibant ou en mimant des fonctions des cellules eucaryotes. Ainsi, une souche de *P. syringae* mutée dans le T3SS et incapable de délivrer ses effecteurs, mais porteuse de MAMPs, induit essentiellement les mêmes gènes que Flg22 (Tao *et al.*, 2003 ; Thilmony *et al.*, 2006), mais plus rapidement et plus fortement que la souche sauvage. Ceci montre que les effecteurs de type III diminuent la résistance provoquée par les MAMPs. Les cibles des effecteurs sont variées et concernent soit les défenses basales non spécifiques, soit les voies de signalisation intercellulaire. Les effecteurs peuvent provoquer ainsi l'ouverture des stomates (Melotto *et al.*, 2006), la perturbation du transport vésiculaire dans la cellule hôte (Nomura *et al.*, 2006), l'inhibition des dépôts de callose (défense basale) (Hauck *et al.*, 2003 ; DebRoy *et al.*, 2004), la suppression de l'HR (Abramovitch *et al.*, 2003 ; Espinosa *et al.*, 2003 ; Jamir *et al.*, 2004), l'inhibition de l'expression des gènes PR (Bretz JR *et al.*, 2003), la perturbation des voies de signalisation SA et JA dépendantes (Kloek *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2003) (pour revue, Grant *et al.*, 2006 et Abramovitch *et al.*, 2006).

3.3 CAS D'ERWINIA AMYLOVORA

Concernant la résistance non spécifique, aucune donnée n'est disponible sur l'effet des MAMPs d'*E. amylovora* sur le Pommier ni sur leurs récepteurs chez cette plante hôte.

Il n'y a pas à ce jour de résistance spécifique décrite pour ce pathosystème puisqu'aucune fonction d'avirulence n'a été établie pour les différents effecteurs d'*E. amylovora*, bien que trois d'entre eux présentent des homologies avec des protéines d'avirulence d'autres espèces bactériennes : AvrRpt2_{Ea} (Eop4) présente une homologie avec AvrRpt2 chez *P. syringae* (Zhao *et al.* 2006) ; DspA/E est homologue à AvrE (*P. syringae*) (Gaudriault *et al.*, 1997 ; Bogdanove *et al.*, 1998) et Eop3 est homologue aux effecteurs de type III de la famille HopX (AvrPphE) (Nissinen *et al.*, 2007). Chez le pommier, quatre

protéines de type LRR RLKs ont été identifiées (Meng *et al.*, 2006) qui interagissent avec l'effecteur DspA/E d'*E. amylovora* mais qui ne conduisent pas à la résistance. Une conséquence possible de ces interactions pourrait être de bloquer la transduction de signaux menant à une réaction de défense. Un mécanisme de suppression de défense locale a été mis en évidence dans l'interaction *E. amylovora*/ Pommier puisque DspA intervient dans la suppression des dépôts de callose sur plante hôte (DebRoy *et al.*, 2004).

A ce jour, aucun autre récepteur d'effecteur de la bactérie (ou aucune de leur cible), pouvant jouer le rôle de produit de gène de résistance, n'a été décrit.

On commence à connaître quelques mécanismes de défenses systémiques du Pommier induites par *E. amylovora*. Cette bactérie semble induire, chez un génotype sensible, les voies de l'acide salicylique et de l'éthylène, ainsi que différentes protéines PR, elle réprimerait au contraire la voie de l'acide jasmonique (Dugé, communication personnelle). D'autres voies impliquées dans le métabolisme secondaire, comme par exemple celle des phénylpropanoïdes sont réprimées par la bactérie (Venisse *et al.*, 2002). Ces régulations positives comme négatives, sont moins marquées dans les génotypes résistants.

Il n'y a pas de mécanisme d'évasion de la reconnaissance connu chez *E. amylovora*. Cependant la mobilité de cette bactérie n'est pas observée dans les espaces intracellulaires : il semble donc que la bactérie perde ses flagelles après son entrée dans les tissus hôtes (Raymundo et Ries, 1981) ce qui pourrait correspondre à un mécanisme d'évasion de la reconnaissance par la plante.

4. MODULATION DE L'INTERACTION *ERWINIA AMYLOVORA*/ POMMIER PAR DES MUTANTS *HRP* ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Des travaux déjà anciens ont montré qu'il est possible de bloquer l'infection de génotypes sensibles de Pommier par *E. amylovora*, à l'aide de variants avirulents sauvages du pathogène (§ 1.1.2.2). Ainsi, l'application de ces variants quelques heures avant ou en même temps que la souche virulente, dans un rapport de concentration avirulent/virulent = 10/1, réduit voire empêche la maladie. L'intérêt de ces variants comme outil de lutte contre la maladie était toutefois limité car on ne sait rien de leur stabilité génétique donc des risques de réversion vers une forme pathogène. Afin d'approfondir la connaissance des mécanismes de cette interaction tripartite modulant l'établissement de la compatibilité, une approche a été entreprise avec une gamme de mutants d'*E. amylovora*, génétiquement bien caractérisés.

Les travaux menés au laboratoire (Tharaud *et al.*, 1997 ; Faize *et al.*, 1999 ; Faize *et al.*, 2006), ont conduit aux résultats suivants :

- il est possible de bloquer la maladie provoquée par *E. amylovora* sur des plantules de Pommier à l'aide de mutants avirulents du T3SS. Parmi ces mutants, les mutants *hrp* de régulation ont une aptitude à la protection supérieure à celle des mutants de sécrétion.
- l'analyse de la dynamique des populations bactériennes inoculées montre que la protection est liée à l'absence de multiplication de la souche virulente.
- des enzymes de défense (PAL, POD) sont activées de façon différente par un mutant de régulation *hrpS* et un mutant de sécrétion *hrcV*.
- aucun antagonisme direct entre souches sauvages et mutants, en co-culture *in vitro* sur milieu riche n'a pu être révélé.
- la souche sauvage et un mutant de régulation *hrpL*, inoculés en mélange en même temps dans des tissus de feuilles de Pommier, apparaissent 3 jours après inoculation, localisés dans des zones séparées des tissus foliaires.

- des études préliminaires sur le sécrétome d'*E. amylovora* et de ses mutants *hrp* permettent de détecter une plus grande quantité de flagelline chez un mutant *hrpL* que chez la souche sauvage ou chez le mutant *hrpS*.

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à proposer différentes hypothèses parmi lesquelles :

- l'existence d'un antagonisme entre le mutant de régulation et la souche sauvage dans l'apoplasme (milieu *hrp*-inducteur), non révélé dans les expérimentations antérieures utilisant un milieu riche (milieu non *hrp*-inducteur),
- des réactions de défenses induites dans la plante par les mutants de régulation différentes de celles induites par le mutant de sécrétion.
- la présence différentielle d'éliciteurs bactériens ou « MAMPs » chez les mutants protecteurs

Les objectifs de la thèse ont donc été les suivants :

- première hypothèse : nous avons recherché un antagonisme éventuel sur milieu *hrp*-inducteur entre les différents mutants et la souche sauvage. Pour cela nous avons eu 2 approches : nous avons étudié la dynamique des populations bactériennes, et nous avons également cherché si l'expression des gènes *hrp* chez la souche sauvage était modifiée lors d'une co-culture avec les mutants,
- seconde hypothèse : nous avons essayé de mettre en évidence des réactions de défense de la plante pouvant être impliquées dans la protection induite par les mutants, en ciblant les voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène ainsi que la voie des phénylpropanoïdes.
- troisième hypothèse : nous nous sommes intéressés à la production de MAMPs chez *E. amylovora*, et particulièrement à la flagelline. Nous avons étudié le rôle de la flagelline dans la protection, ce qui nous a conduit à analyser le rôle de HrpL sur l'expression du système flagellaire. Grâce à l'accessibilité *in silico* de la séquence du chromosome d'*E. amylovora*, nous avons pu mettre en évidence un second système flagellaire chez *E. amylovora*. L'expression des gènes flagellaires des deux systèmes a été comparée chez les mutants de régulation et de sécrétion. Enfin, nous avons recherché, avec et sans *a priori*, d'autres gènes non-*hrp* régulés par HrpL, et potentiellement impliqués dans la protection.

Tableau II.1 : Souches bactériennes et plasmides utilisés

Souches	Caractéristiques	Référence
(1) CFBP1430	Souche sauvage d' <i>E. amylovora</i> isolée de <i>Crataegus</i> , HR ⁺ , Path ⁺	Paulin et Samson, 1973
(2) CFBP1197	Idem, <i>Crataegus</i> sp.	CFBP*
(3) CFBP1367	Idem, <i>Crataegus oxyacantha</i>	Idem
(4) CFBP2301	Idem, <i>Pyracantha</i> sp.	Idem
(5) CFBP2582	Idem, <i>Pyrus</i> sp.	Idem
(6) CFBP2585	Idem, <i>Sorbus</i> sp.	Idem
(7) CFBP2586	Idem, <i>Pyracantha</i> sp.	Idem
(8) CFBP3012	Idem, <i>Crataegus monogyna</i>	Idem
(9) CFBP3020	Idem, <i>Pyrus communis</i>	Idem
(10) CFBP3039	Idem, <i>Malus sylvestris</i>	Idem
(11) CFBP3043	Idem, <i>Pyracantha angustifolia</i>	Idem
(12) CFBP3049	Idem, <i>Malus domestica</i>	Idem
(13) CFBP3050	Idem, <i>Malus domestica</i>	Idem
(14) CFBP3051	Idem, <i>Malus domestica</i>	Idem
(15) CFBP3060	Idem, <i>Pyrus</i> sp.	Idem
(16) CFBP3113	Idem, <i>Pyracantha</i> sp.	Idem
(17) CFBP3791	Idem, <i>Prunus salicina</i>	Idem
(18) CFBP3792	Idem, <i>Prunus salicina</i>	Idem
(19) CFBP3793	Idem, <i>Prunus salicina</i>	Idem
(20) CFBP4175	Idem, <i>Pyrus</i> sp.	Idem
(21) CFBP7159	Idem, <i>Sorbus</i> sp.	Idem
(22) CFBP7160	Idem, <i>Malus domestica</i>	Idem
(23) 17/14	Idem, <i>Sorbus</i> sp.	
Ea 273	Idem, <i>Malus domestica</i>	http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_amylovora/
CFBP4171	Souche sauvage d' <i>Erwinia pyrifoliae</i>	CFBP*
CFBP4172	Idem	Idem
CFBP6830	Souche sauvage d' <i>Erwinia billingiae</i>	Idem
CFBP6832	Idem	Idem
Et1	Souche sauvage d' <i>Erwinia tasmaniensis</i>	Geider <i>et al.</i> , 2006
Et2	Idem	Geider <i>et al.</i> , 2006
FB2734	Souche sauvage d' <i>E. amylovora</i> résistante à la streptomycine	
FB 2224	CFBP1430::MudIIPR13, LacZ, CmR, HR ⁺ , Path ⁺	Faize <i>et al.</i> , 2006
PMV6023	CFBP1430 <i>hrcV</i> ::MudIIPR13, LacZ, CmR, HR ⁻ , Path ⁻	Barny <i>et al.</i> , 1990
PMV6046	CFBP1430 <i>hrpS</i> ::MudIIPR13, LacZ, CmR, HR ⁻ , Path ⁻	Tharaud <i>et al.</i> , 1997
M73 ou FB2218	CFBP1430 <i>hrpL</i> ::(<i>uidA</i> -Km), Gus, KmR, HR ⁻ , Path ⁻	Faize <i>et al.</i> , 2006
FB2208	CFBP1430 <i>fliH</i> ::MudIIPR13, CmR, HR ⁺ , Path ⁺ , non mobile	Barny <i>et al.</i> , 1990 et ce travail
FB2733	CFBP1430 <i>fliH</i> ::MudIIPR13, <i>hrpL</i> ::(<i>uidA</i> -Km), CmR, KmR, HR ⁻ , Path ⁻ , non mobile	ce travail

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pMAB71	pUC18 avec un fragment HindIII de 3,8Kb portant le gène <i>hrpL</i> , AmpR	Gaudriault <i>et al.</i> , 1997
pMAB108	pMAB71 avec la cassette <i>uidA</i> -Km insérée au site BglII	Faize <i>et al.</i> , 2006
pGEM-T	Vecteur de clonage, LacZ, ApR	Promega

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL

1.1 MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1.1 MATERIEL VEGETAL

Les expérimentations ont été réalisées sur des plantules provenant de pépins issus de pollinisation libre de Pommier *Malus X domestica* cv. Golden Delicious. Les semis sont cultivés en serre et sont âgés de 3 à 4 semaines lors de l'utilisation pour les essais.

1.1.2 MATERIEL BACTERIEN

Les souches bactériennes d'*Erwinia* sp. utilisées et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau II.1. Avant chaque utilisation, les bactéries sont cultivées à 26°C pendant 24 heures sur milieu KB solide, supplémenté si nécessaire avec l'antibiotique approprié (20 mg.L⁻¹). La souche d'*Escherichia coli* DH5α (Woodcock *et al.*, 1989) est cultivée sur milieu LB solide pendant une nuit à 37°C avant d'être utilisée pour les clonages.

1.2 MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS

Les milieux de culture suivants sont utilisés, sous forme liquide, semi-solide (2,5 g.L⁻¹ d'agar) ou solide (15 g.L⁻¹ d'agar) :

- Milieu King B (King *et al.*, 1954) noté KB.
- Milieu M9, pH 7,4 (Ausubel *et al.*, 1987), supplémenté en acide nicotinique (0,2%) et additionné soit de galactose (2%) (noté M9 gal) soit de glucose (4%) (M9 glu). Le milieu M9 gal est un milieu inducteur du cluster *hrp*, c'est-à-dire mimant les conditions rencontrées dans l'apoplaste (Gaudriault *et al.*, 1997).
- Milieu de Wei (Wei *et al.*, 1992a) noté IM (Induction Medium). C'est également un milieu inducteur du cluster *hrp*. Il permet la survie de la bactérie mais pas sa multiplication.
- Milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

2. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES ET BIOTESTS BACTERIE/PLANTE

2.1 PREPARATION ET DENOMBREMENT DES INOCULA

Les inocula sont préparés par mise en suspension des bactéries dans de l'eau stérile (ou autre milieu si précisé). Ils sont ajustés à la concentration désirée par comparaison avec la gamme d'opacité de Mc Farland. La concentration est vérifiée par étalement à l'aide d'un enseigneur Spiral (Interscience) sur milieux appropriés puis dénombrement après 48h d'incubation à 26°C.

2.2 TEST DE MOBILITE BACTERIENNE

La mobilité des souches bactériennes est appréciée par la mesure du diamètre de la croissance bactérienne développée après inoculation ponctuelle (15 μL) d'un milieu semi-solide en boîte de Petri. La croissance est mesurée une fois par jour pendant 3 à 4 jours sur les milieux M9 gal et M9 glu, à 23°C.

2.3 TEST DE FORMATION D'AGREGATS

La formation d'agrégats dans une suspension de cellules bactériennes est observée à la loupe binoculaire après 6 heures ou 24 heures de culture sous agitation en milieu liquide (milieux M9 gal ou glu et milieu IM respectivement) avec une concentration de départ de 10^9 ufc.mL⁻¹ en milieu IM, ou 10^6 ufc.mL⁻¹ pour la souche sauvage et 10^7 ufc.mL⁻¹ pour les mutants en milieu M9. La culture est laissée au repos pendant 2 heures avant observation.

2.4 INOCULATION DES PLANTES

2.4.1 INOCULATION

2.4.1.1 CO-INOCULATION : DEPOT DE GOUTTE SUR BLESSURE

La plus jeune feuille développée est blessée par une incision au scalpel dans le premier tiers du limbe en partant du pétiole, perpendiculairement à la nervure centrale. 20 μL de suspension bactérienne (10^8 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile pour la souche sauvage seule ou en mélange avec chaque mutant à 10^9 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile) sont déposés au niveau de la blessure.

2.4.1.2 CO-INOCULATION : PULVERISATION

Les plantules reçoivent la suspension bactérienne par pulvérisation (10^8 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile pour la souche sauvage seule ou en mélange avec chaque mutant à 10^9 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile) et sont maintenues 48 heures en mini-serres dans lesquelles l'humidité est proche de 100%, en conditions de lumière naturelle. En règle générale, 10 plantes par condition sont utilisées pour les études de protection.

2.4.1.3 INOCULATION SEQUENCEE : INFILTRATION SOUS VIDE PUIS DEPOT DE GOUTTE SUR BLESSURE

Les plantules en croissance active sont disposées dans des mini-serres pendant 12 heures à 26°C, à la lumière artificielle et en conditions d'hygrométrie saturante afin de faciliter l'ouverture des stomates. Les suspensions bactériennes sont préparées dans l'eau juste avant infiltration (10^9 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile pour les mutants). Les plantes sont placées dans un dessiccateur à vide (Samplatec), la partie aérienne étant maintenue en immersion dans la suspension bactérienne. Au moyen d'une pompe, un vide de 30 hPa est maintenu 2 mn puis brusquement rompu par ouverture d'une vanne. Les bactéries pénètrent alors dans les feuilles par les stomates à la place de l'air qui a été chassé sous vide. L'homogénéité de l'infiltration des feuilles est vérifiée par examen visuel. Les plantes sont remises en serre, 1 heure après infiltration puis inoculée avec la souche sauvage (10^8 ufc.mL⁻¹ d'eau stérile) par dépôt de goutte sur blessure selon la technique décrite en § 2.4.1.1.

2.4.2 NOTATION DES SYMPTOMES

La notation des symptômes est réalisée une fois par semaine pendant 3 semaines. Quelle que soit la méthode d'inoculation, les premiers symptômes (nécroses) apparaissent sur les feuilles : feuilles infiltrées, feuille inoculée par blessure et dépôt de goutte, très jeune feuille au niveau de l'apex par la méthode par pulvérisation. La nécrose peut alors progresser sur tige. L'aptitude d'un mutant à la protection est appréciée en comparant le taux de plantules présentant des nécroses sur la tige (après inoculation des mélanges sauvage/mutant), à celui obtenu dans le témoin (souche virulente inoculée seule).

2.4.3 MESURE DES FUTES D'ELECTROLYTES

Le protocole de Brisset *et al.* (1991) est utilisé : les plus jeunes feuilles sont prélevées, stérilisées en surface par immersion durant 2 mn dans une solution d'hypochlorite de sodium (10%), puis rincées 2 fois dans l'eau distillée stérile. Pour chaque répétition et chaque essai, 10 disques (diamètre 0,5 mm) sont découpés à l'emporte-pièce de part et d'autre de la nervure principale de feuilles. Ils sont ensuite placés dans 10 mL de suspension bactérienne (10^8 ufc.mL⁻¹ pour la souche sauvage et 10^9 ufc.mL⁻¹ pour les mutants) préparée dans du tampon MES (2mM, pH 5,8). Les disques sont infiltrés sous vide (30 hPa) puis séchés entre 2 feuilles de papier filtre stérile pendant 20 mn. Ils sont ensuite immergés dans 2,5 mL du tampon MES, dans des tubes à hémolyse de 5 mL contenant un barreau magnétique, tout en étant protégés dans une boîte percée pour permettre les échanges ioniques. Dans chaque tube est plongée une sonde mesurant la conductivité (Tacussel XC170). L'incubation se réalise en agitation constante dans un bain thermostaté à 25°C sur un agitateur magnétique immergé et sous une lumière constante. Les sondes sont reliées à un système automatique de mesure et d'enregistrement comprenant un conductivimètre et un multiplexeur commandés par ordinateur. Le flux net d'électrolytes est estimé par la mesure de conductivité du milieu d'incubation et exprimé en $\mu\text{S}/\text{cm}^2$. Un témoin (feuilles infiltrées par un mutant avirulent ou en tampon stérile) est inclus dans chaque essai.

3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

3.1 EXTRACTION DES PROTEINES FLAGELLAIRES

Les bactéries issues d'une culture de 24 heures sur LB solide sont cultivées à 23°C sur M9 glu et M9 gal, pendant 2 et 4 jours respectivement. Après récolte des bactéries dans du Tris 0,5mM pH=8, les suspensions sont ajustées à concentration égale d'après la DO_{600} et vortexées pendant 10 mn afin de détacher les flagelles du corps bactérien. Les flagelles sont séparés des cellules par centrifugation de volumes égaux de surnageants (15 000 g, 20 mn, 4 °C), récupérés par ultracentrifugation (100 000 g, 90 mn, 4 °C) et enfin resuspendus dans un volume égal de tampon Tris 0,5 mM pH=8. Les échantillons sont conservés à -20°C avant d'être analysés en électrophorèse (§ 3.3).

3.2 DOSAGE DES PROTEINES

Le kit mis au point par Pierce (Coomassie® Protein Assay Reagent – Interchim) est utilisé pour réaliser le dosage des protéines. Le principe est celui décrit par Bradford (1976)

Tableau II.2 : Solutions de préparation des gels d'acrylamide

Solutions	Gel de concentration 3,75%	Gel de séparation 11%
Acrylamide/Bisacrylamide à 40% (37,5/1)	1 ml	7 ml
Tampon gel de séparation (Tris/HCl 3M, pH 8,8)	-	3,1 ml
Tampon gel de concentration (Tris/HCl 0,15M, pH 6,8)	2,5 ml	-
SDS 10%	100 µl	250 µl
Persulfate d'ammonium 3% (préparé extemporanément)	0,5 ml	1,3 ml
Eau distillée	6 ml	13,6 ml
TEMED	20 µl	16,7 µl
Total	10 ml	25 ml

Tableau II.3 : Composition du tampon d'échantillon

Tris/HCl pH 8,8	200 mM
Saccharose	500 mM
Bleu de Bromophénol	0,01 %
EDTA	5 mM
SDS	3 %

avec une réaction colorimétrique au Bleu de Coomassie. Un décalage d'absorbance (de 465 à 595 nm) se produit lorsque le bleu de Coomassie est mis en présence de protéines. La concentration des échantillons est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'albumine sérique de boeuf (BSA) (gamme de 0,031 à 1000 mg.mL⁻¹).

3.3 ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est réalisée en gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes par SDS-PAGE. Le système employé est le système discontinu en gel vertical de polyacrylamide qui comporte deux gels différents superposés : un gel de séparation (11% d'acrylamide-bisacrylamide 37,5/1) surmonté d'un gel de concentration (3,75% d'acrylamide) (tableaux II.2 et II.3). Les protéines sont séparées selon leur taille, leur charge étant négative en raison de la présence de SDS, molécule anionique qui se lie aux protéines. L'électrophorèse s'effectue à 60 mA pendant 1 heure puis à 120 mA pendant 2 heures, avec un tampon de migration (Tris 0,025 M, glycine 0,2 M, SDS 10%, pH 8,3). A la fin de la migration, le gel de concentration est éliminé et le gel de séparation placé (1 heure) dans une solution de coloration (bleu de Coomassie R250 2,5 g, méthanol 500 mL, acide acétique 100 mL, eau distillée qsp 1000 mL). L'excès de colorant est éliminé par lavage dans une première solution de décoloration (éthanol à 95% 500 mL, acide acétique 100 mL, eau distillée qsp 1000 mL) pendant 10 mn suivi de plusieurs lavages dans une deuxième solution (éthanol à 95% 50 mL, acide acétique 100 mL, eau distillée qsp 1000 mL) jusqu'à décoloration complète du fond de gel.

Pour la coloration au nitrate d'argent, le gel de séparation est placé une heure dans une solution de fixation (eau/éthanol/acide acétique 70/30/10 V/V). Le gel est ensuite lavé 3 fois dans l'éthanol 25% puis dans l'eau distillée (10 mn à chaque fois). Il est ensuite placé dans une solution de thiosulfate de sodium 2,5 mM pendant 2 mn et enfin rincé à l'eau distillée 2 fois 5 mn. La coloration se fait à l'obscurité dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% contenant 0,1% de formaldéhyde à 37%. Le gel est rincé rapidement à l'eau avant d'être révélé dans du carbonate de sodium à 3% additionné de formaldéhyde (0,02%) et de thiosulfate de sodium 20µM. La révélation est bloquée avec de l'acide acétique à 10%.

3.4 PREPARATION D'UN SERUM POLYCLONAL ANTI-FLAGELLINE

La bande protéique correspondant à la flagelline sur gel SDS-PAGE, colorée au bleu de Coomassie, est découpée au scalpel. La protéine est ensuite électroéluée de l'acrylamide et dosée. 30 µg de protéine sont émulsionnés dans un volume d'adjuvant de Freund et sont injectés en sous-cutané à un lapin. L'injection est renouvelée 15 et 30 jours plus tard. Six jours après la dernière injection, le sérum est récupéré par exécution du lapin.

3.5 TRANSFERT SUR MEMBRANE ET REVELATION DES PROTEINES TRANSFEREES

Après migration et séparation, les protéines de l'extrait bactérien à analyser sont transférés électriquement sur une membrane de nitrocellulose qui va permettre leur révélation par une réaction immunoenzymatique.

Une membrane de nitrocellulose (Immobilon®, Millipore) ainsi que deux feuilles de papier filtre de 1,5 mm d'épaisseur sont découpées aux dimensions du gel. La membrane est immergée quelques secondes dans le méthanol (1 à 3 secondes) puis rincée à l'eau pendant 2 mn. Elle est mise à équilibrer avec le papier filtre dans du tampon de transfert (Tris 3,03 g, glycine 8,55 g, méthanol 200 mL, eau distillée qsp 1000 mL, pH 8,3) pendant quelques minutes. Le gel est mis à équilibrer dans le même tampon pendant 20 mn.

Un sandwich est réalisé comme suit : anode (+) – papier filtre – membrane – papier filtre – cathode (-). Le transfert est réalisé par passage du courant entre deux plaques de

graphite. Une intensité maximale de 4 mA/cm² de gel et une tension maximale de 60 V sont appliquées pendant 1 h 30. L'efficacité du transfert est contrôlée par coloration du gel au bleu de Coomassie.

Le protocole d'immunomarquage est adapté de celui de Harlow et Lane (1988). La membrane est saturée pendant 24 heures à 4°C dans du tampon PBSt (KH₂PO₄ 0,33 g, Na₂HPO₄, 12 H₂O 2,66 g, NaCl 8,18 g, Tween 20 500 µL, eau distillée qsp 1000 mL, pH 7,2) contenant du lait en poudre (10% m/v). Elle est ensuite rincée 2 fois pendant 5 mn dans du PBSt, puis incubée pendant 1 h 30 dans la solution d'anticorps polyclonaux de lapin anti-flagelline, dilué dans du tampon PBS sans Tween (dilution du sérum au 1/5000^e). La bande correspondant à la flagelline a tout d'abord été identifiée à l'aide d'un sérum dirigé contre la flagelline d'*E. chrysanthemi*, fourni par VE. Shevchik (Unité de Microbiologie et Génétique, UMR 5122 CNRS/INSA/UCB, Lyon 1, Villeurbanne). Nous avons ensuite produit notre propre serum anti-flagelline d'*E. amylovora*. Après 4 lavages de 5 mn en tampon Tris-NaCl (NaCl 8,76 g, Tris 6,06 g, eau distillée qsp 1000 mL, pH 7,5), le conjugué (Sigma Immuno Chemicals) anti-IgG de chèvre, couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/800^e dans du tampon Tris NaCl, est mis en contact avec la membrane pendant 1 h 30. Quatre lavages de 5 mn en tampon Tris NaCl sont effectués avant la révélation. Cette dernière s'effectue en incubant la membrane à l'obscurité et sous agitation pendant 5 mn dans 15 mL de tampon de révélation (NaCl 5,84 g, MgCl₂ 1,02 g, Tris 12,11 g, eau distillée qsp 1000 mL) contenant 66 µL de nitrobleu tétrazolium (75 mg/mL de N-N-diméthylformamide 70%) et 50 µL de 5-bromo-4-chloro-indolylphosphate (50 mg/mL de N-N-diméthylformamide). La réaction enzymatique est bloquée par deux lavages en solution d'HCl 0,2 M.

3.6 DOSAGE DE L'ACTIVITE β-GALACTOSIDASE D'E. AMYLOVORA EN CULTURE LIQUIDE

Afin de quantifier l'activité β-galactosidase d'*E. amylovora* et de ses mutants, les cellules bactériennes sont cultivées pendant 12 heures dans du milieu LB puis lavées deux fois dans de l'eau stérile et resuspendues dans du milieu M9 ou IM à une DO₆₀₀ égale à 0,1. Les cultures sont incubées à 23°C sous agitation. Des échantillons de culture sont prélevés 24 heures après et la DO₆₀₀ est mesurée.

L'activité β-galactosidase est mesurée selon la méthode décrite par Miller (1972). La β-galactosidase est une enzyme qui permet la transformation de l'ortho-nitro-phényl-β-D-galactopyranoside (ONPG, incolore) en β-D-galactose et ortho-nitro-phénol (ONP, jaune). 0,5 mL (V) de suspension bactérienne sont mélangés à 0,5 mL de tampon Z (tampon phosphate pH 7 50 mM; β mercapto-éthanol 50 mM; KCl 10 mM; MgSO₄ 1 mM), 20 µL de chloroforme, 10 µL de SDS 0,1%, ces 2 derniers produits permettant la lyse des cellules bactériennes. Le mélange est vortexé 20 secondes. 155 µL de suspension bactérienne sont prélevés et ajoutés (temps T0) à 35 µL d'ONPG 13,5 mM.

Le mélange est incubé à 37°C. Lorsque le mélange jaunit (temps T1), la réaction est stoppée par ajout de 90 µL de Na₂CO₃ 1M. La densité optique de la solution est mesurée dans une plaque de microtitration à 420 nm (DO₄₂₀) et à 550 nm (DO₄₅₀). L'activité spécifique de la β-galactosidase des extraits est calculée grâce à la formule de Miller:

$$\text{Activité}=1000 \times \frac{(\text{DO}_{420}-1,75 \times \text{DO}_{450})}{(\text{T1}-\text{T0}) \times \text{DO}_{600} \times \text{V}}$$

4. TECHNIQUE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les observations des flagelles ont été réalisées au Service Commun de Microscopie Electronique de l'Université d'Angers selon le protocole de Brown *et al.* (2001) modifié. Après une nuit de culture en LB liquide à 26°C, les bactéries sont lavées deux fois avec du MgCl₂ 1 mM puis resuspendues dans du M9 gal (DO₆₀₀=0,3). Les grilles d'or stériles (300 mesh) recouvertes de Formvar 1% et de carbone sont posées sur 20 µL de suspension bactérienne, elles-mêmes déposées sur des lames de microscope recouvertes de parafilm. Les lames portant les grilles sont incubées dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre humide pour éviter toute évaporation. Les boîtes sont ensuite scellées avec du parafilm et incubées à 21°C pendant 16 heures. Les grilles sont ôtées du milieu et transférées sur une goutte de tampon de fixation (glutaraldéhyde 2% dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,2). Les grilles sont laissées ainsi 15 mn avant transfert sur une nouvelle goutte de tampon de fixation dans lequel elles sont maintenues une nuit à 4°C. Les grilles sont alors lavées par passages successifs sur 6 gouttes de 20 µL de tampon Tris (20 mM) NaCl (500 mM) pH 7,2. Les grilles sont lavées à l'eau avant coloration négative pendant 1 mn dans de l'acide phosphotungstique 1% (pH 6,5 ajusté avec KOH). Elles sont séchées puis métallisées avant observation au microscope électronique (Jeol 2011, Tokyo, Japan) à 120kV.

5. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

5.1 LOCALISATION DU SITE D'INSERTION DU PROPHAGE MU DANS LE CHROMOSOME DU MUTANT FB2208

5.1.1 EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE D'*E. AMYLOVORA*

L'ADN génomique d'*E. amylovora* est préparé par la technique d'extraction au CTAB (Ausubel *et al.*, 1995). Un volume de 1,5 mL de culture en phase stationnaire est centrifugé pendant 30 secondes à 12000 g. Les cellules sont resuspendues dans 597 µL de SDS 0,5% additionné de protéinase K à 100 µg. mL⁻¹ puis incubées pendant 1 heure à 37°C. Après avoir ajouté 100 µL de NaCl 5M, le mélange est incubé 10 mn à 65°C avec 80 µL de CTAB-NaCl 0,5 M puis une extraction des protéines et des polysaccharides est effectuée au chloroforme-alcool isoamylique (24 :1). L'étape d'extraction par le CTAB-NaCl est répétée jusqu'à ce qu'aucune interface ne soit visible. Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont ensuite précipités en ajoutant 0,7 volumes d'isopropanol.

5.1.2 DIGESTION ET TRANSFORMATION DE L'ADN GENOMIQUE

L'ADN génomique (5 µg) est digéré par une enzyme de restriction (SalI) (30 unités) dont un site de clivage est présent dans le transposon et qui par ailleurs possède des sites de restriction dans le génome bactérien. La digestion est réalisée dans un volume final de 50 µL à 37°C pendant 90 mn. La digestion par cette enzyme fournit donc un fragment contenant une partie du gène où s'est inséré le transposon et l'extrémité gauche du mini Mu contenant la résistance au chloramphénicol nécessaire à la sélection des clones. L'ADN plasmidique (5 µg) utilisé pour le clonage (pUC18) est digéré par la même enzyme avant ligation, celle-ci

ayant un site unique dans le polylinker. En fin de digestion, 100 μL d'eau ultrapure stérile sont ajoutés au mélange réactionnel. Une extraction est effectuée au phénol/chloroforme alcool/isoamylique (25 :24 :1) puis au chloroforme alcool/isoamylique (24 :1). L'ADN digéré est précipité en ajoutant 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol, pendant 1 heure à -20°C . Après centrifugation (13000 g, 15 mn, 4°C), le culot est séché et dissout dans 10 μL d'eau ultrapure stérile. L'ADN génomique (4 μL) et l'ADN plasmidique pur ou dilué au 1/10^e (4 μL), digérés, sont mélangés avec 0,3 unités de T4 DNA ligase (Promega), pendant 1 heure à température ambiante. 3 μL du produit de ligation sont utilisés pour la transformation avec 25 μL de bactéries thermocompétentes comme décrit au § 5.5.6.2 mais avec sélection sur LB+chloramphénicol. Les colonies ayant intégré l'insert sont conservées à -80°C dans un mélange LB/glycérol 15% jusqu'au séquençage.

5.2 MUTAGENESE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE

Afin de favoriser une double recombinaison chromosomique entre le plasmide pMAB108 dérivé de pUC 18, portant le gène *hrpL* d'*E. amylovora* dans lequel se trouve une insertion (cassette *uidA-Km*), et le chromosome du mutant *Ea fliH*, les bactéries sont cultivées en milieu LB en présence de kanamycine. La recombinaison chromosomique du fragment est ensuite recherchée en testant la résistance à la kanamycine et la sensibilité à l'ampicilline (résistance portée par le plasmide) de colonies isolées.

5.3 EXTRACTION DES ARNs TOTAUX

5.3.1 EXTRACTION DES ARNs TOTAUX DE PLANTULES

Pour les extractions d'ARNs, les feuilles coupées sont plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C . Tout le matériel utilisé est stérilisé afin de détruire les RNAses. Sauf lorsque cela est spécifié, les échantillons en cours d'extraction doivent être maintenus sur glace. Les échantillons végétaux sont broyés en fine poudre avec un broyeur à billes (Retsch, Allemagne) dans un eppendorf. Après avoir ajouté 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 50 mM de MgCl_2 , 5% de SDS), le mélange est incubé 10 mn à 60°C et refroidi 5 mn à température ambiante. Afin de précipiter les protéines, 500 μL d'acétate de potassium (3 M, pH 5) sont ajoutés, le mélange est homogénéisé par agitation puis centrifugé 15 mn à 4°C , 16000g pour éliminer débris et protéines. Au surnageant est ajouté 1 volume d'isopropanol froid (1 mL). Les tubes sont ensuite incubés pendant 1 heure à -20°C puis centrifugés 15 mn à 4°C (15000g). Le culot est dissout dans 160 μL d'eau puis 40 μL d'éthanol 100% froid sont ajoutés afin de précipiter les polysaccharides. Après 5 mn dans la glace, une centrifugation est effectuée (5 mn, 15000g, 4°C). Le surnageant est récupéré et 100 μL de LiCl (10M) sont ajoutés. Après une nuit à -20°C , une centrifugation (30 mn, 25000g, 4°C) est effectuée et le culot est lavé par du LiCl 3M, puis de l'éthanol 80% (200 μL), et est dissout dans 60 μL d'eau. La solution est traitée par 1 unité de Turbo DNase (Ambion) pendant 45 mn à 37°C dans un volume final de 100 μL . Après 2 purifications au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (1 volume ou 100 μL) (25/24/1) puis au chloroforme-alcool isoamylique (100 μL), les ARNs totaux sont précipités par 0,5 volume d'acétate d'ammonium (7,5 M) et 2 volumes d'éthanol 100% pendant une nuit à -20°C ou 2 heures à -80°C . Une centrifugation de 30 mn à 4°C (10000g) puis un lavage du culot par de l'éthanol 80% terminent l'extraction. Après séchage (10 mn), les culots sont dissout dans 55 μL d'eau ultrapure. Les ARN_{tx} sont dosés au spectrophotomètre (NanoDrop), dilués à 0,5 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. La qualité des ARNs peut être contrôlée sur gel d'agarose à 1,2% et visualisés sous UV après 15 mn dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$.

Tableau II.4 – Liste des primers utilisés pour la reverse transcription des ARN bactériens (Fislage *et al.*, 1997)

RT-primers	séquence
Ea1	TTTTATCCAGC
Ea2	ACTTTACGCAG
Ea3	TTTATCCAGCG
Ea4	TCAGCGTTTTA
Ea5	TTTCAGCGCCT
Ea6	TTTTTTCAGCA
Ea7	TCTTTTTTACC
Ea8	ATCATCCAGCA
Ea9	TTTTACCCAGC
Ea10	TTCAGCCAGCG

5.3.2 EXTRACTION DES ARNs TOTAUX DE BACTERIES

Les ARNs bactériens ont une durée de vie très courte, de l'ordre de quelques minutes. C'est pourquoi leur extraction nécessite un protocole rapide mais qui doit permettre un rendement suffisant. Différents protocoles ont été testés (cf partie Résultats, §2.4.1). La procédure retenue pour l'extraction d'ARNs bactérien est inspirée de Piper *et al.*, 1999. 20 mL de M9 gal ou de M9 glu sont inoculés avec une culture d'une nuit sur LB, de façon à obtenir une DO_{600} d'environ 0,1 en M9 gal ou 0,02 en M9 glu, la croissance étant plus lente en M9 gal. Cette suspension est incubée à 23°C pendant environ 16 heures sous agitation douce de façon à atteindre une DO_{600} de 0,5 (milieu de phase exponentielle). Les bactéries sont ensuite centrifugées à 12000g pendant 30 secondes et le surnageant est jeté. Le culot est aussitôt resuspendu dans 1 mL de Trizol chaud (65°C) pour 4 mL de culture et incubé 5 mn à 65°C en vortexant 2 secondes toutes les minutes. Après 5 mn à température ambiante 0,2 volume de chloroforme est ajouté, la solution est vortexée 30 secondes puis laissée 2 mn à température ambiante avant centrifugation (15 mn, 12000g, 4°C). La phase supérieure est délicatement récupérée (600 µL) et mélangée à 0,5 mL d'isopropanol froid. La solution est incubée 10 mn à température ambiante avant d'être centrifugée à 12000g pendant 20 mn à 4°C. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 75% froid, centrifugé puis séché 10 mn à température ambiante. Les ARNs sont suspendus dans 30 µL d'eau et dosés au NanoDrop. Les ARNs sont ajustés à 2 µg.µL⁻¹ et 10 µg sont traités avec 20 unités de Turbo DNase dans un volume final de 100 µL, 30 mn à 37°C. La réaction est stoppée de la même façon que pour les ARNs de semis de pommier au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis chloroforme/alcool isoamylique, les ARNs sont précipités avec 10% d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100% froid pendant 2 heures à -80°C. Après centrifugation pendant 15 mn à 15000g, 4°C, ils sont suspendus dans 6 µL d'eau ultrapure. L'absence d'ADN génomique est vérifiée par PCR sur 1 µL avec un couple d'amorces (*Ea9/Ea10*) (tableau III.3) amplifiant un fragment situé à cheval sur *orf2* et *hrpW*. Les 5 µL restants sont transcrits en ADNc.

5.4 REVERSE TRANSCRIPTION DES ARNs

5.4.1 REVERSE TRANSCRIPTION DES ARNs DE PLANTULES

La transformation des ARNs messagers en ADNc complémentaires (ADNc) se fait à partir de 2 µg d'ARN_{ix}, mélangés à 1 µL d'oligo(dT)₁₅ et à 9 µL d'eau ultrapure puis incubés à 75°C pendant 5 mn. Après 5 mn sur glace, 6 µL de tampon MMLV-RTase 10X (Promega), 5 µL de dNTPs (2,5 mM chacun), 4,3 µL d'eau ultrapure et 140 unités de MMLV-RTase (Promega) sont ajoutés dans chaque tube. La réaction se déroule à 42°C pendant 75 mn. Les ADNc sont ensuite dilués au quart avant d'être stockés à -20°C.

5.4.2 REVERSE TRANSCRIPTION DES ARNs DE BACTERIES

Les ARNs messagers sont rétro-transcrits en ADNc simple brin à partir de 2 µg d'ARN_{ix} dans 4 µL, mélangés à 14 µL de primers 11mers (10 µM chacun) (tableau II.4) (Fislage *et al.*, 1997) puis incubés 5 mn à 70°C. Après 5 mn sur glace, 3 µL de tampon MMLV-RTase 10X (Promega), 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM chacun), 40 unités de RNasin (Promega), 200 unités de MMLV-RTase (Promega) et 5,5 µL d'eau ultrapure sont ajoutés. La réaction se déroule à 42°C pendant 90 mn. Les ADNc sont ensuite dilués au quart avant d'être stockés à -20°C.

5.5 AFLP A PARTIR D'ADNc DE BACTERIE

5.5.1 SYNTHÈSE DE L'ADNc DOUBLE BRIN

Les ADNc simples brins sont transformés en doubles brins dans un volume final de 100 μL avec 10 μL de Tampon DNA PolII 10X, 5 μL de dNTPs (2,5 mM chacun), 1 unité de RNase H (Promega) et 20 unités de DNA PolII. La réaction se déroule pendant 2 heures à 12°C puis 10 mn à 68°C. Les ADNc sont ensuite précipités avec 10% d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol 100%, 2 heures à -80°C. Après centrifugation (20 mn, 16000g, 4°C) et lavage à l'éthanol 70%, les ADNc sont séchés 10 mn à température ambiante et suspendus dans 10 μL d'eau ultrapure avant dosage au NanoDrop. Une PCR de vérification d'absence d'ADN génomique est réalisée sur 1 μL d'ADNc dilué au quart avec le couple d'amorces *Ea9/Ea10*.

5.5.2 RESTRICTION

Les ADNc sont ajustés à 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 0,5 μg sont digérés par 10 unités d'EcoRI (NEB) avec 5 μL de tampon NEB2 10X pendant 2 heures à 37°C. Puis une seconde digestion est réalisée avec 20 u de MseI (NEB), 1 μL de BSA 100X, et 5 μL de tampon NEB2 dans un volume final de 100 μL , pendant 2 heures à 37°C. Les enzymes sont ensuite inactivées 10 mn à 65°C.

5.5.3 LIGATION

Les produits de restriction sont ensuite dilués au 1/10^e. On réalise une ligation sur 10 μL de ces produits dilués, avec 1 μL d'Eco-adaptateur 10 μM et 1 μL de Mse-adaptateur 50 μM , 2 μL de tampon ligase 10X (Eurogentec) et 100 unités de T4 DNA ligase (Eurogentec) dans un volume final de 20 μL , pendant 3 heures à 37°C.

5.5.4 AMPLIFICATION

Les préamplifications sont réalisées dans un volume réactionnel de 20 μL contenant 2 μL de produit de ligation, 4 μL de tampon Taq 5X, 2 μL de dNTPs (2,5 mM chacun), 2 μL de MgCl_2 25mM, 1,6 μL d'amorces Eco0 et Mse0 (50 μM), 6,6 μL d'eau et 1 unité de GoTaq Flexi (Promega). L'amplification est réalisée selon le régime thermique suivant : 2 mn à 95°C ; 30 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 1 mn à 72°C ; 5 mn à 72°C. Les amplifiats sont contrôlés sur gel d'agarose 2%, sous UV, après coloration au BET.

Les amplifications sélectives sont réalisées dans un volume réactionnel de 20 μL contenant 4 μL de produit de préamplification dilué au 1/150^e, 4 μL de tampon Taq 5X, 1 μL de dNTPs (2,5mM chacun), 1,8 μL de MgCl_2 25mM, 2,5 μL d'amorces Eco+2 et Mse+2 (50 μM), 3,9 μL d'eau et 1,5 unités de GoTaq Flexi (Promega). L'amplification est réalisée selon le régime thermique suivant : 2 mn à 95°C ; 13 cycles de 30 s à 95°C, 30 s de 65°C à 56°C, 1 mn à 72°C ; puis 23 cycles de 30 s à 95°C, 30 s de 56°C, 1 mn à 72°C ; et 5 mn à 72°C.

5.5.5 ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE ET REVELATION AU NITRATE D'ARGENT

Les produits PCR sont dénaturés dans 70% de bleu formamide pendant 5 mn à 95°C. Ils sont ensuite séparés par électrophorèse verticale sur un gel dénaturant d'acrylamide-bisacrylamide (29 :1) à 7% (dimension 325*420*0,4 mm, système CBS Scientific). Le gel est

composé de 50 mL d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide (29:1) à 7% dans du TBE 0,5X / urée (7M), 150 μ L d'ammonium persulfate 10% et 50 μ L de TEMED. La polymérisation est réalisée en 1 heure à température ambiante. Le tampon de migration est le TBE 0,5X. Un courant constant de 150 V est appliqué.

La révélation des bandes est assurée par une coloration au nitrate d'argent. Le gel est fixé pendant 10 mn dans un bain d'éthanol/acide acétique (10/1). Après un rinçage dans un bain d'eau déminéralisée pendant une minute, le gel est placé 3 mn dans une solution d'acide nitrique 1,5%. Le gel est rincé 1 mn dans l'eau avant d'être placé dans la solution de nitrate d'argent 0,012 M pendant 20 mn. Puis le gel est rincé 15 s dans de l'eau avant d'être révélé avec du carbonate de sodium froid (0,28 M) additionné de formaldéhyde 37% (600 μ L.L⁻¹). La coloration est stoppée en plaçant le gel dans un bain d'acide acétique 5% pendant 5mn. Le gel est rincé à l'eau 10 mn puis séché. Les bandes d'ADN choisies sont alors récupérées dans 20 μ L de tampon GoTaq Flexi 1X (Promega).

5.5.6 PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES ET CLONAGE

5.5.6.1 PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES

La souche DH5 α d'*Escherichia coli* a été utilisée pour les clonages. Cent millilitres de milieu LB-MgSO₄ (2 mM) sontensemencés avec une culture de cette souche d'une nuit à 37°C sur LB solide puis incubés à 37°C sous agitation douce jusqu'à obtenir une DO de 0,5 à 600nm. La culture est refroidie dans la glace 15 mn, puis centrifugée 5 mn à 4000 g à 4°C. Le culot est suspendu dans 16 mL de solution RF1 (chlorure de rubidium 0,1 M, MnCl₂ 4H₂O 0,05 M, acétate de potassium 0,03 M, CaCl₂ 2H₂O 0,01 M, glycérol 12%, pH 5,8) et la suspension est incubée dans la glace pendant 15 mn puis centrifugée 5 mn à 4000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 4 mL de solution RF2 (acide morpholinopropanesulfonique 5 mM, chlorure de rubidium 5 mM, CaCl₂ 2H₂O 0,04 M, glycérol 6% pH 6,8). La suspension est à nouveau incubée 15 mn dans la glace puis aliquotée par 100 μ L et conservée à -80°C.

5.5.6.2 CLONAGE

L'ADN est amplifié avec les amorces sélectives Eco+2 et Mse+2 selon le régime d'amplification utilisé avec ces amorces (§ 5.5.4), cloné dans un plasmide pGEMT-easy® (kit Promega) avec les modifications suivantes par rapport aux instructions du fabricant : le mélange pour la ligation (qsp 3 μ L) est constitué de 1,45 μ L de tampon de ligation 2X, 1 unité de T4 DNA ligase, 0,25 μ L de plasmide et 1 μ L de produit PCR. L'incubation dure une nuit à 4°C. A chaque produit de ligation sont ajoutés 25 μ L de bactéries thermocompétentes. Après un passage de 30 mn dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique de 50 secondes à 42°C. Elles sont refroidies 5 mn à 4°C, puis 500 μ L de milieu LB sont ajoutés dans chaque tube. Les bactéries sont incubées pendant une heure à 37°C. Une brève centrifugation est effectuée (12000g, 30 secondes), 450 μ L de surnageant sont ôtés et le culot est resuspendu dans les 75 μ L restants puis étalé sur LB+ampicilline 100 mg.L⁻¹ + X-Gal (10 mg.L⁻¹) + IPTG (100 mg.L⁻¹). Ces boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit. Cinq colonies blanches sont prélevées et étalées sur LB+ampicilline et incubées à 37°C pendant une nuit. Deux PCR sont réalisées directement sur ces colonies : l'une avec les amorces SP6 et T7 situées de part et d'autre du polylinker, et l'autre avec les amorces Eco0 et Mse0 (2 mn à 95°C ; 30 cycles avec 30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 1 mn à 72°C ; 5 mn à 72°C). Les colonies ayant intégré l'insert AFLP sont conservés en cryotubes ou en plaques 96 puits, dans un mélange LB/glycérol 15%, et conservés à -80 °C jusqu'au séquençage.

Tableau II.5 : Amorces utilisées pour l'étude des défenses induites sur semis de pommier

<i>gène</i>	<i>fonction</i>	<i>accession</i>	<i>amorces</i>	<i>séquence</i>	<i>taille de l'amplifiat</i>	<i>Tm</i>
<i>actine 2</i>	cytosquelette	CV151413	act2-di	CAACCTCTCGTCTGTGATAATG	140	58 °C
			act2-re	GCATCCTTCTGTCCCATCC		
<i>tubuline A</i>	cytosquelette	CO065788	TUA-di	GTTCAATGCTGTTGGTGGTG	118	55°C
			TUA-re	CTGCGGAGAAGGATAGATGG		
<i>GAPDH</i>	métabolisme I	CN494000	GAPDH-di	CTTGCTCCGCCCTTTCC	373	60°C
			GAPDH-re	CGTAGTTCACCTCCATTGTTGC		
<i>EDS1</i>	voie de l'acide salicylique	CN949066	EDS1-di	TGGAGRWRGTGTTTTGGAGAAGC		60°C
			EDS1-re	AGAACCAGATTGTGRCAARCGC		
<i>NPR1</i>	voie de l'acide salicylique	CN496210	NPR1-di	AAGGAGATGGCAGATACTCATT	279	58°C
			NPR1-re	CCTCTTGATTCTTTGCTCTTCG		
<i>PR-1</i>	voie de l'acide salicylique	AF507974	PR1-di	AGCACACGAGTTCGACTCATAA	167	58°C
			PR1-re	CACAAAACACTACGCCAACCAA		
<i>LOX2</i>	voie de l'acide jasmonique	CN581675	lox2-di	GTTGCGTATGGGAAGGAATGG	199	58°C
			lox2-re	GGTAGTAGTGGTTAAGTAGTCAGTG		
<i>JAR1</i>	voie de l'acide jasmonique	CN879199	JAR-di	CGTTCCTTCTCCACAATCC	118	60°C
			JAR-re	GGGTTCTTGGTGAATGTTGC		
<i>DEF</i>	voie de l'acide jasmonique	CN494885	defMA-di	CGTGAGTAAAAGTAACTGTGC	84	60°C
			defMA-re	AAGCATCTACGGCGTAAG		
<i>ACCO</i>	voie de l'éthylène	AB086888	acco-di	GTCGGTGCTGGGTAATCAC	193	60°C
			acco-re	ACGGAGAGTGGGTTGATGTG		
<i>EIN3</i>	voie de l'éthylène	CN992902	EIN3-di	CGTTATGGCGTTGGTTAGG	212	60°C
			EIN3-re	CAGAAATGGAGAGGACTTGC		
<i>PR-4</i>	PR-protéine	CN877594	PR4-di	GAAGGTGCCTCTTGGTG	123	60°C
			PR4-re	CGTCGGTGTCAATTTGG		
<i>DFR</i>	métabolisme II	AF494390	DFR0705-di	CGGTTGGATGTACTTCG	239	60°C
			DFR0705-re	TGTGAGAAAGGCAGAGG		
<i>FLS</i>	métabolisme II	AF494388	FLS-di	CGCCCTGATCTTGCCCTTGGAG	64	60°C
			FLS-re	GGACGAGAATGGTGACGGTGGAC		
<i>CHS</i>	métabolisme II	AF494401	CHSq2-di	ATTGGTGCCGACCCAGTGC	234	60°
			CHSq2-re	AATCCAGAAGAGTGAGTTCCAGTCC		
<i>PR-2</i>	PR-protéine	AY548364	PR2-di	AATTGTTATATCGGAGAGTG	152	55°C
			PR2-re	TGGCAAAGATGTAAGTTTC		

5.6 EXPRESSION DES CANDIDATS AFLP SELECTIONNES

Sur la base du résultat de séquençage, deux amorces spécifiques sont dessinées par gène candidat. Des qRT-PCR sont réalisées sur deux répétitions biologiques d'ARNs bactériens.

5.7 DESSIN D'AMORCES POUR LES PCR

La séquence du chromosome de la souche américaine *Ea* 273 (tableau II.1) a été utilisée pour le dessin d'amorces de gènes ciblés (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_amylovora/). La recherche d'ORFs a été réalisée avec GeneMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>). Plusieurs logiciels ont été utilisés : Primer 3 disponible sur internet (WWW.primer3.com) ou Beacon Designer (Biorad) conçu pour dessiner des amorces adaptées à la PCR quantitative.

5.8 AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR QUANTITATIVE (qPCR)

La qPCR permet de suivre à tout moment la quantité d'ADN présent dans chaque puits. Le SYBR® Green présent dans le mélange réactionnel se fixe à chaque cycle sur les doubles brins d'ADN et émet alors une fluorescence (maximum d'excitation 494 nm, maximum d'émission 521 nm), dont la mesure permet de quantifier l'ADN amplifié. Toutes ces PCRs ont été faites sur un appareil Biorad du type iCycler. Le mix utilisé (qPCR™ Mastermix Plus for SYBR Green I with Fluorescein, Eurogentec) contient une "hot goldstar DNA polymerase" qui doit subir une étape d'activation consistant à chauffer le mélange réactionnel 2 mn à 50°C puis 10 mn à 95°C. Suivent ensuite 40 cycles d'amplification, chaque cycle comprenant 15 secondes à 95°C et 45 secondes à la température optimale d'hybridation des amorces, puis 30 secondes à 72°C. La fluorescence est alors mesurée pendant cette phase.

Les expressions de gènes ont été normalisées à l'aide des gènes de l'actine (CV151413), de la GAPDH (Defilippi *et al.*, 2005) et de l' α -tubuline (CO065788) pour les ADNc de semis de pommier (tableau II.5) ; de 2 gènes de ménage (*proC*, *rpoD*) (Savli *et al.*, 2003) et du 16s (X83265) (Bereswill *et al.*, 1995) pour les ADNc de bactéries (tableau III.3). L'évaluation de la stabilité de leur expression a été testée selon Vandesompele *et al.*, 2002, qui font l'hypothèse que si deux gènes sont exprimés de manière constante, quelles que soient les conditions expérimentales ou le tissu, alors le rapport de leurs expressions est constant.

Pour chaque couple d'amorces utilisé, des dilutions en série au quart sont réalisées à partir d'un stock de mélange d'ADNc et une courbe standard est construite à partir des résultats de la PCR de chacune de ces dilutions déposée en triplicat. Les conditions de la PCR (concentration des amorces et du MgCl₂, température d'hybridation...) doivent permettre d'atteindre une efficacité E de PCR située entre 85 et 105% ($E=10^{(-1/\text{pente courbe})}$). Une fois l'efficacité vérifiée pour chaque couple d'amorces, les mêmes conditions de PCR sont appliquées sur les échantillons à tester dilués le plus souvent au 1/64^e afin de se situer dans la gamme de dilutions de la courbe standard. L'expression d'un gène d'intérêt (Gi) dans un échantillon donné (test) est alors calculée selon la méthode du DDcT (expression relative ou ER). Elle est rapportée :

- d'une part à l'expression des gènes de référence (Gr) dans cet échantillon
- d'autre part à l'expression du gène d'intérêt, elle-même normalisée par celles des gènes de référence, dans un échantillon choisi comme calibrateur selon la formule

$$(ER_{Gi})_{\text{test}} = \log_2 \left(\frac{2^{-[\text{Ct test} - \text{Ct calibrateur}]_{Gi}}}{\sqrt{\prod_{J=1}^3 (2^{-[\text{Ct test} - \text{Ct calibrateur}]_{Grj}})}} \right)$$

6. ANALYSE DE DONNEES

Les analyses de variance ou les tests de Kruskal-Wallis ont été réalisées à l'aide de du logiciel Statgraphic Plus 3.1. Lorsque les données étaient sous forme de pourcentages (pourcentages d'infection), elles ont d'abord été transformées en $\arcsin\sqrt{\%}$. Pour chaque analyse, l'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Bartlett. En cas de non homogénéité (expression de quelques gènes de défense du Pommier), le test de Kruskal-Wallis a été appliqué à la place de l'analyse de variance. La comparaison des moyennes a été effectuée selon la méthode du LSD (Least Significant Difference) de Fisher.

Une analyse en composantes principales a été réalisée sur les données d'expression relative de gènes de défense du Pommier à l'aide du logiciel Statbox 6. Les données ont été centrées réduites avant analyse.

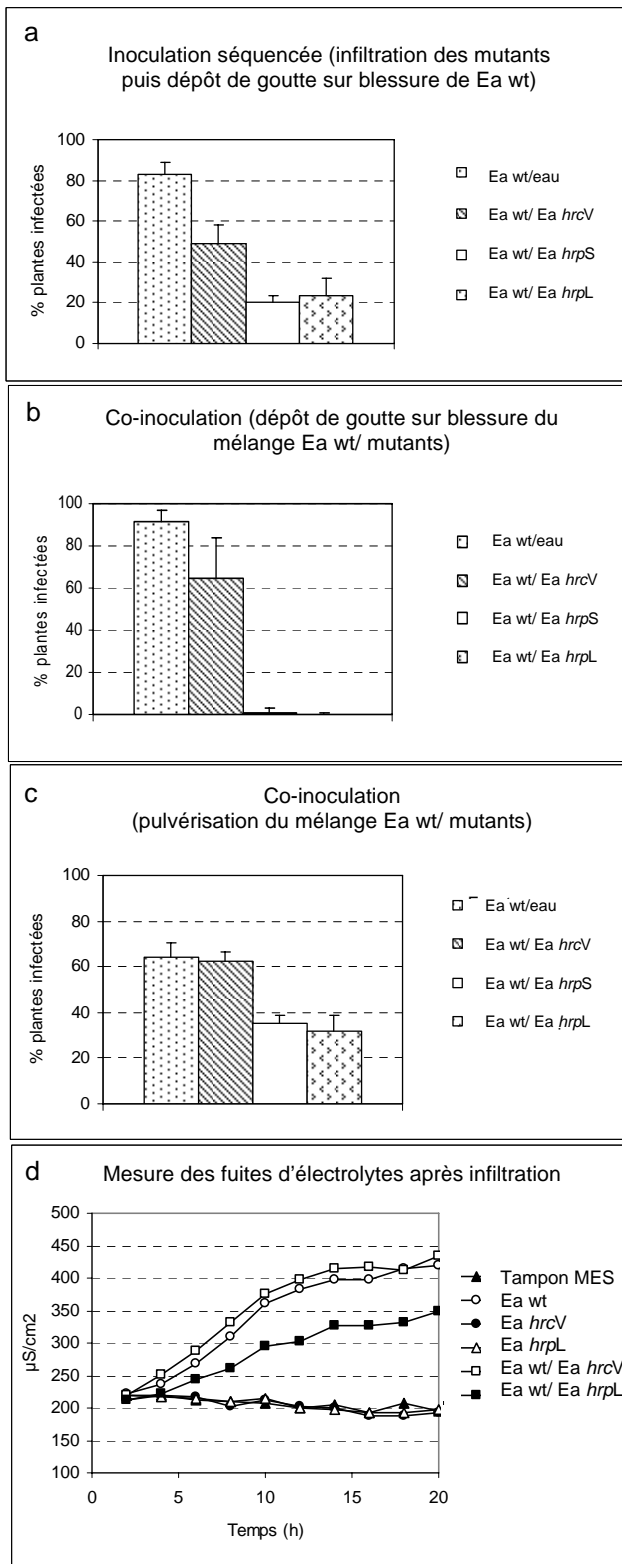


Figure 3.1 : Protection obtenue avec plusieurs biotests sur plantes entières (a, b, c) et sur disques de feuilles détachées (d) utilisant différentes méthodes d'inoculation. Moyennes de trois répétitions et intervalles de confiance au seuil de 5% pour les tests sur plantes entières et moyenne de 3 répétitions de 10 disques foliaires d'une expérience type.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1 MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DE LA PROTECTION ET ANALYSE DU PARTENAIRE PLANTE

Les expériences réalisées par Faize et ses collaborateurs (1999) sur semis de Pommier ont montré que certains mutants du système *hrp*, en particulier les mutants de régulation, sont capables de moduler l'interaction compatible *E. amylovora*/pommier, et de protéger la plante contre cette maladie. Avant d'analyser successivement le rôle éventuel de la plante et des bactéries dans cette protection, nous avons voulu tester plusieurs biotests pour la révéler. Cela nous permettait de vérifier qu'elle survient dans des conditions diverses. Ce travail nous a permis en outre de disposer d'une panoplie de tests, parmi lesquels nous pouvions choisir le plus judicieux selon le but recherché. En particulier dans cette première partie de résultats, a été étudiée à l'aide d'un des biotests, la possibilité que cette protection soit due à l'activation de défenses chez la plante par les mutants *hrp* de régulation.

1.1 COMPARAISON DE DIFFERENTS BIOTESTS

La protection induite par des mutants *hrp* d'*E. amylovora* (deux mutants de régulation *Ea hrpL* et *Ea hrpS*, un mutant de sécrétion *Ea hrcV*) a été étudiées à l'aide de trois biotests sur plantes entières et d'un biotest sur disques de feuilles (figure 3.1). Sur plante entière, les suspensions bactériennes sont appliquées :

- soit en **inoculation séquencée** : infiltration sous vide du mutant (10^9 ufc.mL⁻¹) puis inoculation d'*Ea* wt (10^8 ufc.mL⁻¹) par dépôt de goutte sur blessure
- soit en **co-inoculation** : les suspensions bactériennes sont mélangées (10^8 ufc.mL⁻¹ pour *Ea* wt et 10^9 ufc.mL⁻¹ pour les mutants) puis immédiatement appliquées par pulvérisation, ou par dépôt de goutte sur blessure.

Le niveau de protection est apprécié par la réduction du pourcentage d'infection par rapport à un témoin.

Sur disques de feuilles, l'infiltration sous vide des bactéries est suivie de la mesure des fuites d'électrolytes. Une diminution de la fuite d'électrolytes correspond à une diminution de la mort cellulaire, que nous interprétons comme une protection des cellules de l'hôte.

Dans les biotests sur plantes entières, les taux d'infection obtenus avec la souche sauvage *Ea* wt varient de 80 à 90 % lorsque *Ea* wt est inoculée par dépôt de goutte sur blessure (figure 3.1, a et b). Par contre, lorsque *Ea* wt est inoculée par pulvérisation (sans blessure), le taux d'infection est d'environ 60 % (figure 3.1, c). Dans chacun de ces biotests, les niveaux de protection obtenus avec le mutant de sécrétion sont significativement inférieurs à ceux obtenus avec les mutants de régulation *Ea hrpS* et *Ea hrpL* et ces deux derniers offrent une protection comparable. En inoculation séquencée (figure 3.1, a) comme en co-inoculation avec dépôt de goutte sur blessure (figure 3.1, b), un certain niveau de protection est obtenu avec le mutant de sécrétion. En revanche, cette protection disparaît lorsque la co-inoculation est réalisée par pulvérisation (figure 3.1, c). Les niveaux de protection avec les deux mutants de régulation varient également en fonction de la méthode d'inoculation utilisée. En co-inoculation par dépôt de goutte sur blessure, la protection assurée par les mutants de régulation est quasi-totale (figure 3.1, b) ; par les deux autres méthodes, la protection est partielle, mais elle reste environ deux fois plus efficace qu'avec le mutant de sécrétion (figure 3.1, a et c).

Tableau III.1 - P-values obtenues par analyse de variance (caractères standards) ou test de Kruskal-Wallis (caractères italiques) effectués sur les expressions relatives de 12 gènes de défense dans des feuilles de Pommier pulvérisés avec Ea wt, Ea *hrc* V, Ea *hrp* S, Ea *hrp* L, seules ou en mélange, et comparées à un témoin eau. Analyses réalisées temps par temps, sur les moyennes de 3 répétitions biologiques.

	Voie SA		Voie JA		Voie ET	Protéines PR				Voie des phénylpropanoïdes		
	EDS1	NPR1	LOX2	JAR	EIN3	PR1	PR2	PR4	DEFMA	DFR	FLS	CHS
6h	0,1307	0,8037	<i>0,5727</i>	<i>0,8498</i>	0,9643	0,9621	<i>0,4514</i>	0,9805	0,8891	0,9988	1,0000	0,7538
24h	0,5749	0,9229	0,9056	0,9213	0,9902	0,9620	0,9349	0,6090	0,3187	0,9958	0,9995	<i>0,6913</i>
48h	0,8302	0,9796	0,5283	0,1095	0,8879	0,4041	<i>0,1386</i>	0,2182	0,4852	0,9999	1,0000	0,8948
72h	0,4253	0,9696	0,8802	0,0352	0,6639	0,1268	0,0881	0,0054	0,1408	0,9958	0,9986	0,6793
96h	0,1695	0,7314	0,8356	0,1039	0,2789	0,0944	0,1047	0,0005	0,1533	0,9973	1,0000	0,5101

Pas d'effet traitement
 Effet traitement au seuil 10%
 Effet traitement au seuil 5%
 Effet traitement au seuil 1%

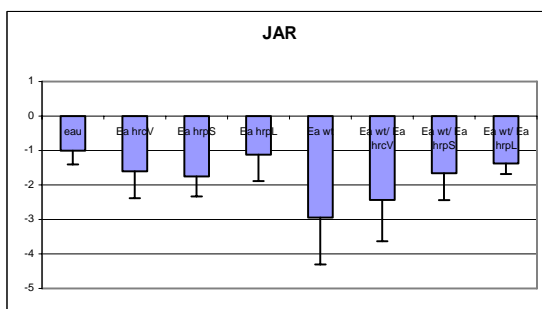
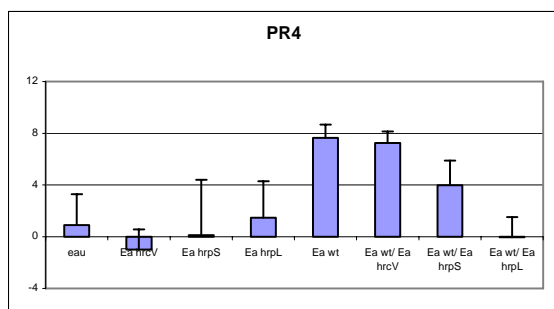


Figure 3.2 - Expression relative du gène de la PR4 et du gène JAR dans des feuilles de Pommier pulvérisés avec Ea wt, Ea *hrc* V, Ea *hrp* S, Ea *hrp* L, seules ou en mélange, et comparées à un témoin eau. Moyenne et intervalles de confiance au seuil de 5% de 3 répétitions biologiques

Sur disques de feuilles détachées (figure 3.1, d), la souche sauvage provoque une forte fuite d'électrolytes, correspondant à la mort cellulaire (rupture des membranes), première manifestation de la maladie. Les mutants de régulation et de sécrétion ne provoquent aucune fuite. L'infiltration d'un mélange de la souche sauvage et du mutant de régulation *Ea hrpL* (seul mutant de régulation testé) ($10^8/10^9$ ufc.mL⁻¹; situation de protection) conduit à une forte diminution de cette fuite d'électrolytes. En revanche, le mutant de sécrétion ne modifie pas la fuite provoquée par la souche sauvage (situation de non protection).

1.2 RECHERCHE DE GENES DE DEFENSE INDUITS CHEZ LA PLANTE

Nous faisons l'hypothèse que des réactions de défenses de la plante sont spécifiquement induites par les mutants de régulation en situation de protection. Les études d'expression de gènes de défense ont été réalisées sur feuilles de plantules de Pommier inoculées par pulvérisation avec les mutants seuls ou en mélange avec la souche sauvage. Ce biotest a été choisi d'une part parce qu'il se rapproche des conditions naturelles d'infection, d'autre part parce que le mutant de sécrétion n'assure pas de protection avec cette méthode. Nous avons choisi d'étudier l'expression de gènes impliqués dans les trois grandes voies de défense connues chez la plante : voie de l'acide salicylique (SA), voie de l'acide jasmonique (JA) et voie de l'éthylène (ET). Chez le Pommier, ces différentes voies de défenses ne sont pas décrites. Nous avons donc supposé qu'elles sont similaires à celles décrites chez *Arabidopsis thaliana*. Ainsi plusieurs gènes spécifiques de ces voies ont été choisis à différents niveaux (synthèse, transduction et protéines PR) : EDS1, NPR1, PR1 et PR2 pour la voie du SA ; LOX2, JAR1, DEF pour la voie du JA ; EIN3 et PR4 pour la voie de ET. Par ailleurs trois autres gènes codant des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (CHS, FLS et DFR) ont été étudiés car on sait que cette voie du métabolisme secondaire est réprimée par *E. amylovora* chez le Pommier (Venisse *et al.*, 2002).

Les prélèvements de feuilles ont été effectués 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après inoculation, en poolant la plus jeune feuille développée de 7 plantules à chaque temps de prélèvement. L'apparition des premiers symptômes a été observée à partir de 48 heures après inoculation. Trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées.

1.2.1 ANALYSE DE VARIANCE

Les expressions des gènes de défense dans les plantules soumises aux différents traitements ont été rapportées aux expressions de ces gènes dans le prélèvement à 6 h du témoin eau d'une des trois répétitions biologiques. Pour étudier l'effet des différents traitements sur ces expressions relatives, des analyses de variance (ou test de Kruskal-Wallis en cas de variances non homogènes) ont été effectuées sur les moyennes des expressions relatives de chaque gène à chaque temps de prélèvement.

Nos analyses montrent que les premiers effets significatifs entre traitement apparaissent 72 h après inoculation (tableau III.1). Seuls les gènes JAR, PR1, PR2 et PR4 varient significativement suivant les différents traitements 72 et/ou 96 h après inoculation. PR1, PR2 et PR4 ont des profils d'induction similaires (figure 3.2) qui s'opposent au profil d'induction de JAR : les trois premiers gènes sont surtout induits par *Ea wt* seule ou en mélange avec *Ea hrcV* (situation de non protection) par rapport aux situations témoins (eau, mutants seuls) alors que JAR est plutôt réprimé. Les modulations d'expression de ces quatre gènes dans les tissus co-inoculés avec *Ea wt* et *Ea hrpL* ou *Ea wt* et *Ea hrpS* (protection) sont intermédiaires. L'absence d'effets significatifs sur la modulation des autres gènes peut être due à une forte variabilité des résultats, en particulier en ce qui concerne les gènes de la voie des phénylpropanoïdes.

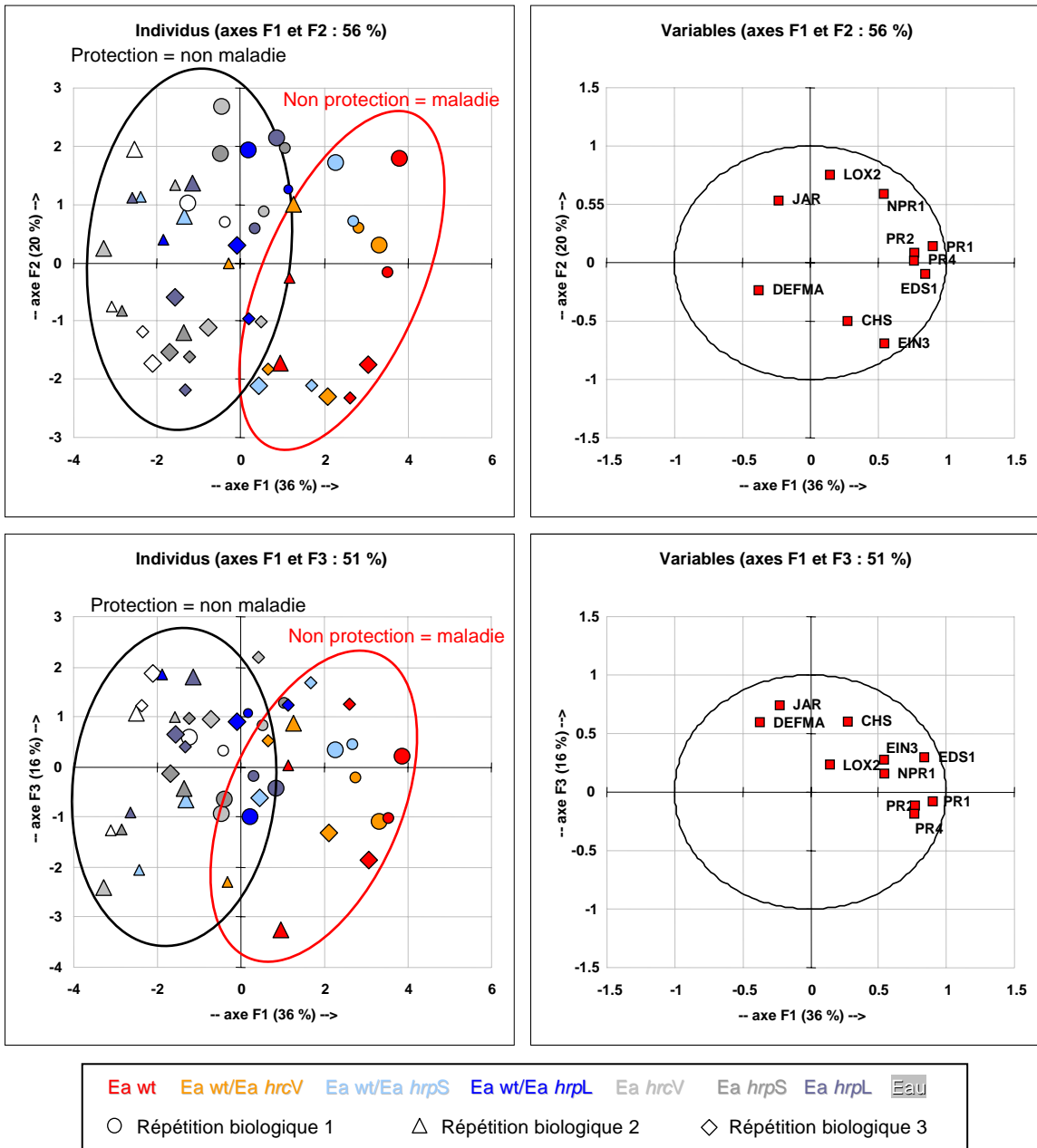


Figure 3.3 – Analyse en composantes principales des expressions relatives de 10 gènes de défense dans des feuilles de Pommier 72h (petits symboles) et 96h (grands symboles) avec *Ea wt*, *Ea hrcV*, *Ea hrpS* et *Ea hrpL*, seules ou en mélange, et comparées à un témoin eau.

1.2.2 ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP)

Une analyse en composantes principales a aussi été réalisée sur les expressions relatives de l'ensemble des gènes aux deux temps de prélèvement, 72 et 96 h, et sur les trois répétitions biologiques, pour tenter de différencier les situations étudiées et pour déterminer les gènes dont les expressions sont corrélées. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la figure 3.3 : les individus correspondent aux échantillons des différents traitements, et les variables, aux gènes étudiés. Le premier axe principal (F1) explique 36% de la variabilité totale alors que les deuxième et troisième axes (F2 et F3) en expliquent respectivement 20 et 16%.

Les deux plans principaux F1xF2 et F1xF3 mettent en évidence une opposition entre les sous-populations d'individus constituées par i) les échantillons traités avec *Ea wt* seule (maladie) ou en mélange avec *Ea hrcV* (non protection) d'une part, et ii) les échantillons traités avec l'eau et les mutants seuls (non maladie) ou avec *Ea wt* en mélange avec *Ea hrpL* (protection) d'autre part. Deux répétitions sur trois des échantillons traités avec *Ea wt* en mélange avec *Ea hrpS* (protection) se situent dans cette dernière sous-population, alors que les échantillons de la troisième répétition se situent dans la première sous-population, comme si la protection n'avait « fonctionné » qu'une fois sur trois (ce qui n'est pas vérifiable expérimentalement puisque le test est destructeur des plantules).

Dans ces plans, l'axe F1 semble représenter l'effet « maladie » sur les modulations de l'expression des gènes de défense. Les gènes contribuant le plus à la formation de cet axe sont PR1 ($\sigma^2=0,81$), EDS1 ($\sigma^2=0,71$), PR2 ($\sigma^2=0,59$) et PR4 ($\sigma^2=0,59$) et ils sont induits par la maladie. Les axes F2 et F3 semblent plus représenter une variabilité entre répétitions et/ou entre les deux temps de prélèvements 72 et 96 h. Le gène contribuant le plus fortement à l'axe F2 est LOX2 ($\sigma^2=0,58$) et celui contribuant le plus à l'axe F3 est JAR ($\sigma^2=0,55$). Pour illustrer la variabilité entre répétitions, on peut voir que le gène LOX2 est réprimé en situation de maladie (*Ea wt*) par rapport au témoin eau au temps de prélèvement 96 h, dans une répétition biologique sur trois. De même, le gène JAR n'est réprimé au même temps que dans deux répétitions sur trois. NPR1 et EIN3 semblent suivre les mêmes tendances d'induction que EDS1, PR1, PR2 et PR4 mais avec une plus forte variabilité. De même, DEF et CHS semblent suivrent les mêmes tendances de modulation d'expression que JAR mais avec une plus forte variabilité.

Cette ACP montre donc qu'en situation de maladie et de non protection, *E. amylovora* a tendance à induire la voie SA (représentée par EDS1, NPR1, PR1 et PR2) et ET (représenté par EIN3 et PR4), et à réprimer la voie JA et la voie des phénylpropanoïdes mais avec une plus grande variabilité. Cependant, elle ne permet pas de séparer une sous-population d'individus correspondant aux seules situations de protection (*Ea wt* en mélange avec *Ea hrpS* ou *Ea hrpL*) des sous-populations témoins (eau ou mutants seuls).

L'ensemble de cette expérience montre qu'il n'y a pas d'induction particulière de gènes de défenses parmi les mécanismes étudiés dans les situations de protection.

1.3 ETUDE DE LA DUREE DE LA PROTECTION

Afin de déterminer la durée de la protection conférée par les mutants de régulation, nous avons utilisé l'inoculation séquencée : infiltration de chaque mutant (à 10^9 ufc.mL⁻¹) suivie de l'inoculation de la souche sauvage (à 10^8 ufc.mL⁻¹) par dépôt de goutte sur blessure, immédiatement après infiltration, ou 2, 4, 6 jours après.

Nos résultats (figure 3.4) mettent en évidence qu'un niveau de protection s'établit avec tous les mutants, quel que soit le délai entre les deux inoculations. Toutefois, le niveau de protection obtenu ainsi que la différence d'efficacité de la protection entre les mutants de

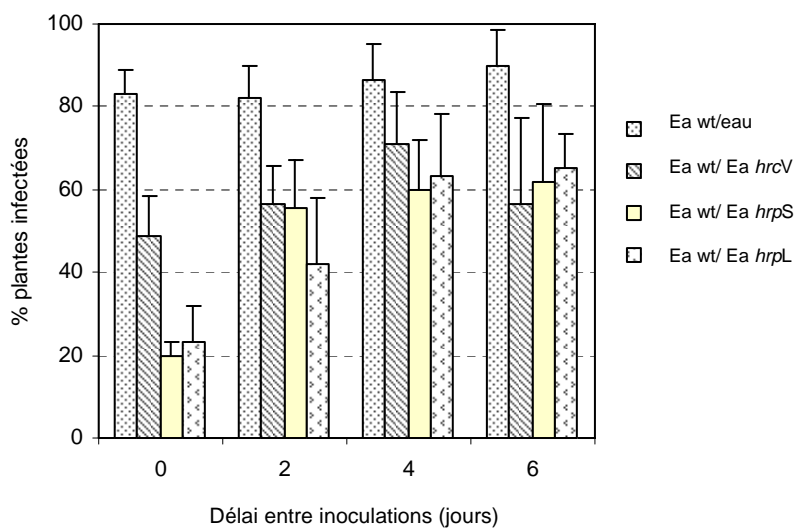


Figure 3.4 : Durée de la protection après inoculation séquencée avec infiltration de chaque mutant (10^9 ufc.mL⁻¹) et dépôt de goutte sur blessure par de la souche sauvage (10^8 ufc.mL⁻¹) . Moyenne des plantes infectées sur trois expériences avec trois réplicats de 10 semis par expérience et intervalles de confiance au seuil de 5%.

régulation et le mutant de sécrétion s'amenuisent dès que le délai d'application entre mutant et souche sauvage dépasse 2 jours.

1.4 DISCUSSION

Les résultats des trois types de biotests sur plante entière montrent que, quel que soit le biotest, le niveau de protection assuré par les mutants *hrp* de régulation est plus élevé que celui assuré par le mutant *hrp* de sécrétion, au moins dans les premiers jours de la confrontation. Ces résultats confortent ceux obtenus précédemment au laboratoire (Faize *et al.*, 1999). Cependant, les niveaux de protection obtenus avec les différents mutants varient en fonction du biotest utilisé.

Le biotest utilisant une co-inoculation par blessure et dépôt de goutte est celui qui conduit au niveau de protection le plus élevé. Dans des expériences préliminaires, nous avons tenté d'étudier l'expression de quelques gènes de défense à l'aide de ce biotest, en prélevant à l'emporte-pièce des disques de feuilles centrés sur la blessure (diamètre environ 0,5 cm). Ces expérimentations n'ont pas permis de révéler de modification d'expression de gènes particuliers dans les situations de protection. Il est possible que cet échec soit lié à un nombre trop faible de cellules végétales en contact avec les bactéries (et potentiellement réactives) puisque seules les cellules situées au niveau de la blessure sont concernées. Des extractions d'ADN à partir de feuilles entières ou de disques foliaires englobant la blessure diluent sans doute une éventuelle réponse de ces quelques cellules jusqu'à la rendre imperceptible. Ce biotest ne nous a pas paru utilisable pour une recherche de l'expression des gènes de défense du Pommier.

Le biotest utilisant l'inoculation séquencée (infiltration des mutants puis inoculation de *Ea wt* par dépôt de goutte sur blessure) nous a paru inapproprié pour l'étude de l'expression des gènes de défense du Pommier pour la même raison.

Il nous a semblé plus judicieux de retenir le biotest utilisant une co-inoculation des souches par pulvérisation, plus proche des conditions naturelles d'infection. De plus l'intérêt de ce biotest est d'offrir une situation contrastée : absence de protection avec le mutant de sécrétion et protection avec les mutants de régulation (alors que dans les autres biotests, le mutant de sécrétion assure un certain niveau de protection). Ce biotest présente néanmoins quelques inconvénients : i) on obtient rarement plus de 60 % d'infection avec la souche sauvage au lieu de 80-90 % avec les autres biotests. Par conséquent, les échantillons prélevés sur différentes plantules sont hétérogènes puisqu'ils contiennent à la fois des plantules infectées mais aussi des plantules non infectées (à cause de la protection ou bien parce que l'infection a échoué sur ces individus) et cette hétérogénéité peut expliquer en partie la variabilité obtenue dans l'expression des défenses ; ii) le succès de l'infection est conditionné par l'incubation des plantes en conditions d'humidité saturante pendant 24 h après inoculation, ce qui est un nouveau stress en soi, qui peut interférer avec l'expression de gènes de défense.

Enfin, le biotest sur disques de feuilles, a montré que l'étude des fuites d'électrolytes pouvait révéler la situation de protection avec un mutant de régulation au moins (*Ea hrpL*). Ce biotest précis et nécessitant peu de matériel végétal, nous a paru le mieux adapté pour tester le rôle d'éventuels éliciteurs bactériens, pour lesquels la quantité disponible peut être un facteur limitant.

Nous avons fait l'hypothèse que la protection observée avec les mutants de régulation pouvait être due à l'induction de défenses de la plante par des éliciteurs bactériens de type MAMPs présents chez ces mutants. Faize et ses collaborateurs (2006) ont en effet montré que les mutants *hrp* de sécrétion et de régulation inoculés par infiltration induisent

différentiellement certaines protéines de défense comme les peroxydases. Nous avons donc cherché à révéler des gènes de défense dont l'expression serait modulée spécifiquement en situation de protection. Nos résultats montrent qu'avec le biotest utilisé (co-inoculation des souches par pulvérisation), et parmi les défenses que nous avons étudiées, il n'y en a pas qui soient particulièrement induites en situation de protection. Cela diffère des résultats obtenus par Faize *et al.* (2006) avec un autre biotest utilisant l'inoculation par infiltration mais confirme que le choix du biotest est crucial pour l'étude de l'expression des gènes de défense du Pommier. Nous avons mis en évidence par inoculation séquencée avec un intervalle de temps croissant entre les inoculations mutants/souche sauvage, que la protection différentielle entre mutant de sécrétion et mutants de régulation disparaît rapidement et n'est plus sensible au-delà d'un intervalle de 2 jours. Ces résultats sont cohérents avec ceux concernant le rôle des gènes de défense de la plante : les réactions mises en place par la plante ne seraient pas impliquées dans la protection ou bien alors elles sont transitoires (et elles n'aboutissent pas à une accumulation de protéines de défense suffisante pour assurer une protection longue durée).

Une autre hypothèse pourrait être que les mutants seuls deviennent rapidement peu actifs métaboliquement après infiltration car ils sont incapables d'enrichir l'apoplaste en nutriments, par absence de système Hrp fonctionnel. Ils ne seraient donc actifs (et producteurs de MAMPs éventuels) qu'en présence de la souche sauvage qui, elle, se crée un milieu apoplastique favorable à la multiplication bactérienne. Selon cette hypothèse, on peut supposer qu'en augmentant le délai entre les 2 inoculations, on favorise la souche sauvage (inoculée à partir d'une culture en phase exponentielle) aux dépens des mutants (de moins en moins actifs métaboliquement).

Avant de statuer sur le rôle des réactions de défense dans la protection, il conviendrait d'explorer quelques pistes. En ce qui concerne le choix du biotest, il serait intéressant d'examiner les défenses induites dans le biotest avec infiltration, qui est celui qui permet de confronter de manière homogène l'ensemble des cellules des jeunes feuilles du Pommier avec les bactéries, ce qui devrait diminuer la variabilité liée à l'échantillonnage. D'autre part, compte tenu de la variabilité de l'expression de certains gènes de défense, liées entre autres aux conditions externes, il semblerait judicieux de se placer systématiquement en conditions contrôlées, ce qui n'est pas le cas dans nos expériences (voir ci-dessous). Il est également envisageable de travailler sur des cultures cellulaires plutôt que des tissus foliaires. Ainsi, des mécanismes de défense précoces pourraient être ciblés comme par exemple les variations de protéines de membrane plasmique (Benschop *et al.*, 2007). En effet, sur plantules, les symptômes de maladie apparaissent 48 heures après inoculation. Ces 48 heures sont donc cruciales pour l'établissement de la maladie ou de la protection, et des mécanismes précoces, localisés, sont peut-être suffisants pour l'établissement de la protection sans être relayés et amplifiés au niveau systémique. D'autre part, dans notre hypothèse d'une induction de réactions de défense de la plante, d'autres mécanismes n'impliquant pas de transcription de gènes (que nous avons recherchés) sont possibles : par exemple la production de formes actives d'oxygène néfastes pour la bactérie, par activation de NADPH oxydases pré-existantes, provoquée par les mutants de régulation et à un degré moindre par le mutant de sécrétion ou par la souche sauvage. Il serait intéressant d'essayer de mettre en évidence la production de ces formes actives d'oxygène dans les tissus, selon les mutants. D'éventuels changements d'ordre cytotologique (renforcement de la paroi, désorganisation cellulaire...) induits en situation de défense (Trouvelot *et al.*, 2008) pourraient aussi être recherchés. Par ailleurs, d'autres hormones sont aussi impliquées dans les défenses des plantes comme l'acide abscissique (ABA ; Mauch-Mani et Mauch, 2005), les brassinostéroïdes (Nakashita *et al.*,

2003), et l'auxine (Navarro *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007). Elles n'ont pas été étudiées dans nos essais mais leurs voies pourraient être intéressantes à explorer.

En situation de maladie, *E. amylovora* induit les voies SA et ET, et semble réprimer la voie JA bien que cette dernière tendance soit plus variable selon les répétitions biologiques. Ces résultats confortent d'autres travaux réalisés au laboratoire (Dugé, communication personnelle). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de répression forte et répétable de la voie des phénylpropanoïdes avec notre biotest, alors qu'elle est mise en évidence sur des clones (plants greffés) de Pommier inoculés par infiltration avec *Ea* wt, cette répression étant plus marquée sur des clones sensibles (Dugé, communication personnelle). Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que i) nous avons travaillé avec des plantules, qui constituent une population génétiquement hétérogène, puisque ce sont des semis issus de pollinisation libre, dans laquelle des individus peuvent présenter des niveaux de sensibilité différents et donc une variabilité de l'induction des défenses, ii) nos plantules sont maintenues en serre (éclairage naturel) alors que les clones de Pommier sont maintenus en chambre climatique (éclairage contrôlé) et que la lumière est un facteur important dans l'induction de la voie des phénylpropanoïdes, iii) les plantules sont inoculées par pulvérisation contrairement aux clones inoculés par infiltration (on obtient alors 100 % d'infection), les tissus prélevés sont donc fort probablement hétérogènes du point de vue de la confrontation de leurs cellules avec les bactéries, comme souligné précédemment.

Les études globales d'expression de gènes dans d'autres pathosystèmes montrent que les voies SA, JA et ET interagissent, positivement ou négativement (De Vos *et al.*, 2005 ; Spoel *et al.*, 2007). Les connections entre les voies de défense aideraient la plante à minimiser le coût énergétique des défenses et à créer un réseau flexible de signalisation lui permettant de réguler les réactions de défense en fonction de l'agresseur rencontré (Bostock, 2005). Les effecteurs Hrp peuvent avoir pour fonction d'altérer les défenses de la plante dans le but de les rendre inefficaces contre le pathogène et de reprogrammer l'expression des gènes de l'hôte pour favoriser le développement du pathogène (Abramovitch *et al.*, 2006). Ainsi, dans notre pathosystème, la répression des défenses efficaces JA-dépendantes pourrait être directe par les effecteurs, ou indirecte par l'activation des voies SA et ET.

2 ANALYSE DU PARTENAIRE BACTERIEN

Dans cette partie, nous avons fait porter l'analyse sur les partenaires bactériens, cultivés *in vitro*. Nous avons tenté de mettre en évidence d'éventuels phénomènes d'antagonisme entre mutants *hrp* de régulation et souche sauvage, et recherché des différences au niveau protéique et transcriptomique entre ces mêmes bactéries.

2.1 RECHERCHE D'UN EFFET ANTAGONISTE DIRECT ENTRE LES 2 PARTENAIRES BACTERIENS

Faize et ses collaborateurs (1999) ont montré que en co-inoculation avec le mutant de régulation *Ea hrpS* (situation de protection), les populations de la souche sauvage diminuent, alors qu'inoculées seules elles se multiplient. Aucun effet d'antibiose entre mutant et souche sauvage n'avait alors été mis en évidence *in vitro* sur milieu riche (non *hrp*-inducteur, donc ne mimant pas la plante). Nous avons vérifié que les résultats n'étaient pas différents en condition d'induction des gènes *hrp* (comme dans la plante). Il fallait également examiner

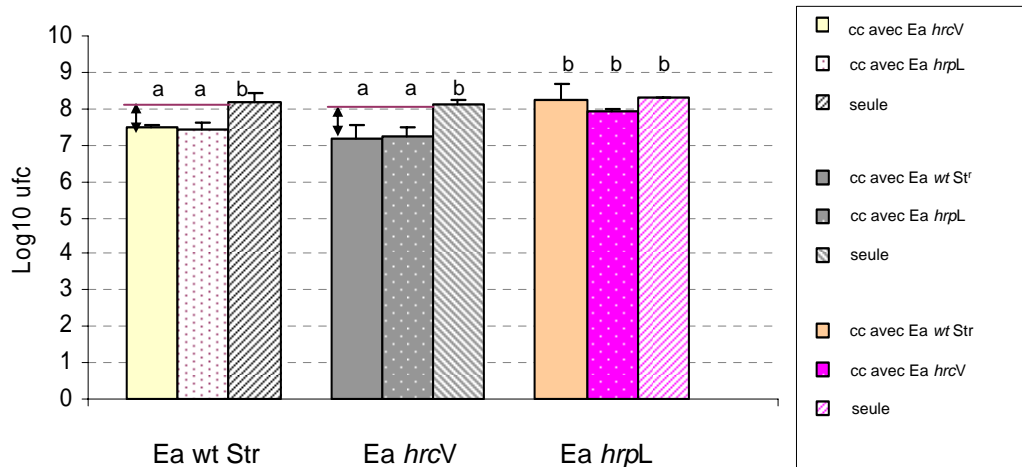


Figure 3.5 : Dénombrements des populations seules ou en co-culture (notée cc) après 65 heures de culture sur milieu M9 gal à 23°C. Concentrations de départ : 10^5 ufc/mL pour les bactéries seules, ou $10^5/10^6$ ufc.mL⁻¹ pour les bactéries en mélange. Seuls les comptages de la bactérie en minorité dans les mélanges sont représentés. Moyenne et intervalles de confiance au seuil de 5% de trois répétitions biologiques, les barres d'histogrammes surmontées des mêmes lettres représentent des densités de population bactérienne non significativement différentes au seuil de 5%.

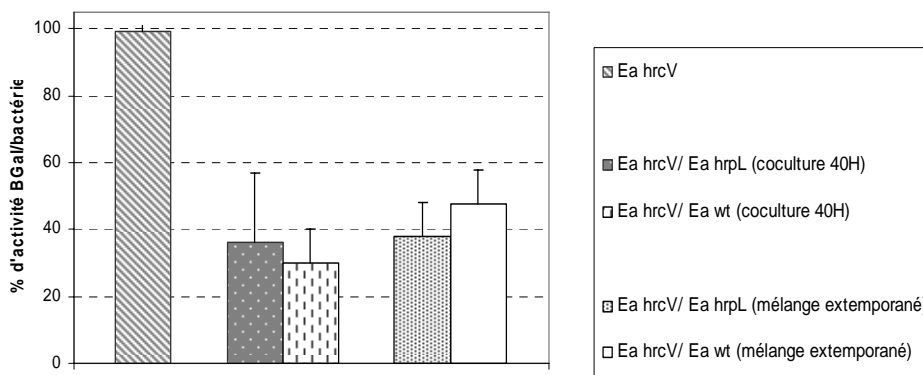


Figure 3.7 : Mesure de l'expression de la fusion *hrcV*::MudIIPR13-LacZ (chez le mutant *Ea hrcV*) après 40 heures de culture en milieu M9 gal sous agitation à 23°C. *Ea hrcV* est cultivé seul ou en mélange avec *Ea wt* ou *Ea hrpL*. Les concentrations de départ des suspensions sont 10^5 ufc/mL ou $10^5/10^6$ ufc/mL pour les mélanges. Moyenne de trois expériences indépendantes et intervalles de confiance au seuil de 5% .

l'hypothèse d'une répression de l'expression des facteurs de virulence de la souche sauvage en présence de ces mutants.

2.1.1 DYNAMIQUE DES POPULATIONS EN CO-CULTURES

L'apoplaste est pour la bactérie un milieu pauvre et *hrp*-inducteur. Nous avons réalisé des tests *in vitro* sur un milieu minimum *hrp*-inducteur (M9 gal). Nous avons préféré ce milieu au milieu IM qui est lui un milieu *hrp*-inducteur mais qui ne permet pas la croissance bactérienne puisqu'il ne contient pas d'acide nicotinique, indispensable à la croissance d'*E.amylovora*. Nous avons suivi la croissance de chacun des mutants *hrp* en co-culture avec *Ea wt*, par étalement de suspensions et dénombrement sur milieu sélectif. Les comptages bactériens sur milieux sélectifs faisant appel à des résistances aux antibiotiques chez les bactéries utilisées, nous avons employé un mutant pathogène résistant à la streptomycine noté *Ea wt St^f* (dont nous avons vérifié qu'il a le même pouvoir pathogène que *Ea wt*) pour « mimer » la souche sauvage. Les co-cultures ont été réalisées avec un ratio des concentrations de 1/10 qui est le ratio utilisé pour les inoculations sur plantes. Elles ont été comparées à des cultures pures de chacune des bactéries utilisées dans l'essai. L'inoculum de départ a été ajusté à 10^5 et 10^6 ufc.mL⁻¹ pour les bactéries en co-cultures ou 10^5 ufc.mL⁻¹ pour les bactéries seules. Nous avons réalisé des dénombrements à différents temps pendant 65 heures pour chaque condition (figure 3.5). En effet, la croissance dans ce milieu est lente et 65 heures environ de culture sont nécessaires pour atteindre la phase stationnaire.

Nos résultats montrent que, dans tous les mélanges, *Ea wt St^f* et le mutant de sécrétion *Ea hrcV* ont un niveau de population inférieur à celui atteint dans les cultures seules mais le niveau est le même quel que soit le partenaire dans la co-culture. Les mêmes résultats (non montrés) ont été obtenus avec un autre mutant pathogène de *Ea wt* mais résistant à un autre antibiotique (*Ea wt Cm^R*). Concernant l'hypothèse d'une antibiose *in vitro* en milieu M9 gal *hrp*-inducteur, il n'y a donc pas d'effet particulier du mutant *Ea hrpL* sur la croissance de la souche avec laquelle il est en co-culture. En revanche, le mutant *Ea hrpL* a un comportement particulier puisqu'il atteint la même densité de population bactérienne qu'il soit cultivé en mélange ou seul, en milieu mimant l'apoplaste de la plante.

2.1.2 INTERACTION PHYSIQUE ENTRE LES CELLULES

Nous avons observé que dans certaines cultures se forment des agrégats sur milieu *hrp*-inducteur. Ce phénomène se traduit par une précipitation des bactéries dans le fond du tube (figure 3.6, A). Nous avons donc voulu comparer ce phénomène chez *Ea wt* et ses mutants *hrp* de régulation ou de sécrétion, sur milieux non *hrp*-inducteurs (LB et M9 glu) ou sur milieux *hrp*-inducteurs (IM ou M9 gal).

Nous n'avons pas observé de formation d'agrégats sur les milieux non *hrp*-inducteurs. Les résultats montrent que seule la souche sauvage forme des agrégats après 6 heures d'induction dans le milieu IM ou après 24 heures dans le M9 gal (figure 3.6 A et B). En mélange, la formation des agrégats est observée malgré la présence des différents mutants (figure 3.6, C). Les mutants ne formant pas d'agrégats restent planctoniques (figure 3.6, D et E).

2.1.3 EXPRESSION DES GENES *HRP* DE LA SOUCHE SAUVAGE SEULE OU EN MELANGE AVEC LE MUTANT *HRP* PROTECTEUR

Nous nous sommes intéressés à l'expression des facteurs de virulence chez la bactérie lorsqu'elle est en présence du mutant *hrpL*. Parmi ces facteurs, nous avons la possibilité de suivre l'expression du gène de sécrétion *hrcV* chez le mutant *Ea hrcV* car il a intégré une

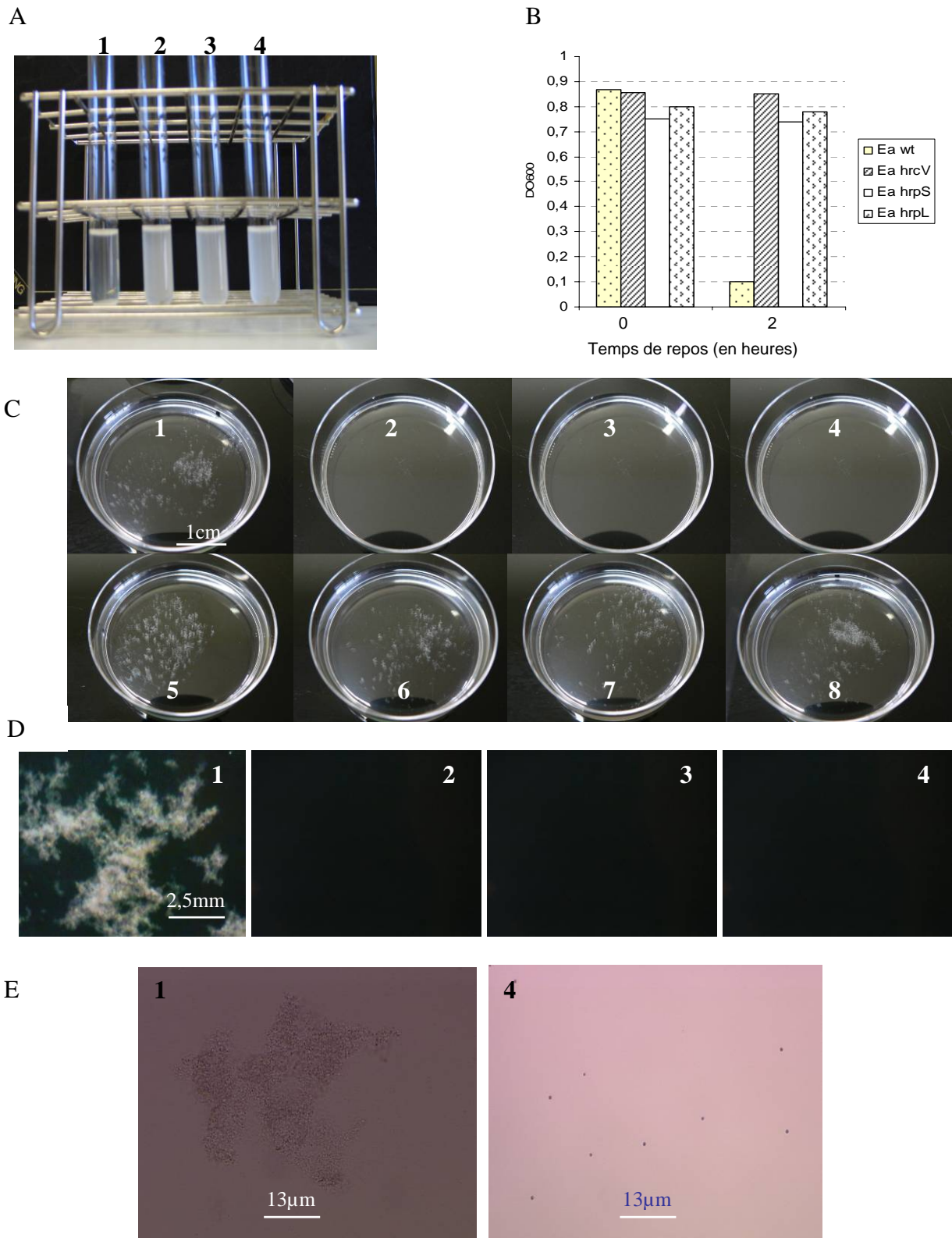


Figure 3.6 : Observation des agrégats dans les suspensions après culture en M9 gal pendant 24 heures à 23°C sous agitation et arrêt de l'agitation pendant 2 heures. (A et B) : bactéries cultivées seules à 10^8 ufc.mL⁻¹ ; (C, D et E) *Ea wt* seule (10^6 ufc.mL⁻¹) ou en mélange avec les mutants (10^7 ufc.mL⁻¹). *Ea wt* (1), *Ea hrcV* (2), *Ea hrpS* (3), *Ea hrpL* (4) *Ea wt*/*Ea wt* (5), *Ea hrcV*/*Ea wt* (6), *Ea hrpS*/*Ea wt* (7), *Ea hrpL*/*Ea wt* (8). A) en tube après 2 heures d'arrêt de l'agitation, B) valeur de DO₆₀₀ après culture; C) vue à la loupe binoculaire après 2 heures d'arrêt de l'agitation, D) vue microscopique après 2 heures d'arrêt de l'agitation. Les mêmes résultats sont obtenus sur milieu IM et ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

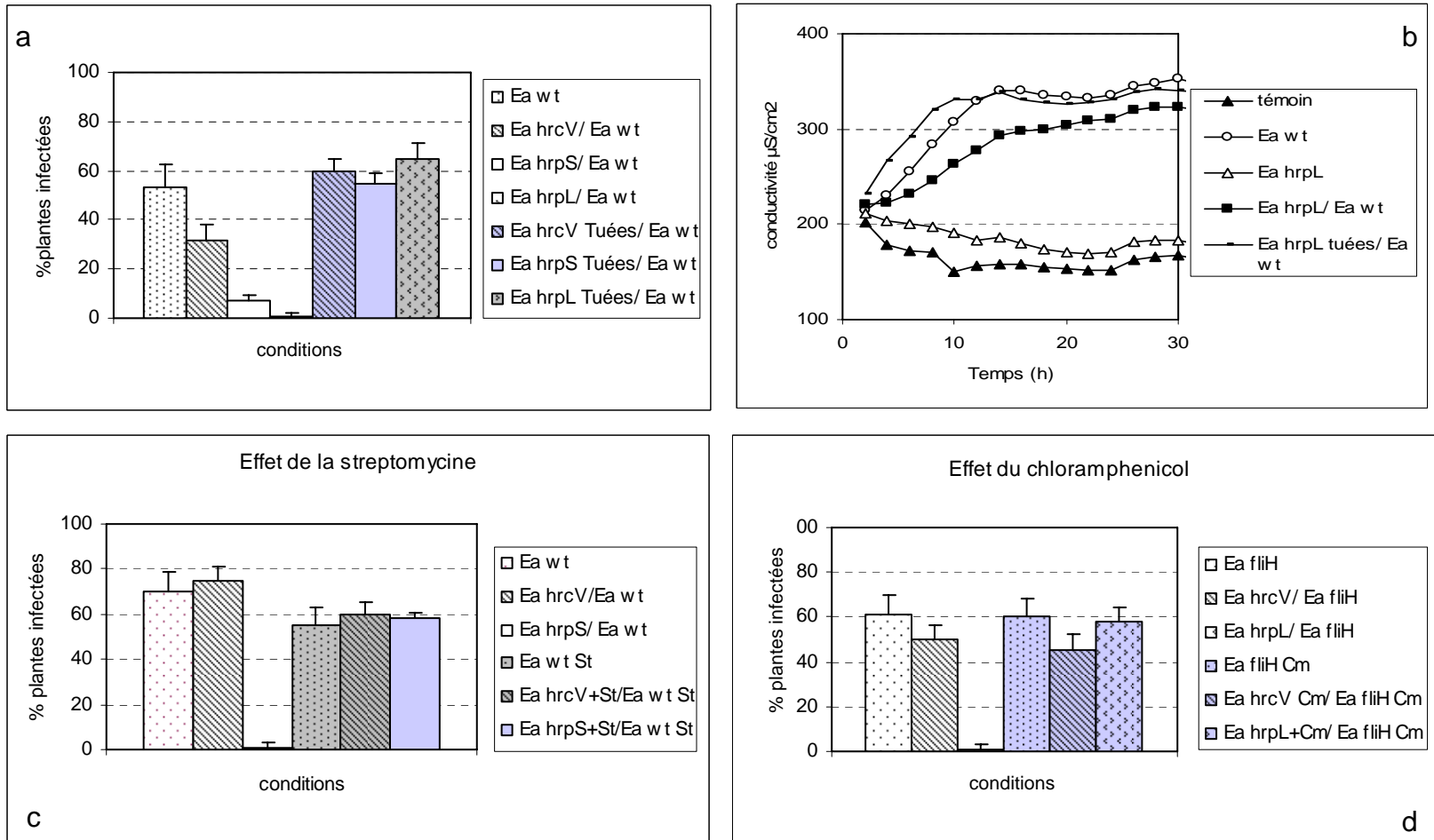


Figure 3.8 : Influence de l'état des bactéries sur la protection dans différents biotests (co-inoculation par blessure et dépôt de goutte (a, c, d) ou fuites d'électrolytes (b)). Bactéries tuées à la chaleur (a et b) ou inactivées métaboliquement (c et d). Moyenne et intervalles de confiance au seuil de 5% de trois répétitions de 10 plantes ou moyenne de 10 disques par condition Chloramphenicol (Cm) ; Streptomycine (St).

fusion *lacZ* dans ce gène. L'expression du gène a été mesurée soit dans une culture pure, soit dans un mélange avec la souche sauvage *Ea wt* et ou avec le mutant de régulation *hrpL* co-cultivés pendant 40 heures, soit dans un mélange extemporané des suspensions des bactéries cultivées seules en parallèle (en respectant le ratio 1/10). Le calcul des activités a été exprimé en pourcentage de l'activité β -galactosidase chez le mutant *Ea hrcV* cultivé seul.

Nous avons noté (figure 3.7) que l'activité β -galactosidase de *Ea hrcV* est moins forte lorsqu'il est en mélange que lorsqu'il est cultivé seul. Ceci peut être dû à une difficulté expérimentale (lyse moins efficace des cellules compte tenu de la concentration bactérienne plus forte dans les mélanges). Nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du mutant *Ea hrpL* sur l'expression du gène *hrcV* après 40 heures de co-culture sur milieu *hrp*-inducteur, comparé au mélange extemporané des deux bactéries cultivées seules en parallèle (figure 3.7).

2.2 ROLE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES MUTANTS DANS LA PROTECTION

2.2.1 ABSENCE DE PROTECTION PAR DES BACTERIES TUEES A LA CHALEUR

Nous avons testé l'aptitude à la protection des mutants *hrp* lorsque leurs cellules ont été tuées à la chaleur. Deux biotests ont été utilisés. Le premier est réalisé sur plante entière et comprend une co-inoculation par blessure et dépôt de goutte (10^8 ufc.mL⁻¹ pour *Ea wt* et 10^9 ufc.mL⁻¹ pour les mutants). Le second biotest est réalisé sur disques de feuilles co-inoculées par infiltration sous vide (10^8 ufc.mL⁻¹ pour *Ea wt* et 10^9 ufc.mL⁻¹ pour les mutants), pour lesquels on mesure les fuites d'électrolytes pendant 48 heures.

Nos résultats avec le premier biotest montrent que la protection n'est obtenue qu'avec des bactéries vivantes (figure 3.8 a) puisque les taux d'infection avec les bactéries tuées ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec la souche sauvage seule. Le biotest sur disques de feuilles montre qu'il n'y a plus de diminution des fuites d'électrolytes lorsque les bactéries *Ea hrpL* sont tuées (figure 3.8, b).

2.2.2 ABSENCE DE PROTECTION EN PRESENCE D'INHIBITEURS DE LA SYNTHESE PROTEIQUE

Nous avons testé l'effet d'inhibiteurs de la synthèse protéique chez les procaryotes (antibiotiques), sur la capacité de protection des mutants *hrp* de régulation. Pour cela, les suspensions de mutants ont été réalisées en mélange avec des antibiotiques puis agitées pendant deux heures, avant co-inoculation par blessure et dépôt de goutte (10^8 ufc.mL⁻¹ pour *Ea wt* et 10^9 ufc.mL⁻¹ pour les mutants). Pour « mimer » la souche sauvage *Ea wt*, nous avons utilisé dans ce biotest des mutants pathogènes de la souche sauvage résistants au chloramphénicol (*Ea wt Cm^r*) ou à la streptomycine (*Ea wt St^r*).

Dans nos résultats (figure 3.8, c et d), l'effet des antibiotiques est très net : en présence de chloramphénicol ou de streptomycine, les deux mutants protecteurs *Ea hrpL* et *Ea hrpS* n'assurent plus la protection. La protection nécessite donc des bactéries actives métaboliquement et compte tenu du mode d'action de ces antibiotiques, l'origine de cette protection pourrait être protéique.

2.3 LOCALISATION EXTRACELLULAIRE DE FACTEURS A L'ORIGINE DE LA PROTECTION CHEZ LES MUTANTS

Nous avons cherché à connaître la localisation du (des) facteur(s) bactérien(s) à l'origine de la protection. Pour cela, nous avons testé l'aptitude à modifier les fuites d'électrolytes du

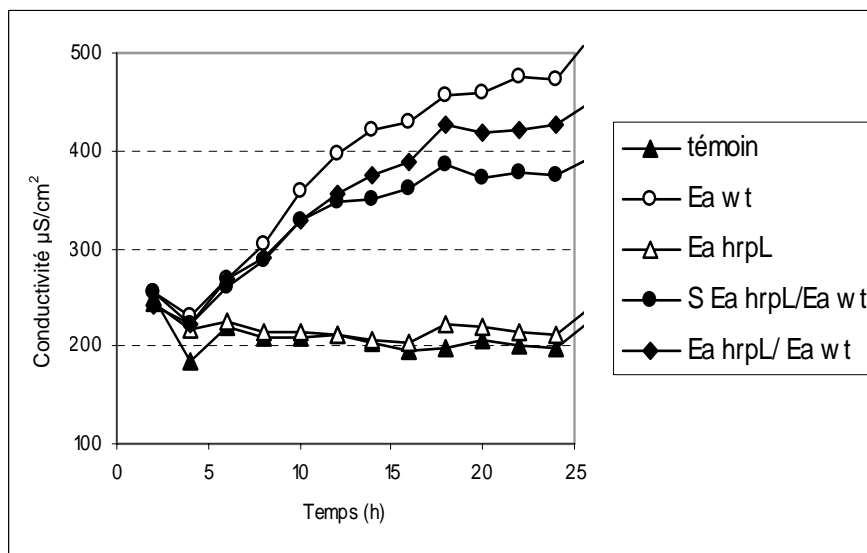


Figure 3.9 : Effet du surnageant (S) de culture du mutant *Ea hrpL* (cultivé sur milieu M9 gal), sur les fuites d'électrolytes provoquées par *Ea wt* sur disques de feuilles de semis.

Tableau III.2 : Comparaison de différentes méthodes pour l'extraction d'ARN totaux bactériens

Nom	Principe	Rendement en ARN totaux + ADN génomique ($\mu\text{g ARN}/\text{ufc maxi}$)		Qualité des ARNs ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$)	Efficacité du traitement DNase
		Fabricant	Obtenus		
RNA easy protect bacteria mini kit (Quiagen)	-Lyse enzymatique (1mg/ml de lysozyme) -Purification sur membrane de silice	40/10 ⁸	25/10 ⁸	1,6	partielle
nucleospin RNAII (Macherey-Nagel)	-Lyse enzymatique (0,2 mg/ml de lysozyme) -traitement DNase sur membrane de silice puis purification	70/10 ⁹	7,5/10 ⁹	1,4	partielle
RNable (Eurobio)	-Lyse enzymatique (1mg/ml de lysozyme) -phenol/GTC - extraction chloroforme		8,4/10 ⁹	1,5	partielle
SV Total RNA Isolation (Promega)	-Lyse enzymatique (0,4 mg/ml de lysozyme) -GTC -purification sur membrane de silice	36/10 ⁹	25/10 ⁹	1,2	partielle
RiboPure bacteria (Ambion)	-Lyse mécanique -phenol - filtration sur fibre de verre	90/10 ⁹	5/10 ⁹	2,2	non testée
Trizol Max Bacterial RNA isolation (Invitrogen)	-Lyse par phenol/GTC -extraction chloroforme	20/10 ⁹	3,5/10 ⁹	1,6	totale
Trizol chaud (Invitrogen)	Lyse par phenol/GTC chaud -extraction chloroforme		40/10⁹	1,9	totale

surnageant de culture du mutant *hrpL*, produit en milieu *hrp*-inducteur mimant les conditions de l'apoplasme.

Nos résultats (figure 3.9) montrent que la diminution des fuites d'électrolytes observées quand la souche sauvage est en mélange avec le mutant *Ea hrpL*, par rapport à la souche sauvage seule, est aussi obtenue lorsqu'elle est mélangée à du surnageant de culture (récupéré après centrifugation des cultures) du mutant *Ea hrpL*. Ces résultats suggèrent une localisation extracellulaire de facteur(s) potentiellement impliqué(s) dans la protection et synthétisé(s) chez l'un au moins des mutants de régulation.

Le surnageant d'une culture en milieu *hrp*-inducteur du mutant protecteur *Ea hrpL* comparé à celui de la souche sauvage, a été analysé en SDS-PAGE. Nous avons mis en évidence une protéine en quantité majoritaire qui s'est avérée être une flagelline. Un travail approfondi a alors été entrepris sur le système flagellaire d'*E. amylovora* à différents niveaux que nous avons rassemblé dans la partie 3.

2.4 RECHERCHE DE GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES ENTRE SOUCHE SAUVAGE ET MUTANTS DE REGULATION

Pour tenter de révéler des différences entre mutants de régulation et souche sauvage, autre que la synthèse de flagelline, nous avons entrepris une analyse transcriptionnelle. Deux démarches ont été choisies : l'une avec *a priori* en ciblant des gènes codant des protéines de surface ou sécrétées, des protéines liées au chimiotactisme et des protéines liées au quorum-sensing, l'autre sans *a priori*, par cDNA-AFLP.

2.4.1 MISE AU POINT DE L'EXTRACTION D'ARN TOTAUX BACTERIENS

L'extraction d'ARNs totaux bactériens a été une étape délicate. En effet sur milieu M9, la lyse cellulaire s'est révélée être un point critique de la méthode, ce qui a posé des problèmes de rendement. Plusieurs kits d'extraction d'ARNs totaux ont été successivement testés : le RNA easy protect bacteria mini kit (Quiagen), le kit nucleospin RNAII (Macherey-Nagel), le kit RNable (Eurobio), le kit SV Total RNA Isolation (Promega), le kit RiboPure bacteria (Ambion), le Trizol Max Bacterial RNA isolation (Invitrogen) et enfin le Trizol chaud (Piper *et al.*, 1999). Trois méthodes de lyse ont été testées : lyse enzymatique au lysozyme, lyse mécanique avec des billes de zirconium et lyse par chaotropie au phénol/thiocyanate de guanidium (GTC) présent dans le Trizol. Trois méthodes de purification ont été comparées : membrane de silice ou de fibres de verre, et extraction au chloroforme.

Les résultats obtenus pour chaque protocole sont résumés dans le tableau III.2. Ils montrent que globalement les rendements obtenus pour *E. amylovora* sont variables et plus faibles par rapport aux données du fabricant concernant *E. coli*, une autre Protéobactérie. Le type de lyse détermine la quantité d'acides nucléiques obtenus : la lyse enzymatique suivie d'une purification sur colonne à membrane de silice permet d'obtenir jusqu'à 25 mg.mL⁻¹ d'acides nucléiques contenant cependant beaucoup d'ADN génomique. Les deux traitements ultérieurs à la DNase n'ont pas été complètement efficaces, même avec une DNase modifiée (TurboDNase, Ambion). La lyse mécanique ne nous a pas permis d'obtenir un rendement suffisant à la fois pour l'AFLP et les RT-qPCR. La lyse par du phénol/GTC (Trizol Max) ne nous a pas donné de rendement suffisant mais la quantité d'ADN génomique étant beaucoup plus faible, le traitement à la DNase a pu être complètement efficace. Afin d'avoir le meilleur compromis entre le rendement, la pureté et la teneur en ADN, nous avons gardé la lyse au Trizol mais avec le protocole de Piper et ses collaborateurs (1999) qui l'utilisent à 65°C, sur *Agrobacterium*. Ce protocole nous a permis d'obtenir un très bon rendement en ARN totaux, de pureté satisfaisante et pour lesquels l'ADN génomique a pu être totalement digéré (figure

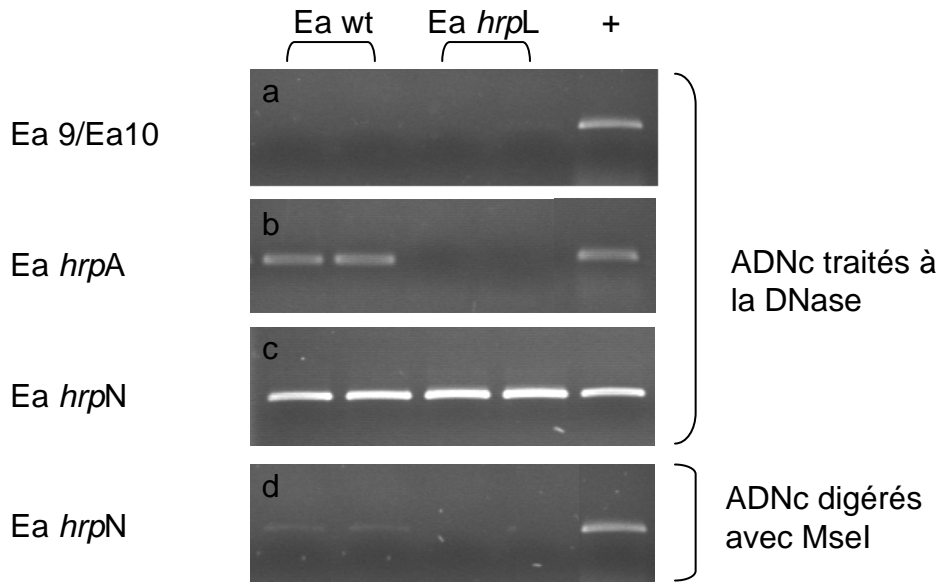


Figure 3.10 : Profils PCR obtenus avec des ADNc traités à la DNase puis digérés avec MseI. (+) : témoin positif. Amorces : Ea 9/Ea10; Ea hrpA; Ea hrpN.

Tableau III.3 : Liste des amorces utilisées pour l'analyse d'expression des gènes bactériens

gène	accession	amorce	séquence	taille du produit (pb)
<i>fhaB</i>		fhaB-di	GCGGCAACAGCGTGATGATG	117
		fhaB-re	CGGCGGCGGTGATATTGAGG	
<i>hecA</i>		hecA-di	GGCGTCGGCGTGGCTAAC	129
		hecA-re	CGTATCAGAGGCGATGTTTCATTCC	
<i>peh</i>		peh-di	ATCACTAACAGCACCCGACTTCAC	89
		peh-re	AGCCATTACCAGTATCAAAGACC	
<i>tolC</i>		tolC-di	TCCAATAATCGTTACGGCGGTAG	103
		tolC-re	ACAGCGGCAGGTTGAAGC	
<i>pilA</i>		pilA-di	CCTTGAGGGCAGAAACATAGCG	81
		pilA-re	GTGGTGGCAGCGGCAAC	
<i>cheA</i>		cheA1-di	TGCTTCCTGTGCGGCTTCC	102
		cheA1-re	GCGGTATTGTGCTTTGTTATTGACG	
<i>cheB</i>		cheB1-di	ATCAATTCCCCTGCCACCAG	70
		cheB1-re	TTGTCAACAGTCATTCCGATATGG	
<i>cheZ</i>		cheZ1-di	GCTGGGCATTGGTGAAGGAC	78
		cheZ1-re	ACGCTCGCTCTTTGGTTTCG	
<i>luxS</i>	DQ457094	luxS-di	GATCACACCATCATGGCTGCTC	110
		luxS-re	TCTTTGTTGGGACGACAGAAACG	
<i>expR</i>	AAW78919	expR-di	GGCGACGACTAAACTGGATTTTC	107
		expR-re	TTTGCGAGATAGAGAGGATCAATG	
<i>luxR</i>		luxR-di	GCATCATTATGTGACACTTTATCG	117
		luxR-re	TTAACGCCTGAAGGAGTAAGC	
<i>proC</i>		proC-di	CGAGCACACCATATCCTTGAGTTC	105
		proC-re	CGTGAGCAGGCGTATCAGTTTG	
<i>rpoD</i>		rpoD-di	CGGTTTGATGAAAGCGGTAGATAAG	102
		rpoD-re	GCAATGGAGCGGGTGATAGC	
16s	EU490590	16s-di	GAATTCAGGTGTAGCGG	316
		16s-re	GCCAGGTAAGGTTCTTCG	
orf2		Ea 9	CCGCATAAGGACGCTATTGT	863
hrpW		Ea 10	ACAACGTGAAGGCCAAAGAC	

3.10, a). Ce protocole présente l'autre avantage d'utiliser de faibles volumes de suspensions concentrées. Il vient de faire l'objet d'une publication (Darsonval *et al.*, 2008).

Nous avons pu constater lors de contrôles de digestion que les ARN extraits de *Ea hrpL*, cultivé sur M9 gal, contiennent des ARNm de *hrpN* mais pas de *hrpA* (figure 3.10, b et c).

2.4.2 RECHERCHE AVEC A PRIORI : GENES LIES A DES FONCTIONS EXTRACELLULAIRES, AU CHIMIOTACTISME OU AU QUORUM SENSING

Pour chaque gène, nous avons mesuré l'expression en milieu *hrp*-inducteur (M9 gal) par rapport au milieu M9 glu non *hrp*-inducteur. Puis nous avons quantifié l'expression sur M9 gal pour la souche sauvage et ses mutants *Ea hrcV*, *Ea hrpS* et *Ea hrpL*. Les prélèvements ont été effectués après 16 heures de culture en milieu M9 gal et M9 glu. La disponibilité de la séquence du chromosome d'*E. amylovora Ea273*, bien que non encore annotée, nous a permis de repérer les ORFs par homologie avec des séquences connues chez d'autres entérobactéries et de dessiner des amorces destinées à la qRT-PCR (tableau III.3). La normalisation s'est faite grâce à trois gènes : 16S (EU490590) (Naum *et al.*, 2008), *rpoD* et *proC* (Savli *et al.*, 2003) pour lesquels nous avons également recherché les ORFs avant de dessiner les amorces (tableau III.3). Deux répétitions biologiques indépendantes ont été effectuées.

2.4.2.1 EXPRESSION DE GENES LIES A DES FONCTIONS EXTRACELLULAIRES

Nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes connus pour coder des protéines impliquées dans l'attachement de la bactérie à l'hôte. Cet attachement se réalise grâce à des facteurs de virulence appelés adhésines. Pour réaliser cet attachement, les adhésines sont exposées en surface de cellule bactérienne, ou parfois sécrétées dans le milieu extracellulaire. On distingue les adhésines fimbriales (pili type I, IV...) ou non fimbriales (hemagglutinines, certaines OMP...) (Gerlach et Hensel, 2007). Si les mutants de régulation expriment de tels gènes différemment par rapport à la souche sauvage, la protection pourrait résulter d'une compétition entre les mutants de régulation et la souche sauvage pour les sites d'infection, dont les conséquences seraient de limiter le développement de la maladie. Nous nous sommes basés sur la publication de Zhao *et al.* (2005) pour sélectionner quelques gènes codant des protéines de surface impliquées dans l'adhésion (tableau III.3) : nous avons choisi de suivre l'expression de deux gènes d'hémagglutinines (*fhaB* et *hecA*) (Zhao *et al.*, 2005) et d'un gène de pseudopiline de type IV (*pilA*). Nous nous sommes également intéressés à l'expression de gènes en lien avec d'autres systèmes de sécrétion : *tolC* qui code une OMP formant un pore dans les systèmes de sécrétion de type I (Gerlach et Hensel, 2007) et *peh*, qui code une polygalacturonase sécrétée par un système de sécrétion de type II *sec*-dépendant (Zhao *et al.*, 2005).

Nos résultats montrent (figure 3.11) que l'expression des gènes *fhaB*, *hecA*, *pilA*, *tolC* et *peh* chez la souche sauvage cultivée sur M9 glu rapportée au M9 gal varie peu, tous les log₂ de ratio d'expression variant de -0,5 pour *hecA* à +1 pour *pilA*.

Les log₂ des rapports d'expression de ces gènes chez les mutants cultivés sur M9 gal et comparés avec la souche sauvage varient peu également : de -1,5 pour *tolC* chez *Ea hrpL* à +0,5 pour *hecA* chez *Ea hrcV* et *Ea hrpS* (figure 3.11). Seul *tolC* est plus fortement réprimé dans une des deux répétitions chez *Ea hrpL* (log₂ du ratio d'expression égal à -2,8). Ainsi, en dehors de *tolC* dont l'expression mériterait d'être vérifiée dans d'autres répétitions biologiques, il y a peu de différence d'expression de ces gènes entre les mutants protecteurs et la souche sauvage et/ou le mutant non protecteur.

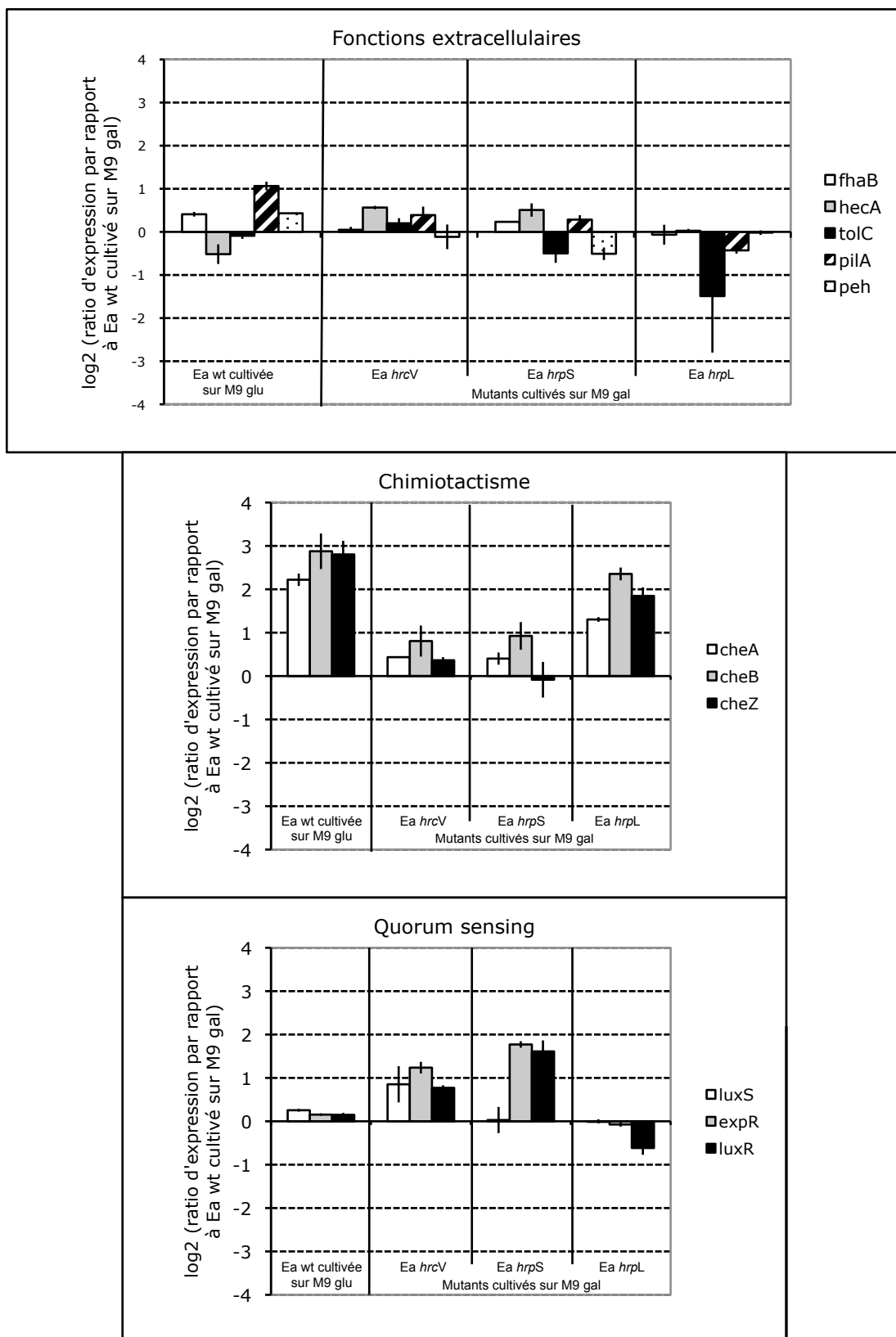


Figure 3.11 : Expression relative de gènes liés à des fonctions extracellulaires, au chimiotactisme et au quorum sensing chez Ea wt cultivée sur M9 glu et les mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS* et Ea *hrpL* cultivés sur M9 gal, par rapport à Ea wt cultivée sur M9 glu. Les barres d'histogrammes représentent des moyennes de deux répétitions biologiques et les extrémités des traits verticaux, les valeurs des deux répétitions.

2.4.2.2 EXPRESSION DE 3 GENES IMPLIQUES DANS LE CHIMIOTACTISME

Le chimiotactisme permet à la cellule bactérienne de contrôler l'activité flagellaire afin de se déplacer vers une zone plus favorable de son environnement. Nous avons choisi trois gènes du chimiotactisme en repérant de la même façon que ci-dessus les ORFs afin de dessiner des amorces (tableau III.3) : *cheA* (kinase), *cheB* (méthylestérase) et *cheZ* (déphosphatase de CheY).

Nous avons observé (figure 3.11) que ces gènes sont plus fortement exprimés chez *Ea* wt cultivée sur M9 glu que lorsqu'elle est cultivée sur M9 gal avec un \log_2 du ratio d'expression supérieur à 2.

Les \log_2 des rapports d'expression de ces gènes chez les mutants comparés avec la souche sauvage cultivée en milieu M9 gal, montrent une nette surexpression chez *Ea hrpL* par rapport aux autres bactéries avec un \log_2 du ratio d'expression supérieur ou égal à 2 pour *cheB* et *cheZ* (figure 3.11). HrpL semble donc contrôler négativement des gènes du chimiotactisme.

2.4.2.3 EXPRESSION DE 3 GENES IMPLIQUES DANS LE QUORUM SENSING

Le quorum sensing est un système bactérien de régulation de l'expression des gènes en réponse à des changements de densité cellulaire. Le quorum sensing bactérien produit et répond à des molécules appelées autoinducteurs qui s'accumulent dans l'environnement externe au fur et à mesure de l'augmentation de la population bactérienne. Deux systèmes quorum sensing existent chez *E. amylovora*. L'un dépend des gènes *exp* (homologues aux gènes *lux*) impliqués dans la production d'un signal inducteur de type N-homosérine lactone (AI-1) (Venturi *et al.*, 2004 ; Molina *et al.*, 2005) ; sa fonction de régulation globale reste à confirmer. Le second système dépend de gènes *lux* impliqués dans la production du second autoinducteur (AI-2) (Rezzonico et Duffy, 2007) et aurait une fonction de régulation globale (Gao *et al.*, 2008). Les trois gènes étudiés [*expR* (AAW78919), *luxR*, *luxS* (DQ457094)] codent respectivement pour deux régulateurs et une synthase (tableau III.3).

Nos résultats (figure 3.11) montrent que ces gènes ne sont pas différentiellement exprimés selon que *Ea* wt est cultivée en milieu M9 gal ou M9 glu. Chez les mutants cultivés sur M9 gal et comparés à la souche sauvage, l'expression de ces gènes varie peu chez *Ea hrpL* alors qu'elle est induite (pour les gènes *expR* et *luxR*) chez *Ea hrcV* et surtout *Ea hrpS* avec des \log_2 du ratio d'expression proches de 2.

En conclusion, cette étude avec *a priori* montre que, parmi les gènes étudiés, il n'y en a pas qui sont à la fois exprimés chez les deux mutants de régulation « protecteurs » et différentiels par rapport à la souche sauvage et à son mutant de sécrétion. Au contraire, il semble que les deux régulateurs soient impliqués dans des fonctions *hrp*-indépendantes différentes. Des gènes du chimiotactisme (et de la mobilité, comme nous le verrons au § 3) sont nettement réprimés par HrpL qui par ailleurs semble réguler positivement un gène lié au TISS, alors que HrpS semble jouer un rôle de régulateur négatif dans le quorum-sensing.

Cette étude reste toutefois assez limitée puisqu'elle ne concerne que peu de gènes et ne cible que des gènes pour lesquels un rôle a été signalé chez d'autres pathogènes. La mise en oeuvre du cDNA-AFLP développée ci-dessous, nous a permis une étude plus globale des gènes exprimés différentiellement entre le mutant protecteur et la souche sauvage, en milieu *hrp*-inducteur. Pour des raisons pratiques, nous nous sommes limités au mutant *Ea hrpL*.

Tableau III.4 : Résultats de l'analyse par cDNA-AFLP

Clone	Profil	Fonction	Gène	Organisme	Blast N ou X E value	N° accession
AA, AB, BA, BB	HrpL-I a	TTSS et effecteurs	<i>dspA</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	2,00E-122	AAC04850
GA, P, S, V	HrpL-I	TTSS et effecteurs	<i>hrpW</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	2,00E-64	CAA74158
DA	HrpL-I	TTSS et effecteurs	<i>invGlysaC</i>	<i>Sodalis glossinidius</i>	1,00E-140	AAS66838
BC	HrpL-I	métabolisme	ARN 23s	<i>Yersinia</i>	1,00E-105	CP000950
GB	HrpL-I	métabolisme	ribosomal protein S1 30s	<i>Enterobacter</i> sp.	7,00E-103	YP_001176161
J	HrpL-I	métabolisme	Putative neutral zinc metallopeptidase	<i>Escherichia coli</i>	2,00E-114	NP_289028
JA	HrpL-I	métabolisme	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,00E-106	YP_001337002
K	HrpL-I	métabolisme	phosphoribosylamine--glycine ligase	<i>Clostridium botulinum</i>	5,00E-22	ZP_02616222
U.2	HrpL-I	métabolisme	phosphoserine aminotransferase	<i>Serratia</i>	5,00E-54	YP_001477938
JB, R	HrpL-I	rotamase	peptidylprolyl isomerase	<i>Escherichia coli</i>	1,00E-98	YP_001457286
GD	HrpL-I	traduction	hypothetical protein SARI_03020 (peptide chain release factor 3)	<i>Salmonella enterica</i>	7,00E-94	YP_001572006
T.B	HrpL-I	Surface bacterienne	outer membrane protein W; colicin S4 receptor; putative transport protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,00E-77	YP_001334911
Q	HrpL-I	Surface bacterienne	Putative permease (predicted permease YjgP/YjgQ family)	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	2,00E-172	YP_001906325
EA.A, EB	HrpL-R b	Transport de nucléotides et métabolisme	putative allantoin permease	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,00E-46	YP_001334949
EA.B	HrpL-R	transport	putative sodium:dicarboxylate symporter	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1,00E-54	YP_001438226
EA.C	HrpL-R	Transport de sucres et métabolisme	trehalase	<i>Shigella flexneri</i>	1,00E-59	YP_690906
I	HrpL-R	Transport d'ions inorganiques et métabolisme	putative dimethylaniline monooxygenase	<i>Escherichia coli</i>	2,00E-75	YP_001481237
N	HrpL-R	Transport d'ions inorganiques	ABC-type uncharacterized transport system, duplicated ATPase component	<i>Yersinia bercovieri</i>	3,00E-63	ZP_00822547
H	HrpL-R	métabolisme	Putative modification methylase	<i>Salmonella enterica</i>	9,00E-29	YP_001569582
D	HrpL-R	métabolisme	cytoplasmic trehalase TreF	<i>Escherichia albertii</i>	1,00E-31	ZP_02901066
KD	HrpL-R	métabolisme	YcfB protein (domaine nudix hydrolase), conserved hypothetical protein	<i>Erwinia amylovora</i>	4,00E-34	CAC054871
PA	HrpL-R	transcription	transcriptional regulator, AraC family	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	3,00E-145	YP_001907702
L	HrpL-R	transcription	RNA polymerase sigma factor RpoE	<i>Escherichia coli</i>	1,00E-103	NP_754978
E	HrpL-R	GSP	preprotein translocase subunit SecA)	<i>Enterobacter sakazakii</i>	5,00E-90	YP_001439298
B, C, CB1, CB3, DB, DC, F, G, NA, NB	HrpL-R	GSP	secY	<i>Serratia proteamaculans</i>	9,00E-39	YP_455938

a : hrpL-I, induit par HrpL (bande présente chez Ea wt mais pas chez Ea *hrpL*)

b : hrpL-R, réprimé par HrpL (bande présente chez Ea *hrpL* mais pas chez Ea wt)

2.4.3 RECHERCHE SANS A *PRIORI* PAR cDNA-AFLP

Cette technique comprend une étape de restriction des ADNc, suivie d'une ligation d'adaptateurs au niveau des extrémités cohésives générées. Grâce à des amorces spécifiques des adaptateurs, on peut amplifier les ADNc possédant les sites de restriction. L'amplification est rendue sélective par l'ajout d'un ou deux nucléotides sur les amorces. Les produits d'amplification sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide et révélés par coloration au nitrate d'argent. L'étude a été réalisée à partir d'ARNs totaux des souches *Ea* wt et *Ea hrpL*, cultivées pendant 16 heures sur milieu *hrp*-inducteur (M9 gal).

2.4.3.1 OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE cDNA-AFLP

Les ADNc ont été synthétisés puis digérés par EcoRI et MseI. Cependant, nous avons constaté lors des contrôles de la digestion que celle-ci n'était pas complète malgré des efforts d'optimisation, notamment avec les transcrits abondants comme ceux du gène *hrpN* par exemple (qui possède un site MseI) (figure 3.10, d). Nous avons donc pris le parti de travailler simultanément sur 2 répétitions biologiques. Nous avons choisi de ne prélever sur gel que les bandes différentielles entre les 2 souches (présence/absence), qui donnent un profil similaire pour les 2 répétitions. Sur 256 combinaisons possibles EcoRI + NN/ MseI + NN, 56 ont été utilisées pour repérer les différences d'expression entre *Ea* wt et *Ea hrpL*.

2.4.3.2 ANALYSE DES SEQUENCES

Au total, 64 fragments différentiellement exprimés ont été repérés (tableau III.4). Les 25 fragments présents dans les cDNAs de *Ea* wt et absents chez *Ea hrpL*, ont été désignés HrpL-induits (HrpL-I). Les 39 fragments présents dans les cDNAs de *Ea hrpL* et absents chez *Ea* wt ont été désignés HrpL-réprimés (HrpL-R). 53 fragments ont pu être séquencés dont 11 n'ont donné aucune homologie connue. Pour les 42 fragments restants (20 HrpL-I et 22 HrpL-R), l'analyse des séquences a montré que plusieurs d'entre eux correspondent au même gène. Par exemple AA, AB, BA et BB correspondent tous à *dspA*.

Les séquences des fragments obtenus ont été comparées avec la séquence disponible du chromosome de *Ea* 273. Les gènes correspondants à ces fragments sont répartis sur tout le chromosome. La majorité des produits des gènes identifiés ont de fortes similarités en acides aminés avec des protéines d'entérobactéries comme *Erwinia* sp., *Yersinia* sp., ou *Escherichia coli* :

- Fragments HrpL-I : comme on devait s'y attendre, les gènes d'effecteurs connus comme *DspA* et *HrpW*, ont été repérés. En revanche, notre analyse révèle pour la première fois chez la souche sauvage, d'autres facteurs potentiels de virulence : un gène appartenant à un deuxième système de sécrétion de type III présentant des homologies avec celui de l'endosymbionte d'insecte *Sodalis glossinidius* (*invG/ysaC*) et un gène de S-adénosylméthionine synthétase (métabolisme de la méthionine) pouvant être impliquée dans la synthèse de précurseur de l'éthylène ; des gènes putatifs de protéine de membrane externe (*ompW*), de perméase (famille YjgP/ YjgQ) et de Zinc métallopeptidase ont été également identifiés ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme.

- Fragments HrpL-R : ce sont pour la plupart des gènes intervenant dans le transport d'ions, de nucléotides et de sucres probablement impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme. De plus, des gènes appartenant au système GSP (general secretory pathway) ont été mis en évidence, ce système est impliqué dans la virulence des *Pectobacterium* pectinolytiques. Dans notre étude, ce sont les gènes codant l'ATPase *SecA* et la translocase *SecY*, impliqués dans la translocation des protéines vers le périplasma, qui ont été repérés. Enfin, deux gènes

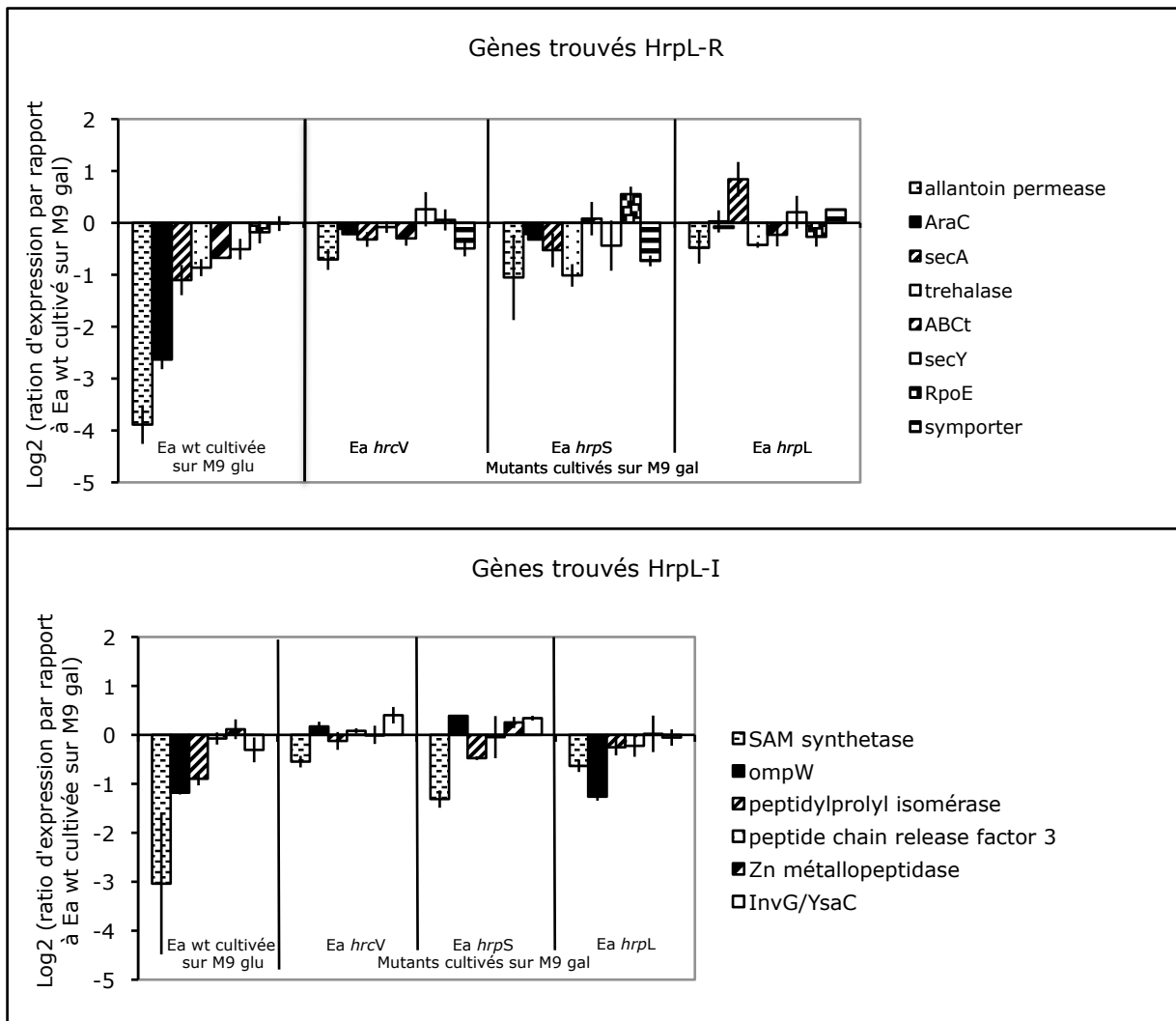


Figure 3.12 : Expression relative des gènes mis en évidence par cDNA-AFLP chez Ea wt cultivée sur M9 glu et les mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS* et Ea *hrpL* cultivés sur M9 gal, par rapport à Ea wt cultivée sur M9 gal. Les barres d'histogrammes représentent les moyennes de deux répétitions biologiques et les extrémités des traits verticaux, les valeurs des deux répétitions

impliqués dans la régulation ont été mis en évidence : un régulateur de transcription de type AraC et un facteur sigma RpoE.

2.4.3.3 MESURE DE L'EXPRESSION QUANTITATIVE DE QUELQUES GENES MIS EN EVIDENCE PAR LE cDNA-AFLP

2.4.3.3.1 COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE QUELQUES GENES ENTRE LA SOUCHE SAUVAGE ET SES DIFFERENTS MUTANTS EN MILIEU *HRP*-INDUCTEUR

Pour tenter de valider les gènes mis en évidence par le cDNA-AFLP, les expressions de la plupart d'entre eux ont été analysées par RT-qPCR dans les différents mutants de sécrétion et de régulation après dessin des amorces (tableau III.5), et comparés à la souche sauvage après 16 heures de culture sur milieu M9 gal. Deux répétitions biologiques ont été utilisées : l'une ayant déjà servi pour le cDNA AFLP et l'autre issue d'une expérience indépendante.

Les gènes *dspA* et *hrpW* (trouvés HrpL-I) ont bien montré une expression nulle chez les mutants de régulation, comparés à la souche sauvage (\log_2 de ratio d'expression inférieur ou égal à -8, non représentés sur la figure 3.12). Par contre, en ce qui concerne les autres gènes (figure 3.12), les \log_2 des ratios d'expression sont extrêmement faibles. En effet ils sont compris pour la plupart entre -0,5 et +0,5. Ces faibles valeurs ne nous permettent donc pas de les valider et laissent penser que nous avons surtout mis en évidence des faux-positifs. Trois gènes ont un profil d'expression qui est validé par rapport au profil trouvé en AFLP avec \log_2 de ratio d'expression égal ou supérieur à 1 en valeur absolue : le gène de la S-adénosylmethionine synthétase (Hrp-I) réprimé chez *Ea hrpS* et chez *Ea hrpL* et *Ea hrcV* mais moins fortement, *ompW* (Hrp-I), réprimé chez *Ea hrpL*, et *secA* (Hrp-R) induit chez *Ea hrpL*.

2.4.3.3.2 COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE QUELQUES GENES CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE CULTIVEE EN MILIEU *HRP*- OU NON *HRP*- INDUCTEUR

Nous avons mesuré l'expression par RT-qPCR de quelques gènes mis en évidence par le cDNA-AFLP chez la souche sauvage cultivée pendant 16 heures en M9 glu (milieu non *hrp*-inducteur) et M9 gal (milieu *hrp*-inducteur), dans deux répétitions biologiques afin de savoir si certains gènes non-*hrp* sont induits dans des conditions mimant l'apoplasme, ou au contraire réprimés.

Les résultats des qPCR sont donnés dans la figure 3.12. Ils montrent que certains gènes sont plus exprimés sur milieu *hrp*-inducteur que sur milieu non *hrp*-inducteur : c'est le cas des gènes de l'allantoïne perméase (HrpL-R), du régulateur de transcription de type AraC (HrpL - R), de l'outer membrane protein W (HrpL-I), de la S-adenosylmethionine synthetase (HrpL - I) et de la préprotéine translocase SecA (HrpL-R) qui ont un \log_2 inférieur à -1. D'autres gènes sont également plus induits sur M9 gal que sur M9 glu mais avec des \log_2 de ratio d'expression plus faibles compris entre -1 et 0 : c'est le cas des gènes de la peptidylprolyl isomérase et de la tréhalase, de l'ATPase d'un système de sécrétion de type ABC transporteur, de SecY et RpoE. Les autres gènes ont un \log_2 de ratio d'expression peu différent de zéro c'est à dire une expression comparable sur les 2 milieux. Nous n'avons pas observé de gènes moins exprimés sur M9 gal que sur M9 glu.

Ces analyses mettent en évidence des gènes dont l'expression est réprimée chez *Ea hrpS* ou *Ea hrpL* (S-adénosylméthionine synthétase et *ompW* respectivement) et un gène dont l'expression est induite chez *Ea hrpL* (*secA*). En outre, certains gènes mis en évidence par le cDNA-AFLP sont nettement plus exprimés en milieu M9 gal *hrp*-inducteur qu'en milieu M9

Tableau III.5 : Amorces utilisées pour la validation des résultats obtenus avec le cDNA-AFLP

gène	amorce	séquence	taille du produit (pb)	Tm
allantoin permease	Ea all perm-di	CGGCAAACCATCCCACCAG	250	60°C
	Ea all perm-re	TTTCTCAAGTCTTTCACCCATTTCC		
transcriptional regulator, AraC family	Ea araC-di	GAAGCCTTTGACTGTGAACCC	73	60°C
	Ea araC-re	GCGAGCGACCGTAGTAGTGC		
S-adenosylmethionine synthetase	Ea SAM-di	ACCAAATACCACATCAATCCAACCG	110	60°C
	Ea SAM-re	CGAGCCATACCGCCGTAGG		
outer membrane protein W	Ea ompW-di	CAATGCTCTGTCCGGTTTCTCC	78	60°C
	Ea ompW-re	TGCTGAACGCCTCTGTGTGG		
preprotein translocase subunit SecA	Ea secA-di	AGGGTCGTCGCTGGTCTG	112	60°C
	Ea secA-re	CGGAAGTAATTCTGGAAGGTGATAG		
peptidylprolyl isomerase	Ea pep iso-di	CAGGAAGAGATCGCCAACACTACTAC	130	60°C
	Ea pep iso-re	TCTGGATGTCACTTTCACTTACCG		
trehalase	Ea treha-di	CCGATTACCTGGACAATCTTTC	164	60°C
	Ea treha-re	GCGATGAAGTTGGCAGTAAGG		
ABC-type uncharacterized transport system	Ea ABCt-di	TGATTGCCGATGAGCCAACC	120	60°C
	Ea ABCt-re	TCAGATTATGGGTAATGAACAGCAG		
secY	Ea secY-di	CCTCCCCTTCTTTCTTAATTTTCAGC	136	60°C
	Ea secY-re	ATGTTCTCTGGTGGTGTCTTAG		
RNA polymerase sigma factor RpoE	Ea rpoE-di	TCCATTACGCCATAATTTAGTG	88	60°C
	Ea rpoE-re	CGTCAGCACAAATCAGC		
sodium:dicarboxylate symporter	Ea symp-di	GCTACGGCACTGAGAATTGAGAC	86	60°C
	Ea symp-re	TTTAATCTGGTGGGTAACGGCTATG		
peptide chain release factor 3	Ea pcrf3-di	CGTGGTGATTGCCGATGCG	107	60°C
	Ea pcrf3-re	TCTGGATAGTCCCGTGGTTATGC		
zinc metallopeptidase	Ea Zn mpept-di	AAGTTCCATCTTCACCGACAGC	136	60°C
	Ea Zn mpept-re	CGCTCAGGGCTATGTTATCGC		
dsp A	Ea dspA-di	CTGAGCGATTTCCACTCTGTCTG	237	60°C
	Ea dspA-re	GGCAGCGGCGAAGATAAGG		
hrpW	Ea hrpW-di	ACCGATCATCCTGACCCTGTTG	227	60°C
	Ea hrpW-re	AGGCTGGCACCGTCTTCC		
inv G / ysa C	Ea ysaC-di	AAGTGATGCCGCCATTGCC	150	60°C
	Ea ysaC-re	GCTTTGTTGAAGATTTGGTGAGTGC		

Tm : température d'hybridation

glu non *hrp*-inducteur : c'est le cas des gènes codant l'allantoïne perméase, le régulateur de type AraC, l'OmpW, la S-adénosylméthionine synthetase et SecA.

2.5 DISCUSSION

Recherche d'un effet antagoniste entre les partenaires bactériens :

Dans le but d'observer un éventuel effet inhibiteur du mutant *Ea hrpL* sur la souche sauvage, nous avons suivi la dynamique des populations de la souche sauvage et de ses différents mutants en co-culture en milieu *hrp*-inducteur. Les dénombrements bactériens montrent que tous les mutants sauf *Ea hrpL*, lorsqu'ils sont minoritaires dans les co-cultures, atteignent une densité de population inférieure d'un log₁₀ en fin de phase stationnaire par rapport aux cultures seules. Néanmoins, dans nos essais, cet effet n'est pas différentiel que le mutant majoritaire dans la co-culture soit protecteur ou non. Par conséquent, la possibilité qu'un mutant protecteur ait un effet direct sur la croissance de la souche sauvage *in planta* est peu probable.

Nous avons vérifié également qu'il n'y a pas d'effet répresseur de l'expression de gènes *hrp* de la souche sauvage lorsque celle-ci est en mélange avec un mutant de régulation. Il semble donc que la différence de niveau de protection entre les mutants *hrp* de régulation et le mutant *hrp* de sécrétion ne soit pas due à ce type d'antagonisme de la population protectrice sur la souche sauvage puisque les mêmes phénomènes sont observés avec la population non protectrice.

Par ailleurs, nous avons pu observer, sur milieux *hrp*-inducteurs, un phénomène de formation d'agrégats, non encore décrit chez *E. amylovora*, suivi d'une floculation dans les suspensions contenant la souche sauvage. Le phénomène disparaît chez les mutants *hrp*. Cependant, cette absence de formation d'agrégats semble ne correspondre à aucun phénotype de mutation en particulier comme le montrent nos expériences et d'autres observations réalisées avec différents mutants *hrp* mutés dans des effecteurs ou délétés des gènes *hrp-dsp* (résultats non montrés). Ceux-ci sont pour la plupart incapables de former des agrégats mais il existe quelques exceptions, notamment celle d'un triple mutant *Ea hrpN-hrpW-dspA* qui agrège. Dans leur ensemble, ces résultats montrent que ni HrpL, ni HrpS ne sont impliqués dans la régulation des mécanismes d'agrégation.

Il est intéressant de constater que le mutant *Ea hrpL* atteint la même densité de population en fin de croissance qu'il soit seul ou en mélange, alors que les autres mutants entrent en phase stationnaire plus tôt lorsqu'ils sont cultivés en mélange (et minoritaires) que lorsqu'ils sont cultivés seuls. Un organisme minoritaire en co-culture peut entrer prématurément en phase stationnaire dès que l'organisme majoritaire (décrit pour les bactéries à Gram-) entre lui-même en phase stationnaire : c'est l'effet Jameson (Jameson, 1962). Plusieurs études ont montré que l'effet Jameson n'est pas dû à une carence en nutriments, à un changement de pH ou à la présence de produits du métabolisme toxiques (Schiemann et Olson, 1984 ; Abbiss, 1986 ; Davies *et al.*, 1991). Cet effet a plutôt été attribué à une limite du nombre de cellules métaboliquement actives que peut supporter un milieu de culture (Schiemann et Olson, 1984). Komitopoulou et ses collaborateurs (2004a, 2004b) ont montré que l'inhibition en co-cultures est régulée par le potentiel rédox via l'induction de RpoS. Ce dernier réprime alors l'expression de nombreux gènes, dont des gènes impliqués dans la synthèse de protéines de surface, dans les bactéries en phase stationnaire (Patten *et al.*, 2004). Le mutant *Ea hrpL* ne serait donc pas sensible aux variations de conditions du milieu extracellulaire, ce qui est cohérent avec ce que l'on sait d'autres facteurs sigma de type ECF (extracytoplasmic function) (Kazmierczak *et al.*, 2005). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'expression du gène codant RpoS dans les cultures. En effet, l'éventuelle absence d'induction de ce gène dans le mutant *Ea hrpL* pourrait révéler une

nouvelle fonction de régulation (positive) du facteur HrpL. Par ailleurs, cette hypothèse serait cohérente avec la répression de gènes codant des protéines de surface observée chez le mutant *Ea hrpL* (*ompW*, *tolC*).

L'observation nouvelle de la formation d'agrégats chez *Ea* wt et d'une floculation en milieu *hrp*-inducteur, incite à rechercher les mécanismes à l'origine de ce phénomène. Il existe plusieurs formes de comportement agrégatif multicellulaire qui sont génétiquement distincts. Il a été démontré par exemple chez *E. coli* que l'autoagrégation et la floculation sont induites par TibA, une adhésine appartenant à la famille des protéines autotransporteurs (Sherlock *et al.*, 2005). Chez *Dickeya* spp (anciennement *E. chrysanthemi*), un système de type III fonctionnel est nécessaire à l'adhésion des cellules bactériennes entre elles aboutissant à la formation de pellicule en surface du milieu, mais il n'intervient pas dans la formation de biofilm (Yap *et al.*, 2005). Le fait qu'un signal homosérine lactone induise également la formation d'agrégats cellulaires chez *Dickeya zeae* (Hussain *et al.*, 2008) indique que plusieurs mécanismes sont impliqués dans la formation d'agrégats cellulaires. La formation d'agrégats peut prélude à la formation de biofilm chez certaines bactéries mais ce n'est sans doute pas le cas chez *E. amylovora* qui ne s'assemble pas en biofilm. L'autoagrégation peut aussi être considérée comme un mécanisme de défense supplémentaire par rapport aux bactéries planctoniques (Ochiai *et al.*, 1993 ; Schembri *et al.*, 2003). Il conviendrait de rechercher la (les) protéine(s) impliquée(s) dans ce phénomène d'autoagrégation observé chez *E. amylovora* et d'en étudier ensuite le rôle dans l'agressivité.

Recherche de différences au niveau transcriptomique entre les mutants de régulation et la souche sauvage :

Il apparaît que la mise en place de la protection nécessite des bactéries actives métaboliquement et implique une synthèse protéique. Ce résultat conforte l'hypothèse faite dans la partie précédente (§ 1.4) suggérant la nécessité d'un métabolisme actif chez les mutants protecteurs. Si l'on admet que c'est la synthèse protéique qui confère la protection aux mutants *hrp* de régulation, il y aurait donc une synthèse particulière de protéine(s) chez *Ea hrpS* et *Ea hrpL*, absente ou faible chez la souche sauvage et le mutant de sécrétion *Ea hrcV*. Nous avons donc cherché à préciser la localisation de protéine(s) particulière(s) chez ces mutants. Le biotest des fuites d'électrolytes a montré qu'un surnageant de culture du mutant *Ea hrpL* peut empêcher, comme le mutant lui-même, les fuites d'électrolytes correspondant à la situation de maladie. Cette observation suggère que l'origine de la protection est extracellulaire : nous nous sommes donc intéressés, en dehors de la flagelline (cf partie 3 ci-dessous), à des protéines liées à différentes fonctions extracellulaires. Pour cela, nous avons envisagé une approche transcriptomique.

Nous avons analysé l'expression de gènes codant des adhésines putatives comme *fhaB*, *hecA* [différentes de celles impliquées dans la formation d'agrégats comme TibA chez *E. coli*, (Sherlock *et al.*, 2005)] et *pilA*. Les résultats montrent que ni HrpS, ni HrpL ne sont impliqués dans la régulation des gènes codant les adhésines que nous avons étudiés. Il conviendrait de confirmer ces profils d'expression avec d'autres répétitions biologiques et d'étendre ces investigations à des gènes différents potentiellement impliqués dans l'adhésion. Pour cela, l'annotation du chromosome d'*E. amylovora* devrait faciliter la mise en évidence d'autres gènes d'adhésine.

De plus, nous avons analysé d'une part l'expression de gènes codant des protéines liées à différents systèmes de sécrétion comme *tolC* (système de sécrétion de type I ou ABC transporteur) et *peh* (sécrétée par un système de sécrétion de type II *sec*-dépendant), et d'autre part l'expression de gènes du GSP (*secA* et *secY*) et de gène d'une OMP (*ompW*) identifiés par cDNA-AFLP. Le système de type I permet la sécrétion de divers substrats (protéiques ou non) du cytoplasme vers l'espace extracellulaire en une seule étape (Gerlach et Hensel, 2007).

Un système de type II fonctionnel a déjà été décrit chez *E. amylovora* ainsi qu'une induction d'un gène de polygalacturonase (une enzyme sécrétée par le T2SS chez *Pectobacterium*), chez une souche sauvage, *in vivo*, après culture sur poire immature (Zhao *et al.*, 2005). Nous n'avons pu mettre en évidence de synthèse de polygalacturonase *in vitro* sur milieu *hrp*-inducteur (Brisset, communication personnelle). Il est possible qu'il existe des différences de cinétique d'expression des gènes entre les conditions de culture sur poires immatures et celles sur milieu *hrp*-inducteur. Les OmpW sont de petites protéines de la membrane externe très répandues chez les Protéobactéries. Chez *Vibrio cholerae*, OmpW est une protéine immunogène, utilisée pour le développement de vaccins (Das *et al.*, 1998). Chez *E. coli*, OmpW est un récepteur de la colicine, une toxine bactérienne (Pilsel *et al.*, 1999). Leur fonction n'est pas connue. Toutefois, ces protéines pourraient être impliquées dans le transport de molécules hydrophobes (Hong *et al.*, 2006). Les résultats, s'ils sont confirmés dans d'autres répétitions biologiques, montrent que HrpL régulerait positivement *tolC*, négativement *secA* et *secY* et que HrpS régulerait négativement *ompW*. Ils suggèrent que des régulateurs du système Hrp sont aussi impliqués dans la régulation d'autres systèmes de sécrétion. Peu de données existent sur ce sujet : chez *E. coli*, Zhang et ses collaborateurs (2005) mettent en évidence un « dialogue » moléculaire entre deux systèmes de sécrétion de type III. Ces auteurs suggèrent que ce dialogue est nécessaire à la cellule bactérienne afin d'empêcher l'expression de deux complexes protéiques en surface de cellule, en même temps pour éviter des problèmes structuraux par exemple ou des dépenses énergétiques excessives.

Nous avons également analysé l'expression de gènes liés au chimiotactisme. L'expression de ces gènes est plus élevée chez le mutant *Ea hrpL* comparé à la souche sauvage. Ce résultat met en évidence une nouvelle fonction de régulation (négative) du facteur HrpL. Il suggère que le mutant *Ea hrpL*, parce qu'il a un chimiotactisme surexprimé, pourrait entrer en compétition pour les sites d'infection avec la souche sauvage, ce qui conduirait à la protection. Si HrpL réprime la mobilité (cf partie 3) et le chimiotactisme, HrpS ne les influence pas. L'expression de ces gènes est plus élevée chez *Ea wt* cultivée sur M9 glu que sur milieu inducteur M9 gal des gènes *hrp*. Cela est corrélé à la mobilité sur ce milieu (cf partie 3). Ce résultat montre que comme chez *E. coli*, les gènes du chimiotactisme d'*E. amylovora* sont régulés de la même façon que les gènes flagellaires de classe L.

L'étude de l'expression de trois gènes du quorum sensing montre que deux gènes de chacun des systèmes de quorum sensing sont induits chez *Ea hrpS* mais pas chez *Ea hrpL*. Ainsi, HrpS, régulateur positif de *hrpL*, semble avoir également une fonction de régulateur négatif, indépendante de HrpL. Les 2 gènes induits chez *Ea hrpS* correspondent chacun à un système de quorum sensing chez *E. amylovora* (AI-1, Molina *et al.*, 2005 ; AI-2, Gao *et al.*, 2008). AI-2 pourrait être impliqué dans la synthèse de polysaccharide, la tolérance au peroxyde d'hydrogène et le développement de symptômes sur pommier (Gao *et al.*, 2008). Il semblerait que pour au moins un des systèmes (AI-2), le maximum d'expression de ce système se situe en fin de phase exponentielle de croissance. On peut essayer d'expliquer la protection assurée par le mutant *Ea hrpS* en supposant que lorsqu'il est en mélange avec la souche sauvage, sa surexpression du quorum sensing perturbe la régulation de gènes chez la souche sauvage à un moment où celle-ci n'a pas atteint une densité de population suffisante pour provoquer la maladie. Le quorum sensing peut dépendre de facteurs environnementaux comme la température chez d'autres pathogènes comme *Pectobacterium atrosepticum* par exemple (Latour *et al.*, 2007). Or nous avons réalisé nos extractions d'ARN en milieu de phase exponentielle, à 23°C. Il resterait donc à comparer l'expression des gènes des deux systèmes, chez les mutants et la souche sauvage, à différents temps au cours de la croissance bactérienne et en fonction de la température, et de vérifier la production de l'autoinducteur chez les différents mutants *hrp* puisque par ailleurs, des séquences de boîtes Lux-like ont été

décrites en amont de gènes impliqués dans des fonctions liées au pouvoir pathogène comme *foxR*, *ams* ou *hrpL* (Molina *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats suggère que plusieurs mécanismes sont impliqués dans la protection conférée par les deux mutants de régulation contre le feu bactérien, et que chaque mutant a son propre mécanisme vis à vis de la protection qu'il confère contre la maladie, puisque nous n'avons pas mis en évidence de gènes régulés en commun par HrpS et HrpL. Cela est plausible puisque chez *E. amylovora*, *hrpL* n'est que partiellement régulé par HrpS (Wei et Beer, 1995). Bien que notre étude ne soit pas exhaustive, elle ouvre des perspectives nouvelles intéressantes sur l'identification de nouveaux facteurs potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène d'*E. amylovora*, grâce à certains résultats que nous avons obtenus avec l'analyse par cDNA-AFLP et qui sont discutés dans les paragraphes suivants.

Perspectives

La technique de cDNA-AFLP a surtout été utilisée chez les eucaryotes à l'exception de quelques travaux sur le transcriptome d'*Erwinia carotovora* et de *Xanthomonas campestris* (Dellagi *et al.*, 2000 ; Noël *et al.*, 2001). Cette technique présente l'avantage de permettre l'identification simultanée de gènes réprimés ou induits pour plusieurs conditions en même temps. Le cDNA-AFLP peut être appliqué à des organismes non séquencés, et se révèle très précis pour les organismes séquencés puisque les séquences partielles permettent l'identification sans ambiguïté du gène correspondant. Plusieurs séquences trouvées dans notre étude correspondent en fait au même gène. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans d'autres études (Noël *et al.*, 2001). Cette redondance peut être due soit à un problème de restriction incomplète, suite à un plus grand nombre de transcrits, soit à la présence de plusieurs sites de restriction dans un même fragment, ce qui génère plusieurs fragments. Par ailleurs cette technique peut conduire à la mise en évidence de faux-positifs, qui peuvent être produits par des artéfacts de la transcription inverse ou de la PCR. C'est ce qui semble malheureusement être le cas dans notre analyse. En effet, les profils d'expression de la plupart des gènes identifiés par cDNA-AFLP ont été contrôlés par qRT-PCR. Ces gènes ne sont finalement que très peu différenciellement exprimés chez les mutants de régulation comparés à la souche sauvage (excepté pour le gène de la S-adénosyl méthionine synthétase, le gène *ompW* et le gène *secA*). Ces différences d'expression sont parfois si faibles que nous n'avons pu valider, pour quelques gènes, la différence d'expression observée en AFLP entre *Ea* wt et *Ea hrpL* cultivées en M9 gal : c'est le cas pour les gènes de l'allantoïne permease, de la trehalase, de l'ATPase d'un système de transport de type ABC transporteur, de RpoE et de la Zn métallopeptidase. Chez d'autres bactéries, l'induction des gènes *hrp* est beaucoup plus forte *in planta* qu'en milieu *hrp*-inducteur. Par conséquent, il serait intéressant de comparer les expressions des gènes d'*E. amylovora in planta* par rapport à l'expression *in vitro*, pour voir si on amplifie les différences. L'AFLP a donc ses limites si l'on étudie des « variations » d'expressions de gènes et non présence/absence d'expression.

Parmi les gènes positivement régulés par HrpL, nous avons trouvé dans notre étude des transcrits de gènes codant pour des effecteurs (HrpW et DspA) présents chez la souche sauvage et le mutant *Ea hrcV*, et dont l'expression est nulle chez les mutants *Ea hrpS* et *Ea hrpL*. Tous les effecteurs n'ont cependant pas été mis en évidence et nos analyses d'expression quantitative montrent que certains ne sont apparemment pas complètement contrôlés par les gènes de régulation. Ainsi, des analyses complémentaires d'expression menées pour *hrpN* (figure 3.10) et deux gènes de sécrétion (*hrcV* et *hrcT*) (résultats non montrés), mettent en évidence une expression non négligeable du gène *hrpN* chez les mutants de régulation alors que les gènes de sécrétion ne sont pas exprimés. Les analyses par western-blot (résultats non montrés) mettent en évidence que HrpN est présente dans le compartiment

intracellulaire bactérien mais n'est pas sécrétée, ce qui est lié au fait que le système de sécrétion n'est pas fonctionnel chez ces mutants. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas retrouvé de séquence correspondant à *hrpN* en cDNA-AFLP, puisque cette séquence devait être présente à la fois chez la souche sauvage et chez son mutant de régulation *hrpL* : elle n'a donc pu être sélectionnée sur gel d'AFLP. Ces résultats suggèrent que tous les effecteurs ne sont peut-être pas strictement régulés par HrpL. Cette différence de régulation d'expression des effecteurs indique aussi que différents effecteurs peuvent être requis à différents moments *in planta* et que leur cinétique d'expression n'est pas la même.

Nous avons pu mesurer l'expression d'un gène homologue à *InvG/ysaC* qui est un gène du T3SS de *Sodalis glossinidius*, un endosymbionte d'insecte. Triplett et ses collaborateurs (2006) ont déjà décrit la présence de deux copies de ce T3SS putatif chez différentes souches d'*E. amylovora* mais n'ont pas mis en évidence d'expression de ce système. Il serait moins conservé que le système Hrp impliqué dans l'infection de la plante puisque on ne trouve pas de gènes homologues de ce T3SS chez *E. pyrifoliae*. Le rôle, s'il existe, de ce second T3SS dans la virulence n'est pas connu à ce jour.

Certains gènes sont fortement induits chez *Ea* wt cultivée en milieu *hrp*-inducteur. C'est le cas des gènes de la S-adénosylméthionine synthétase (HrpL-I), de l'outer membrane protein W (HrpL-I), de la préprotéine translocase SecA (HrpL-R), du régulateur de transcription de type AraC (HrpL-R) et de l'allantoïne perméase (HrpL-R) qui ont un log₂ du ratio d'expression en milieu M9 gal comparé au milieu M9 glu inférieur à -1. La S-adénosylméthionine synthétase, pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse de l'éthylène. La synthèse d'éthylène est connue depuis longtemps chez les bactéries (Freebairn et Buddenhagen, 1964 ; Weingart et Volksch, 1997). Par contre, la découverte du contrôle de cette phytohormone par un gène de régulation *hrp* a récemment été décrite chez *Ralstonia* (Valls *et al.*, 2006). L'éthylène produit par la plante est impliqué entre autres dans la défense mais l'éthylène d'origine bactérienne interviendrait dans le développement de la maladie dans le cas des pathosystèmes *R. solanacearum/A. thaliana* par exemple ou *P. syringae* pv *tomato*/tomate (Hirsch *et al.*, 2002 ; Cohn et Martin, 2005). L'éthylène est une hormone dont la voie de biosynthèse *in planta* est induite par *E. amylovora* (§ 1.2 de ce chapitre), on peut donc penser que la bactérie a intérêt à la produire pour favoriser le développement de la maladie. Le profil d'expression du gène de la S-adénosylméthionine synthétase suggère que cette synthèse est réprimée chez tous les mutants *hrp* et en particulier chez *Ea hrpS*, et induite en conditions *hrp*-inductrices (figure 3.12). Il est possible que chez *E. amylovora*, la synthèse de l'éthylène soit un facteur d'agressivité, ce qui n'a jamais été signalé chez cette bactérie.

Une séquence correspondant à un gène régulateur de transcription de type AraC a été identifiée comme étant très induite chez *Ea* wt cultivée en milieu M9 gal. Il présente une forte homologie avec le gène *araC* d'*E. tasmaniensis*. Cette protéine régule l'opéron arabinose, impliqué dans le catabolisme de l'arabinose, et est très conservée chez les bactéries (Schleif, 2000). Les protéines de type *araC* régulent aussi des fonctions diverses comme les réponses au stress ou la virulence (Martin et Rosner, 2001).

Un gène d'allantoïne perméase est également induit chez *Ea* wt cultivée en milieu M9 gal. Ce gène code une protéine impliquée dans le transport de nucléotides.

Seule la construction de mutants d'*E. amylovora* dans ces différents gènes pourra permettre de préciser leur fonction dans l'agressivité.

L'ensemble de ces résultats suggèrent des modifications liées à la sécrétion, qui devraient être visibles au niveau membranaire chez les mutants protecteurs. Il faudra donc comparer les profils des protéines de membranes en milieu *hrp* ou non *hrp*-inducteur, chez la souche sauvage et chez ses mutants *hrp* afin de confirmer cette hypothèse. Ce travail viendrait

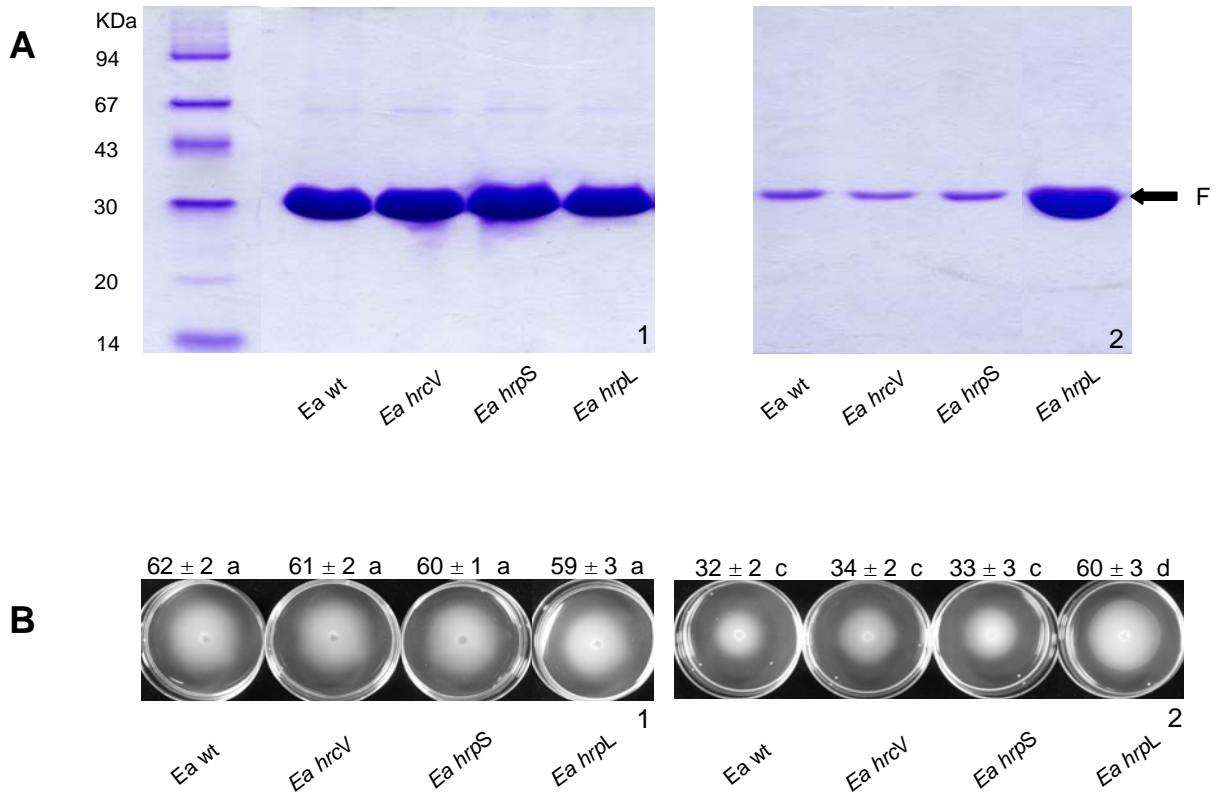


Figure 3.13 : Electrophorèse en SDS-PAGE du surnageant de culture (A) et mobilité (B) obtenus sur milieu non *hrp*-inducteur M9 glu (1) ou *hrp*-inducteur M9 gal (2) de Ea wt et de ses mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS* et Ea *hrpL*. Les valeurs de mobilité sont les moyennes des diamètres des colonies de 3 expériences avec 3 réplicats par expérience. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%. F, flagelline.

compléter la recherche d'adhésines chez les mutants de régulation, qui ont été évoquées ci-dessus.

3 CAS PARTICULIER DU (DES) SYSTEME(S) FLAGELLAIRE(S) D'*ERWINIA AMYLOVORA*

Nous avons vu qu'un surnageant de culture du mutant *Ea hrpL* cultivé sur milieu *hrp*-inducteur M9 gal contient une protéine majoritaire supposée être une flagelline, contrairement à des surnageants de la souche sauvage, du mutant de sécrétion et du mutant de régulation *Ea hrpS*. Ceci, joint au rôle reconnu de la flagelline dans d'autres pathosystèmes, nous a conduit à mener une étude approfondie sur l'implication de la flagelline dans la protection apportée par le mutant *Ea hrpL*, ainsi que sur la relation apparente entre le régulateur HrpL du cluster Hrp et le système flagellaire d'*E. amylovora*.

3.1 REGULATION NEGATIVE EXERCEE PAR HrpL SUR LE SYSTEME FLAGELLAIRE

Nous avons comparé, sur gel SDS-PAGE, les protéines contenues dans le surnageant de culture de *Ea wt*, de ses mutants de régulation *Ea hrpS* et *Ea hrpL*, et de son mutant de sécrétion *Ea hrcV*, cultivés pendant 2 jours en milieu M9 glu et 4 jours en milieu M9 gal à 23°C (figure 3.13). Nous avons observé la surproduction d'une protéine d'environ 32 KDa chez le mutant *hrpL* (figure 3.13 A2) en milieu *hrp*-inducteur M9 gal. Cette protéine a été identifiée comme étant une flagelline tout d'abord grâce à l'utilisation d'un serum anti-flagelline d'*Erwinia chrysanthemi* en western-blot. Nous avons par la suite produit et utilisé notre propre serum dirigé contre la flagelline d'*E. amylovora* (cf matériel et méthode).

En milieu non *hrp*-inducteur M9 glu (figure 3.13, A1), cette protéine est présente chez *Ea wt* en quantité plus importante que lorsque la bactérie est cultivée sur M9 gal d'une part, et d'autre part la quantité est la même chez la souche sauvage et chez ses mutants. Ces résultats nous ont conduit à supposer l'existence d'une régulation négative des gènes flagellaires par HrpL, ne s'exprimerait que sur milieu inducteur du gène *hrpL*, c'est-à-dire en milieu M9 gal.

Pour asseoir cette hypothèse, nous avons testé la mobilité de la souche sauvage *Ea wt* et de ses mutants *Ea hrcV*, *Ea hrpS* et *Ea hrpL*, cultivés sur les mêmes milieux. Nos résultats montrent tout d'abord que la mobilité de la souche sauvage est plus faible sur M9 gal que sur M9 glu (figure 3.13, B1 et B2). Cette différence de mobilité n'est pas corrélée à la vitesse de croissance : le retard de croissance entre les 2 milieux est de 15 heures (figure 3. 14) alors que le délai nécessaire pour obtenir une mobilité comparable sur les 2 milieux est de plus de 48 heures. Nous avons étudié la mobilité de plusieurs souches sauvages d'*E. amylovora* sur ces 2 milieux. Quelle que soit la souche, on observe la différence de mobilité entre les 2 milieux (résultats non montrés), ce qui indique que cette réponse n'est pas spécifique d'une souche particulière. La mobilité de la souche sauvage et celle de ses mutants ne sont pas significativement différentes sur milieu non *hrp*-inducteur (figure 3.13, B1). En revanche, le mutant *Ea hrpL* est significativement plus mobile que la souche sauvage sur milieu *hrp*-inducteur, les autres mutants n'étant pas différents de la souche sauvage (figure 3.13, B2). Enfin, nous avons observé les bactéries après culture sur M9 gal, par microscopie électronique. Il apparaît que plus de 80% des cellules bactériennes du mutant *Ea hrpL* portent des flagelles, avec plusieurs flagelles par cellule, alors que seulement 10% des cellules de la souche sauvage ou des mutants *hrcV* et *hrpS* sont flagellées et ne portent qu'un seul flagelle (figure 3.15).

Pour démontrer définitivement le rôle du gène *hrpL* dans la régulation du système flagellaire, nous avons construit un mutant *hrpL* complété par *hrpL* en trans sur un

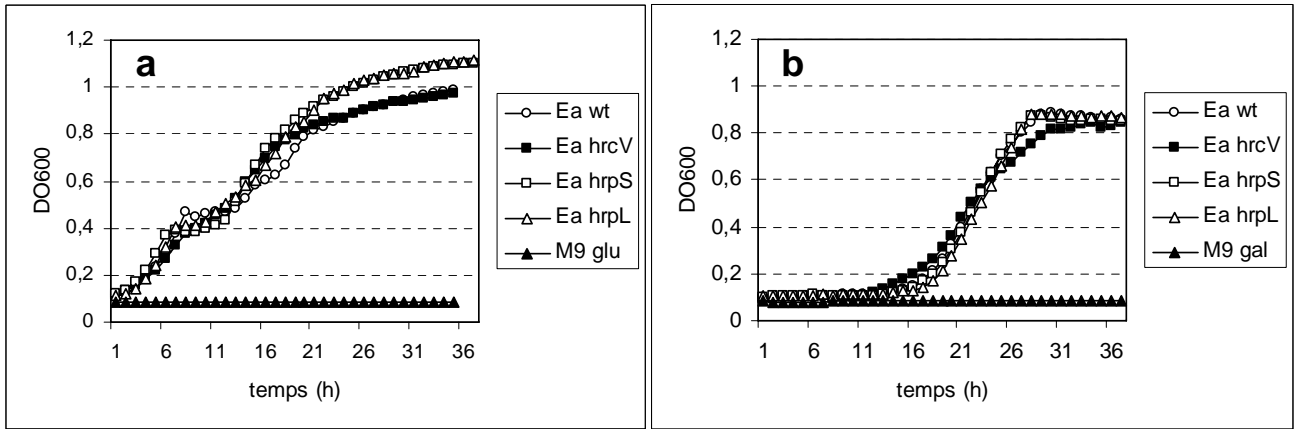


Figure 3.14 : Courbes de croissance de Ea wt et de ses mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS*, Ea *hrpL* en milieu M9 glu (a) et M9 gal (b) à 23°C. Moyenne de trois répétitions biologiques.

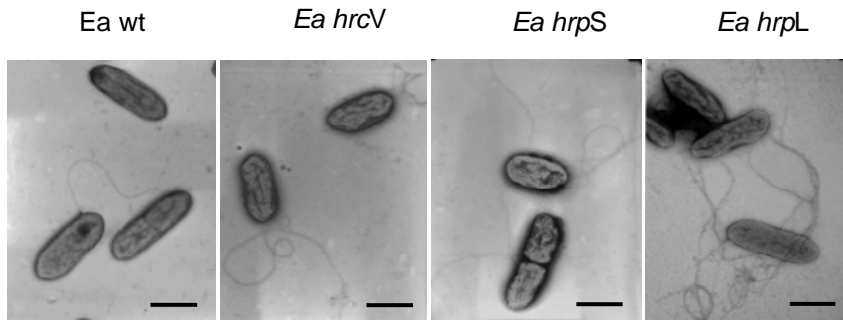


Figure 3.15 : Micrographies électroniques de Ea wt et de ses mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS* et Ea *hrpL* cultivés en M9 gal. Les expériences ont été répétées deux fois avec des résultats similaires. Barre = 1 μ m.

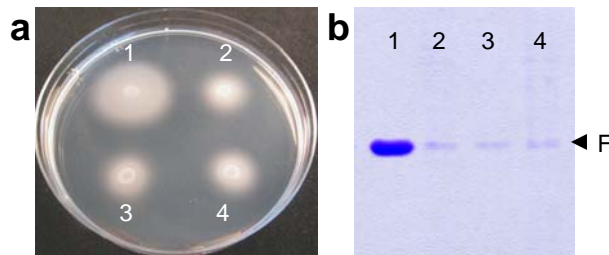


Figure 3.16: Mobilité (a) et électrophorèse en SDS-PAGE du surnageant de culture (b) du mutant Ea *hrpL* portant le plasmide pUC18 (1) ou pMAB71 (2) et de Ea wt portant pUC18 (3) ou pMAB71 (4) utilisées comme contrôles, cultivés en milieu M9 gal. Des résultats similaires ont été obtenus dans 3 expériences indépendantes. F, flagelline.

plasmide pUC18 (appelé pMAB71). La complémentation diminue à la fois la mobilité du mutant *Ea hrpL* et sa sécrétion de flagelline (figure 3.16). Elle restaure la capacité de *Ea hrpL* à provoquer une HR sur tabac et la maladie sur plantule de pommier. Ces observations confortent la régulation négative exercée par *hrpL* sur le système flagellaire.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication (Cesbron *et al.*, 2006)

3.2 ROLE DE LA FLAGELLINE DANS LA PROTECTION

La surproduction de la flagelline chez *Ea hrpL* suggérait que cette protéine connue comme MAMP dans les interactions plantes-bactéries peut jouer un rôle dans la protection assurée par ce mutant. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons construit un mutant de *Ea* wt affecté à la fois dans la synthèse de la flagelline et dans *hrpL* (figure 3.17). Pour cela, un mutant non mobile a été repéré dans une banque de clones obtenus par insertion du phage MudIIPR13 dans *Ea* wt (Barny *et al.*, 1990). L'insertion a été localisée, après séquençage, dans un gène homologue à *fliH* (NP_288401) chez *E. coli* (57 % d'identité protéique), codant une protéine qui interagit avec FliI, une ATPase responsable de l'export de la flagelline (Macnab, 2003). La séquence nucléotidique a été déposée dans GenBank® sous le numéro AY743587. La comparaison des protéines extracellulaires de *Ea* wt et de son mutant *fliH* sur milieu *hrp*-inducteur a permis de confirmer que le mutant *fliH* ne sécrète pas la flagelline (figure 3.17, b). L'inoculation de plantules de Pommier par *Ea* wt ou son mutant *Ea fliH* a montré que ce dernier est aussi agressif que la souche sauvage sur plantes blessées, mais significativement moins agressif sur plantes non blessées (figure 3.17, c). Dans ce cas, les bactéries doivent en effet atteindre les sites naturels d'infection sur feuilles (stomates), et une souche portant des flagelles semble donc avantagée par rapport à une souche qui n'en porte pas. Nous avons ainsi montré par comparaison de deux méthodes d'inoculation que la mobilité peut jouer un rôle dans l'agressivité chez *E. amylovora*.

Le double mutant *Ea fliH-hrpL* a ensuite été créé par recombinaison homologue, en utilisant un plasmide portant le gène *hrpL* muté. La mutation dans *hrpL* a été vérifiée par PCR. Ce mutant est non mobile et ne sécrète pas la flagelline (figure 3.17, a et b). Il est non pathogène et est incapable de provoquer une HR sur tabac. Nous avons étudié l'effet de protection obtenu avec ce double mutant en utilisant le biotest avec inoculation par dépôt de goutte sur blessure. Nos résultats montrent que le niveau de protection assuré par le double mutant *Ea fliH-hrpL* et *Ea hrpL* sont identiques (figure 3.18, a et b). D'autre part, avec le biotest sur disques foliaires (mesure des fuites d'électrolytes), nous avons montré que le double mutant *Ea fliH-hrpL* ou son surnageant de culture sur milieu *hrp*-inducteur (M9 gal) induit une fuite de même niveau que le surnageant du mutant *Ea hrpL* (figure 3.18, c). La flagelline ne serait donc pas un facteur (ou l'unique facteur) impliqué dans la protection.

3.3 RECHERCHE *IN SILICO* DES GENES FLAGELLAIRES D'*E. AMYLOVORA*

3.3.1 MISE EN EVIDENCE DES DEUX SYSTEMES FLAG-1 ET FLAG-2

Afin de déterminer à quel niveau de la synthèse de la flagelline s'opère la régulation négative par HrpL, une recherche *in silico* des ORF flagellaires a été entreprise sur la séquence chromosomique d'*E. amylovora*, la séquence complète mais non annotée de cette bactérie étant devenue accessible au cours de cette étude. La recherche des ORFs flagellaires s'est effectuée par comparaison avec des séquences similaires chez *S. enterica* ou chez *E. coli*. Notre analyse a mis en évidence l'existence de 2 systèmes flagellaires chez cette bactérie, que nous avons nommés Flag-1 et Flag-2 dans la suite de ce document.

Les gènes du système Flag-1 sont typiquement répartis sur le chromosome en quatre clusters, comme chez *E. coli*. En revanche, les gènes du système Flag-2, aussi décrits chez *E.*

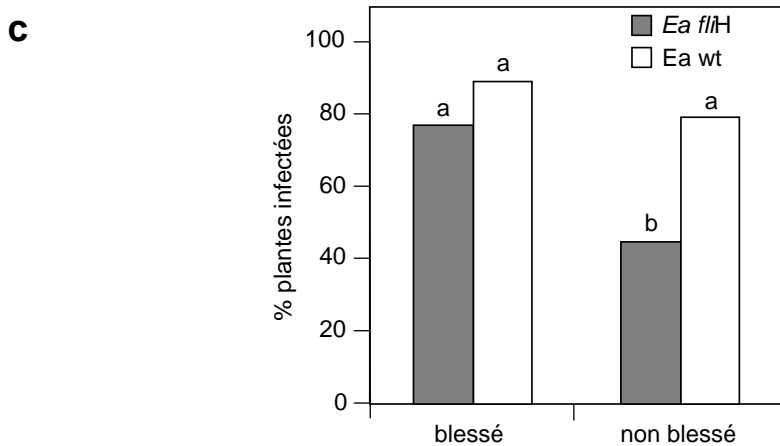
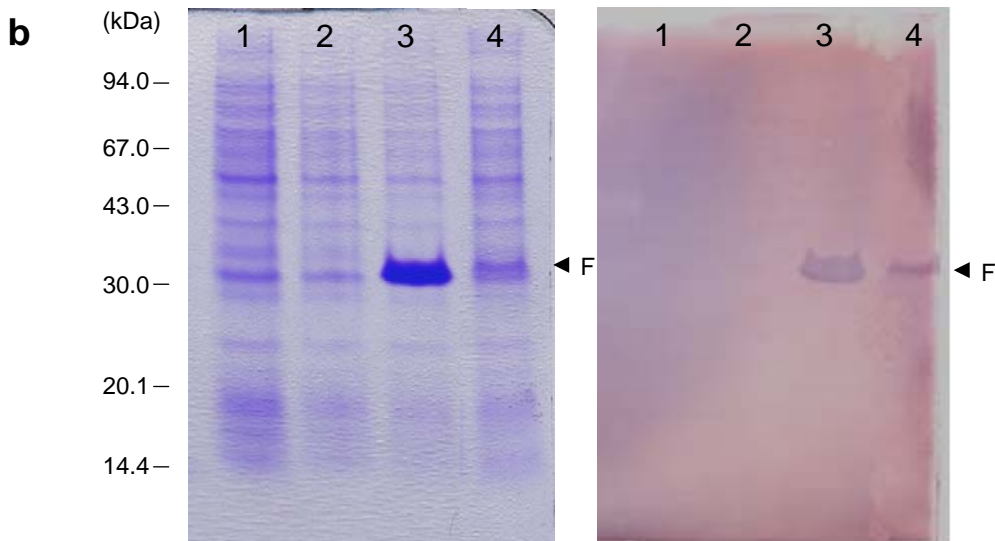
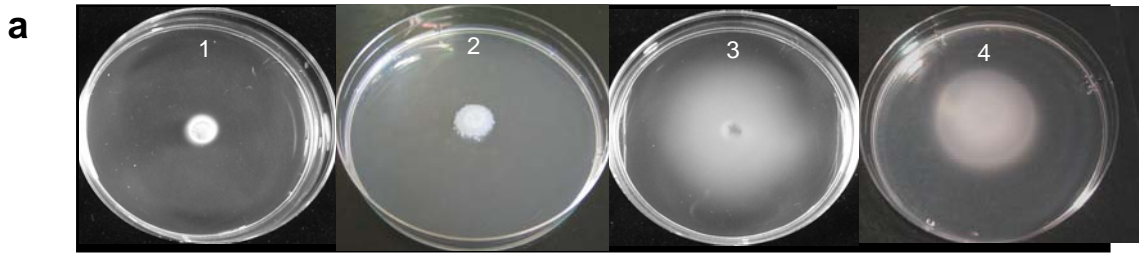


Figure 3.17 : Mobilité (a), électrophorèse en SDS-PAGE de surnageant de culture (b) et immunoblot correspondant (b) de *Ea fliH* (1), *Ea fliH-hrpL* (2), *Ea hrpL* (3) et *Ea wt* (4) cultivées en M9 gal. F, flagelline. Agressivité du mutant *Ea fliH* comparée à *Ea wt* en utilisant 2 méthodes d'inoculation (c). Les barres surmontées des mêmes lettres représentent des pourcentages de plantes malades non significativement différents au seuil de 5%.

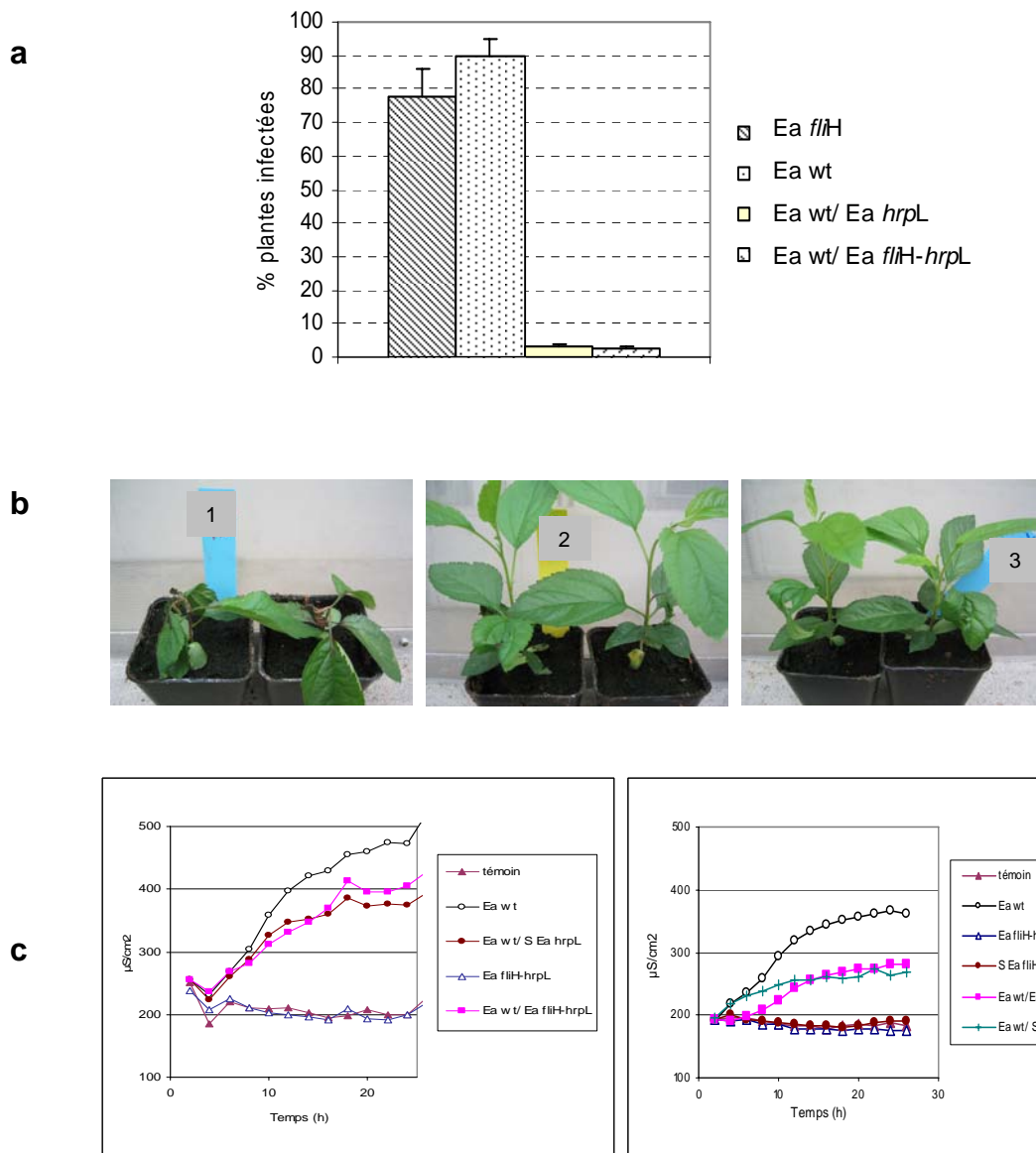


Figure 3.18 : (a) Protection obtenue sur plantules de pommier, (b) symptômes d'infection de semis de pommier inoculés avec *Ea wt* seule (1) ou en co-inoculation par dépôt de goutte sur blessure avec *Ea hrpL* (2) ou *Ea fliH1-hrpL* (3). (c) effet de surnageants (S) de culture de *Ea hrpL* et *Ea fliH1-hrpL* cultivées en M9 gal, sur les fuites d'électrolytes provoquées par *Ea wt*. Moyenne de trois expériences indépendantes.

Tableau III.6 a : Liste des gènes flagellaires d'*E. amylovora* appartenant au système Flag-1

position	gène	nom	l'accension	%id	blast X-E value	fonction
1560282	flgN	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia pestis</i>	CAO97090.ZP_02306516.1	83/47	2E-65/e-30	Flagellar biosynthesis,type III secretory pathway chaperone
	flgM	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO97089.YP_001570852.1	82/57	1E-39/e-21	Negative regulator of flagellin synthesis (anti-sigma28 factor)
	flgA	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	CAO97088.YP_049802.1	76/48	9E-90/4e-58	Flagellar basal body P-ring biosynthesis protein
	flgB	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia mollaharelii</i>	CAO97087.1.YZP_00824171.1	90/77	5E-67/2e-58	Flagellar basal body protein
	flgC	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	CAO97086.1.YNP_287208.1	91/80	2E-65/e-57	Flagellar basal body rod protein
	flgD	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO97085.1.YYP_001438357.1	91/69	1E-94/e-73	Flagellar hook capping protein
	flgE	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	CAO97084.1.YYP_001744104.1	88/68	0/7e-150	Flagellar hook protein
	flgF	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO97083.1.YNP_455671.1	93/75	2E-131/5e-108	Flagellar basal body rod protein
	flgG	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter</i> sp.	CAO97082.1.YYP_001176322.1	98/85	9E-146/1e-126	Flagellar basal body rod protein
	flgH	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Shigella boydii</i>	CAO97081.1.YYP_001880750.1	95/76	2E-93/e-77	Flagellar basal body L-ring protein
	flgI	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO97080.1.YYP_001570843.1	94/78	0/1e-144	Flagellar P-ring protein precursor
	flgJ	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO97079.1.YYP_001438351.1	92/61	3E-170/1e-109	Flagellar biosynthesis protein
	flgK	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO97078.1.YYP_001438350.1	82/59	0/2e-175	Flagellar hook-associated protein
1571883	flgL	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	CAO97077.1.YZP_00710518.1	82/55	1E-145/8e-94	Flagellin and related hook-associated proteins
1606718	fliR	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter</i> sp.	CAO97046.1.YYP_001177261.1	95/70	3E-122/2e-101	Flagellar biosynthesis protein
	fliQ	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	CAO97045.1.YYP_001177260.1	98/74	3E-38/3e-29	Flagellar biosynthesis pathway
	fliP	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO97044.1.YNP_456540.1	98/92	6E-108/3e-102	Flagellar biosynthesis pathway
	fliO	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Citrobacter koseri</i>	CAO97043.1.YYP_001452578.1	82/54	4E-45/2e-28	Flagellar biogenesis protein
	fliN	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Erwinia carotovora</i>	CAO97042.1.YYP_049818.1	90/78	3E-63/2e-53	Flagellar motor switch protein
	fliM	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	CAO97041.1.YNP_310711.1	95/88	0/2e-168	Flagellar motor switch protein
	fliL	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Serratia proteamaculans</i>	CAO97040.1.YYP_001479182.1	80/63	5E-84/4e-50	Flagellar basal body-associated protein
	fliK	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Serratia proteamaculans</i>	CAO97039.1.YYP_001479181.1	58/38	2E-113/4e-42	Flagellar hook-length control protein
	fliJ	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO97038.1.YYP_001437354.1	89/63	1E-70/6e-49	Flagellar biosynthesis chaperone
	fliI	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CAO97037.1.YYP_070227.1	99/88	5E-104/6e-94	Flagellar biosynthesis,type III secretory pathway ATPase
	hypothetical protein	<i>Legionella pneumophila</i>	YP_001251599.1	21	0.69	
	fliH	<i>Erwinia amylovora</i> / <i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	AAU90045.1 CAO97036.1 YYP_0014587	100/91/72	7E-102/4e-95/1e-64	Flagellar biosynthesis,type III secretory pathway protein
	fliG	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Serratia proteamaculans</i>	CAO97035.1.YYP_001479177.1	97/88	0/5e-168	Flagellar motor switch protein
	fliF	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO97034.1.YNP_456530.1	88/66	0/0	Flagellar basal-body M-ring protein
	fliE	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia mollaharelii</i>	CAO97033.1.YZP_00824966.1	92/66	4E-47/3e-31	Flagellar hook-basal body complex protein
1620179	cheV	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO97030.1.YYP_001438275.1	86/74	2E-157/3e-136	
2166262	fliE	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter</i> sp.	CAO96520.1.YYP_001177165.1	70/58	8e-49/4e-32	Flagellar protein
	fliA	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Serratia proteamaculans</i>	CAO96519.1.YYP_001479205.1	94/85	0/0	Flagellar protein
	fliB	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia pestis</i>	CAO96518.1.YNP_405357.1	93/67	0/2e-154	Flagellar biosynthesis protein
	cheZ	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia pestis</i>	CAO96517.1.YNP_405256.1	91/76	2E-105/5e-86	Flagellar biosynthesis pathway
	cheY	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia frederiksenii</i>	CAO96516.1.YZP_00831272.1	96/93	4E-65/1e-62	Chemotaxis protein
	cheB	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i>	CAO96515.1.YYP_001437447.1	94/85	0/1e-174	CheY-like receiver
	cheR	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia mollaharelii</i>	CAO96514.1.YZP_00824161.1	92/81	1E-158/1e-132	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase
	MCPIV	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter</i> sp.	CAO96513.1.YYP_001177176.1	94/77	2E-63/1e-49	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins
	MCP	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Citrobacter koseri</i>	CAO96510.1.YYP_001455137.1	82/64	0/0	Methyl-accepting chemotaxis protein
	cheW	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia bercovieri</i>	CAO96509.1.YZP_00821183.1	94/87	2E-83/8e-76	Chemotaxis protein
	cheA	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Salmonella enterica</i>	CAO96508.1.YYP_216915.1	88/77	0/0	Chemotaxis protein histidine kinase
	motB	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia enterocolitica</i>	CAO96507.1.YYP_001006781.1	85/63	1E-136/3e-94	Flagellar motor protein
	motA	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia mollaharelii</i>	CAO96506.1.YZP_00824370.1	97/82	7E-155/2e-132	Flagellar motor protein
	fliC	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Enterobacter</i> sp.	CAO96505.1.YYP_001177189.1	96/85	9E-107/3e-96	Flagellar transcriptional activator
2182888	fliD	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Serratia proteamaculans</i>	CAO96504.1.YYP_001479218.1	90/80	7E-56/4e-47	Flagellar transcriptional activator
2219023	fliZ	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia mollaharelii</i>	CAO96473.1.YZP_00824978.1	92/73	9E-70/8e-55	Putative alternative sigma factor regulatory protein
	fliA	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Yersinia frederiksenii</i>	CAO96472.1.YZP_00831229.1	95/86	2E-130/1e-113	RNA polymerase, sigma 28 subunit
		<i>Erwinia tasmaniensis</i>	CAO96471.1	84	1,00E-155	Hypothetical protein
	fliC	<i>Erwinia amylovora</i> / <i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	AAU90046.1 CAO96470.1 CAE53942.1	99/94/67	4E-145/3e-138/1e-109	Flagellin
	fliD	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	CAO96469.1.YNP_288385.1	80/62	0/8e-149	Flagellar capping protein
	fliS	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Shigella sonnei</i>	CAO96468.1.YYP_310882.1	95/68	1E-64/1e-44	Flagellin-specific chaperone
2224252	fliT	<i>Erwinia tasmaniensis</i> / <i>Escherichia coli</i>	CAO96467.1.YYP_001458715.1	78/44	1E-47/4e-18	Flagellar transcriptional regulation ou chaperonne?

Tableau III.6 b : Liste des gènes flagellaires d'*E. amylovora* appartenant au système Flag-2

position	gène	nom	l'accesion	%id	blast X-E value	fonction
2771609	<i>cheW</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824852	58	1,00E-46	Chemotaxis signal transduction protein
I	<i>cheA</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824851	64	0.0	Chemotaxis protein histidine kinase
I	<i>motB</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824850	63	2,00E-104	Flagellar motor protein
I	<i>motA</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824849	76	1,00E-120	Flagellar motor protein
I	<i>flhC</i>	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	CAO95997	81	1,00E-79	Flagellar transcriptional activator
I	<i>flhD</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823500	78	6,00E-42	Flagellar transcriptional activator
I	<i>fliA</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824848	63	2,00E-87	RNA polymerase, sigma 28 subunit
I	<i>cheD</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824847	53	9,00E-157	Methyl-accepting chemotaxis prote
I	<i>flgL</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823498	47	4,00E-73	Flagellin and related hook-associated proteins
I	<i>flgK</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824845	55	1,00E-171	Flagellar hook-associated protein
I	<i>flgJ</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823496	56	2,00E-91	Flagellar biosynthesis protein
I	<i>flgI</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823495	74	1,00E-156	Flagellar P-ring protein precursor
I	<i>flgH</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823494	74	1,00E-76	Flagellar basal body L-ring protein
I	<i>flgG</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824841	76	3,00E-115	Flagellar basal body rod protein
I	<i>flgF</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824840	66	3,00E-92	Flagellar basal body rod protein
I	<i>flgE</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824839	58	5,00E-127	Flagellar hook protein
I	<i>flgD</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824838	52	1,00E-53	Flagellar hook capping protein
I	<i>flgC</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824837	83	1,00E-60	Flagellar basal body rod protein
I	<i>flgB</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824836	62	9,00E-43	Flagellar basal body protein
I	<i>flgA</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824835	44	9,00E-52	Flagellar basal body P-ring biosynthesis protein
I	<i>flgM</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824834	45	2,00E-12	Negative regulator of flagellin synthesis (anti-sigma28 factor)
I	<i>flgN</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824833	46	9,00E-26	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway chaperone
I	<i>fliT</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824015	28	2,00E-07	Flagellar transcriptional regulation ou chaperonne?
I	<i>fliS</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824016	61	2,00E-46	Flagellin-specific chaperone
I	<i>fliD</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824017	42	1,00E-95	Flagellar capping protein
I	<i>fliC</i>	<i>Salmonella enterica</i>	AAR10704	47	6,00E-96	Phase 1 flagellin
I		<i>Erwinia tasmaniensis</i>	CAO95993	66	1,00E-100	Putative transcriptional regulatory protein
I		<i>Erwinia tasmaniensis</i>	CAO95992	69	5,00E-53	Hypothetical protein
I		<i>Caulobacter</i> sp. K31	YP_001686542	49	9,00E-49	Acetyltransferase RfbO, CysE/LacA/LpxA/ModL family, putative
I		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448	YP_275578	64	8,00E-135	Aminotransferase, DegT/DnrJ/EryC1/StrS family
I		<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	NP_001437388	35	0.0	Methyltransferase
I	<i>fliR</i>	<i>Yersinia pestis</i> CO92	NP_405384	54	4,00E-67	Flagellar biosynthesis protein
I	<i>fliQ</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823527	66	5,00E-26	Flagellar biosynthesis pathway
I	<i>fliP</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00826136	77	2,00E-102	Flagellar biosynthesis pathway
I	<i>fliO</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00826137	43	9,00E-18	Flagellar biogenesis protein
I	<i>fliN</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00826138	73	1,00E-43	Flagellar motor switch protein
I	<i>fliM</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00826139	76	2,00E-149	Flagellar motor switch protein
I	<i>fliL</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823522	47	5,00E-36	Flagellar basal body-associated protein
I	<i>fliK</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00826141	52	6,00E-31	Flagellar hook-length control protein
I	<i>fliJ</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823520	48	4,00E-33	Flagellar biosynthesis chaperone
I	<i>fliI</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823519	77	0.0	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway ATPase
I	<i>fliH</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824004	46	5,00E-53	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway protein
I	<i>fliG</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824005	83	1,00E-161	Flagellar motor switch protein
I	<i>fliF</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824006	60	0	Flagellar basal-body M-ring protein
I	<i>fliE</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823515	66	6,00E-20	Flagellar hook-basal body complex protein
I	<i>cheR</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823514	60	7,00E-105	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase
I	<i>cheB</i>	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	NP_310620	81	5,00E-116	CheY-like receiver
I	<i>cheY</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824010	60	7,00E-56	Chemotaxis protein
I	<i>cheZ</i>	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969	ZP_00824011	72	3,00E-66	Flagellar biosynthesis pathway
I	<i>fliB</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	AAL01537	85	2,00E-164	Flagellar biosynthesis protein
I	<i>fliA</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	AAL01538	85	0	Flagellar protein
2820793	<i>fliE</i>	<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970	ZP_00823508	53	5,00E-26	Flagellar protein

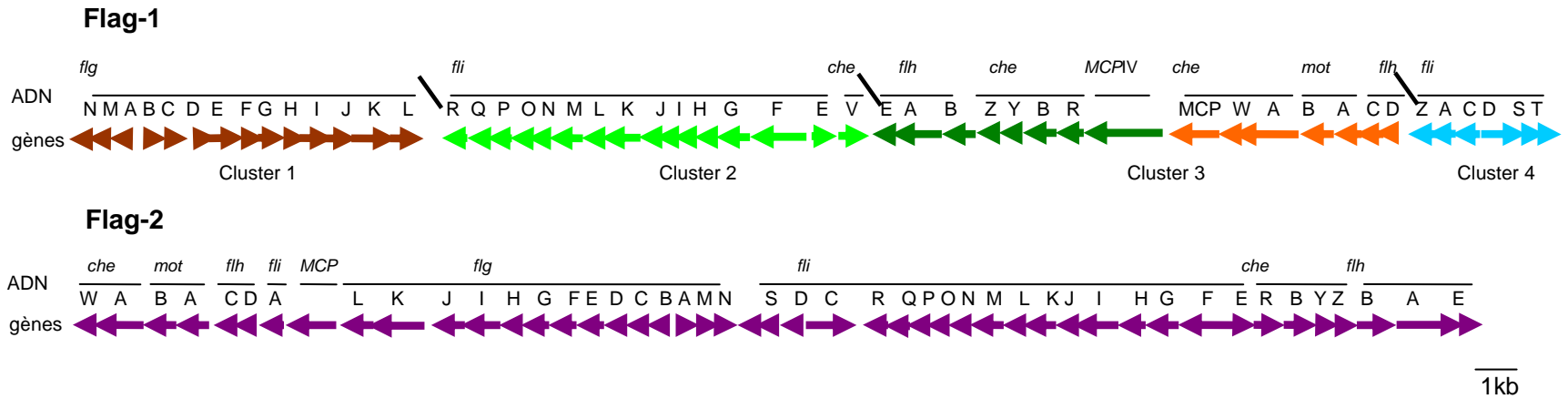


Figure 3.19 : Organisation des gènes des deux systèmes flagellaires Flag-1 et Flag-2 d'*E. amylovora*. Les ORFs sont représentées par des flèches de taille approximative.

coli 042 (Ren *et al.*, 2005) sont regroupés sur un locus unique d'une taille de 49 Kb (figure 3.19) dont le GC% de 54,15 est peu différent de celui de l'ADN génomique. Les deux systèmes sont composés de 52 gènes mais diffèrent par quelques gènes : nous n'avons pas trouvé par exemple d'homologue du gène *fliZ*₁ (un régulateur positif des opérons flagellaires de classe M) (cf figure 1.6) (Kutsukake *et al.*, 1999) et de deux gènes impliqués dans le chimiotactisme (*cheV*₁, *MCP*₁ et *MCPIV*₁) pour le système Flag-2 qui contient en revanche un gène *cheD*₂ et cinq ORFs surnuméraires ne codant pas de protéines flagellaires. Quelques protéines hypothétiques diffèrent entre les 2 systèmes.

La majorité des gènes de Flag-1 sont proches des gènes flagellaires d'*Erwinia tasmaniensis* (bactérie non pathogène isolée sur Maloïdées) (Geider *et al.*, 2006) et de *Yersinia* sp. ou *Enterobacter* sp. (bactéries pathogènes d'animaux) : les pourcentages d'identités protéiques varient de 52 à 100% pour *E. tasmaniensis* et de 38 à 93% pour les autres bactéries, avec une moyenne supérieure à 80% (tableau III.6, a). La majorité des gènes de Flag-2 sont similaires aux gènes du système flagellaire de *Yersinia mollaretii* (tableau III.6, b) ou *Yersinia bercovieri* (anciennement *Y. enterocolitica* biogroupe 3A et 3B respectivement), bactéries pathogènes d'animaux. Parmi les gènes du système Flag-2, quelques séquences présentent cependant des homologies avec des gènes d'*Erwinia tasmaniensis* (distincts toutefois des gènes de cette bactérie homologues aux gènes de Flag-1) : les pourcentages d'identités varient de 28 à 85%, la moyenne se situant aux alentours de 61%.

La présence de gènes homologues de *motA* et *motB* codant les protéines d'un moteur flagellaire latéral à gradient de protons dans les clusters Flag-1 et Flag-2, et l'absence de *motX* et *motY*, codant les protéines d'un moteur flagellaire polaire à gradient de sodium, permettent de supposer que les deux systèmes produisent des flagelles latéraux.

Chaque système possède son propre gène de flagelline. Le gène *fliC*₁ de Flag-1 code une flagelline de taille attendue de 29,6 KDa, homologue à la flagelline d'*E. tasmaniensis* et d'*E. coli*. Cette flagelline semble correspondre à la protéine observée dans les expériences précédentes. Le gène *fliC*₂ de Flag-2 code une flagelline homologue à la flagelline de phase 1 de *S. enterica*. Cette flagelline a une taille attendue de 49,5 KDa, soit 20 KDa de plus que celle du système Flag-1. La flagelline FliC₁ possède un motif N-terminal différent de Flg₂₂, peptide conservé chez les bactéries qui élicite des réactions de défense (Zipfel *et al.*, 2004). En revanche, FliC₂ possède un motif plus proche de Flg₂₂. L'alignement des séquences pour ce motif montre que FliC₁ et FliC₂ diffèrent pour quelques acides aminés qui gardent cependant la même taille et/ou la même hydrophobie (figure 3.20), nécessaires sans doute à l'assemblage du flagelle. Le motif correspondant à Flg₂₂ dans FliC₁ diffère de 8 acides aminés par rapport à Flg₂₂, FliC₂ diffère de 5 acides aminés par rapport à Flg₂₂ dont 4 sont communs avec FliC₁. Comparé aux flagellines de *X. campestris*, le peptide correspondant à Flg₂₂ pour FliC₂ diffère d'un acide aminé (glutamine Q au lieu de leucine L) par rapport au peptide correspondant à Flg₂₂ des flagellines élicitrices (par exemple ABC87266) (figure 3.20).

Deux ORFs de Flag-1 codent des protéines hypothétiques, non flagellaires, situés entre *fliI* et *fliH*, et *fliA* et *fliC*. De même, cinq ORFs qui ne codent pas des protéines flagellaires, sont situés entre *fliC* et *fliR* dans le cluster Flag-2 (tableau III.6, b). La première code une protéine avec un domaine N-terminal de régulateur de transcription. Cette séquence présente une forte homologie avec une protéine de fonction inconnue d'*E. tasmaniensis*, et des homologies plus faibles avec d'autres régulateurs de transcription transmembranaires comme *toxR* chez *Vibrio*. La seconde séquence coderait une protéine hypothétique homologue également avec une protéine d'*E. tasmaniensis*. La troisième et la quatrième séquences coderaient respectivement une acyltransférase et une aminotransférase. La cinquième coderait une méthyltransférase avec un domaine TPR (tetratricopeptide repeat domain) dont les

Tableau III.7 : Amorces utilisées pour l'étude de l'expression de gènes du système flagellaire et de gènes du chimiotactisme

gène	fonction	amorce	séquence	taille du produit (pb)	Tm
<i>flhC</i>	master regulator	flhC1-di	CCTGGTTAAGCGACTGATTGACTG	105	60°C
		flhC1-re	CTGGCGAGGCTGACATTGC		
		flhC2-di	CGACACGCAGACGACAAATC	87	60°C
		flhC2-re	CGACGATTGATAACTTGAAAAGCAC		
<i>fliI</i>	ATPase	fliI1-di	GGTCCTGCTGGTCGTCAC	120	60°C
		fliI1-re	ACCTTCTGTATTCGCCAAACTGC	175	60°C
		fliI2-di	ATCGGGTCTTGCTGGTCGTC		
		fliI2-re	AGCGTGAGGTGGCATTGGC		
<i>fliM</i>	anneau C (rotation du moteur)	fliM1-di	TGTCACGCCAGTTCTCATCTTCAG	186	60°C
		fliM1-re	AGTTCACCAATATCACCACCTCACC	172	60°C
		fliM2-di	GGCAAACCTCATACGCTTCCTG		
		fliM2-re	CGGCACCTCGCTGATGG		
<i>fliC</i>	flagelline	fliC1-di	CTGTAAGTTGTTGTTGATGCCTGTC	189	60°C
		fliC1-re	TCTATGGAGCGTCTGTCTTCTGG	195	60°C
		fliC2-di	CGCACTGAGTCTGATGG		
		fliC2-re	GAGATACCGTCGTTGGC		
<i>motA</i>	rotation du moteur	motA1-di	GCGGCAAGCGTGTGGATAATG	175	60°C
		motA1-re	TGATGGTCAGCGGTAATATGAATGC	150	60°C
		motA2-di	GCGTCGGGTCGGAAAGTAAC		
		motA2-re	AAGTCGTCTATATGGATCTGATGGC		
<i>cheB</i>	methylesterase	cheB1-di	ATCAATTCCCGTGCCACCAG	70	60°C
		cheB1-re	TTGTCAACAGTCATTCCGATATGG	182	60°C
		cheB2-di	AAGATACGAGTGCTGTGC		
		cheB2-re	TTCATCCGTGGCATATCG		
<i>cheA</i>	kinase	cheA1-di	TGCTTCCTGTGCGGCTTCC	102	60°C
		cheA1-re	GCGGTATTGTGCTTTGTTATTGACG	84	60°C
		cheA2-di	CACATAGATTTTCGTCACCCACTTTG		
		cheA2-re	GGCACCACCATCCGATTCTG		
<i>cheZ</i>	phosphatase	cheZ1-di	GCTGGGCATTGGTGAAGGAC	78	60°C
		cheZ1-re	ACGCTCGCTCTTTGGTTTCG	102	60°C
		cheZ2-di	GCTGATCTGCGTGCTGCTG		
		cheZ2-re	TCGGCGGTGGAATTGATTTGC		

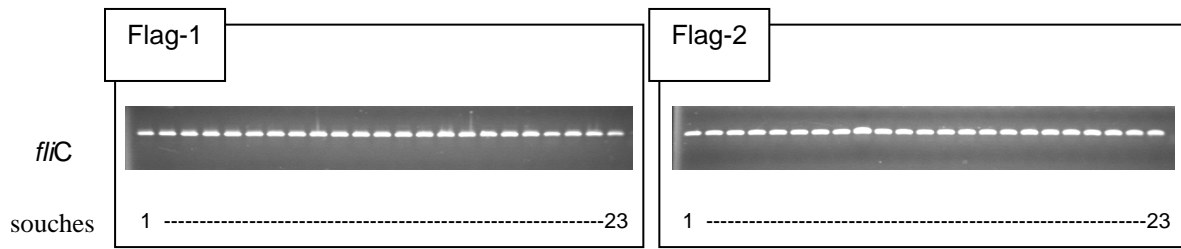


Figure 3.21 : Résultats d'amplification par PCR des gènes des flagellines de Flag-1 et de Flag-2 dans une collection de souches d'*E. amylovora* d'agressivités différentes (cf tableau II.1 pour la correspondance des souches)

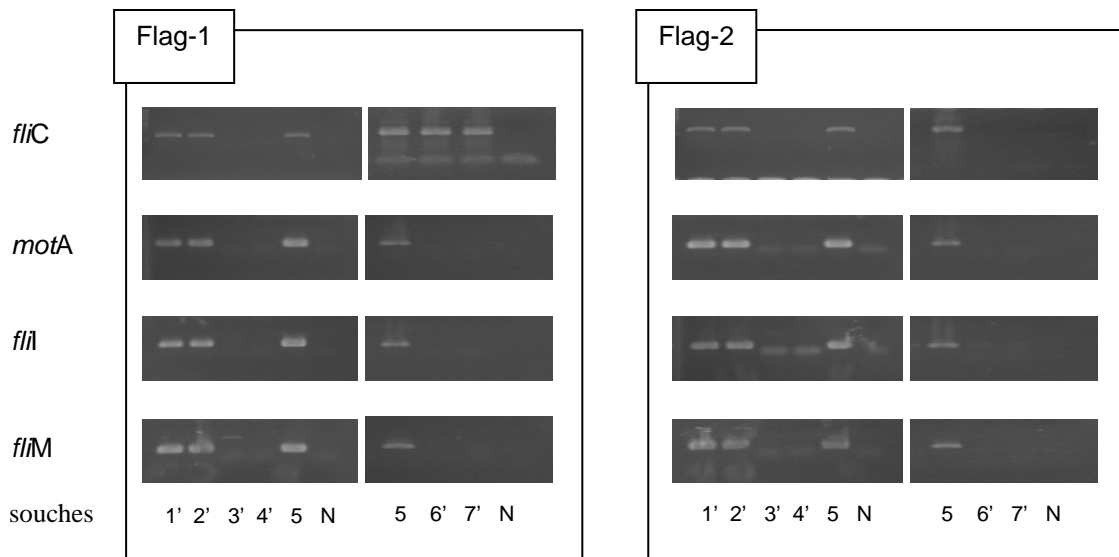


Figure 3.22 : Résultats d'amplification par PCR de quelques gènes flagellaires (*fliC*, *motA*, *fliI*, *fliM*) dans des souches de différentes espèces d'*Erwinia*. *E. pyrifoliae*, 1' (CFBP4171) et 2' (CFBP4172) ; *E. billingiae*, 3' (CFBP6830) et 4' (CFBP6832) ; *E. amylovora*, 5 (CFBP1430) ; *E. tasmaniensis*, 6' (Et1) et 7' (Et2) ; N, témoin négatif.

fonctions sont variées, un domaine méthyltransférase, et un domaine N-acétylglucosamine transférase. Il est possible que ces gènes interviennent dans des modifications post-traductionnelles de la flagelline.

3.3.2 REPARTITION DE FLAG-1 et FLAG-2 CHEZ DIFFERENTES ESPECES D'ERWINIA

Nous avons ensuite cherché à savoir si ces deux systèmes sont présents chez diverses souches d'*E. amylovora* d'agressivité différente et chez d'autres espèces du genre *Erwinia*, par PCR. Par ailleurs, nous avons vérifié la mobilité de toutes ces souches. Ainsi, un ensemble de 23 souches sauvages d'*E. amylovora* (dont *Ea* wt) pour lesquelles l'agressivité diffère en fonction de l'hôte (Paulin, communication personnelle) a été choisi. Nous avons également sélectionné 2 souches d'*E. pyrifoliae* (CFBP 4171 et CFBP4172) (pathogènes), 2 souches d'*E. tasmaniensis* (Et1 et Et2) (épiphytes), et 2 d'*E. billingiae* (CFBP6832 et CFBP6830) (épiphytes) en incluant la souche type pour chaque genre. Nous avons utilisé plusieurs couples d'amorces flagellaires dont celles des flagellines (tableau III.7). Les résultats PCR montrent que les gènes des deux flagellines sont présents chez toutes les souches d'*E. amylovora* (figure 3.21) et chez les 2 souches d'*E. pyrifoliae* (figure 3.22) mais sont absents ou divergents chez les 2 souches d'*E. billingiae* (figure 3.22), pourtant mobiles. Il semble que chez les souches d'*E. billingiae*, les systèmes flagellaires soient divergents puisque aucun des couples d'amorces testés n'a donné de signal (figure 3.22). Seuls les gènes du système Flag-1 sont mis en évidence chez *E. tasmaniensis* (figure 3.22). Ceci a été confirmé et complété par la recherche des gènes flagellaires de Flag-2 sur la séquence du chromosome de la souche Et1 récemment séquencée (Kube *et al.*, 2008): le système Flag-1 est présent mais le cluster Flag-2 est incomplet chez cette bactérie. Les gènes flanquant le cluster Flag-2 chez *E. amylovora* sont retrouvés chez *E. tasmaniensis*, mais c'est un cluster différent qui est présent chez cette dernière. On y trouve des ORFs correspondant notamment à :

- des protéines hypothétiques,
- un régulateur de transcription,
- deux régulateurs de transcription flagellaires (*flhD* et *flhC*) distincts de *flhD*₁*C*₁ du système Flag-1 d'*E. amylovora* (*flhC* étant homologue à *flhC*₂ du Flag-2 d'*E. amylovora*),
- 2 gènes de synthèse du système AI-1 (*expR* et *expI*),
- 2 gènes du métabolisme du sucrose,
- une transposase et une phage intégrase.

Ces ORFs sont groupées sur environ 29 kb.

Il semble donc que le système Flag-1, tel qu'il est connu chez la bactérie modèle *E. coli*, est présent chez toutes les *Erwinia* testées, mais absent ou divergent chez *E. billingiae*. Le système Flag-2 complet, décrit chez *E. coli* 042, *Citrobacter*, *Chromobacterium* et *Yersinia* (Ren *et al.*, 2005), semble n'être présent que chez *Erwinia amylovora* et *pyrifoliae*, qui sont les deux espèces pathogènes parmi celles que nous avons testé.

3.4 ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES PRESENTS DANS LES CLUSTERS DES 2 SYSTEMES EN MILIEU HRP-INDUCTEUR CHEZ LES DIFFERENTS MUTANTS

Nous avons cherché à savoir à quel niveau HrpL exerce une régulation négative sur les gènes du système Flag-1 d'*E. amylovora* et si l'expression des gènes du système Flag-2 varie chez les mutants de régulation comparée à la souche sauvage. Pour cela, nous avons comparé les expressions de gènes flagellaires appartenant à différentes classes d'expression (E : Early, M : Middle ou L : Late ; cf figure I.6), dans les deux systèmes Flag-1 et Flag-2, chez la souche sauvage cultivée pendant 16 heures en milieux M9 gal et M9 glu. Nous avons

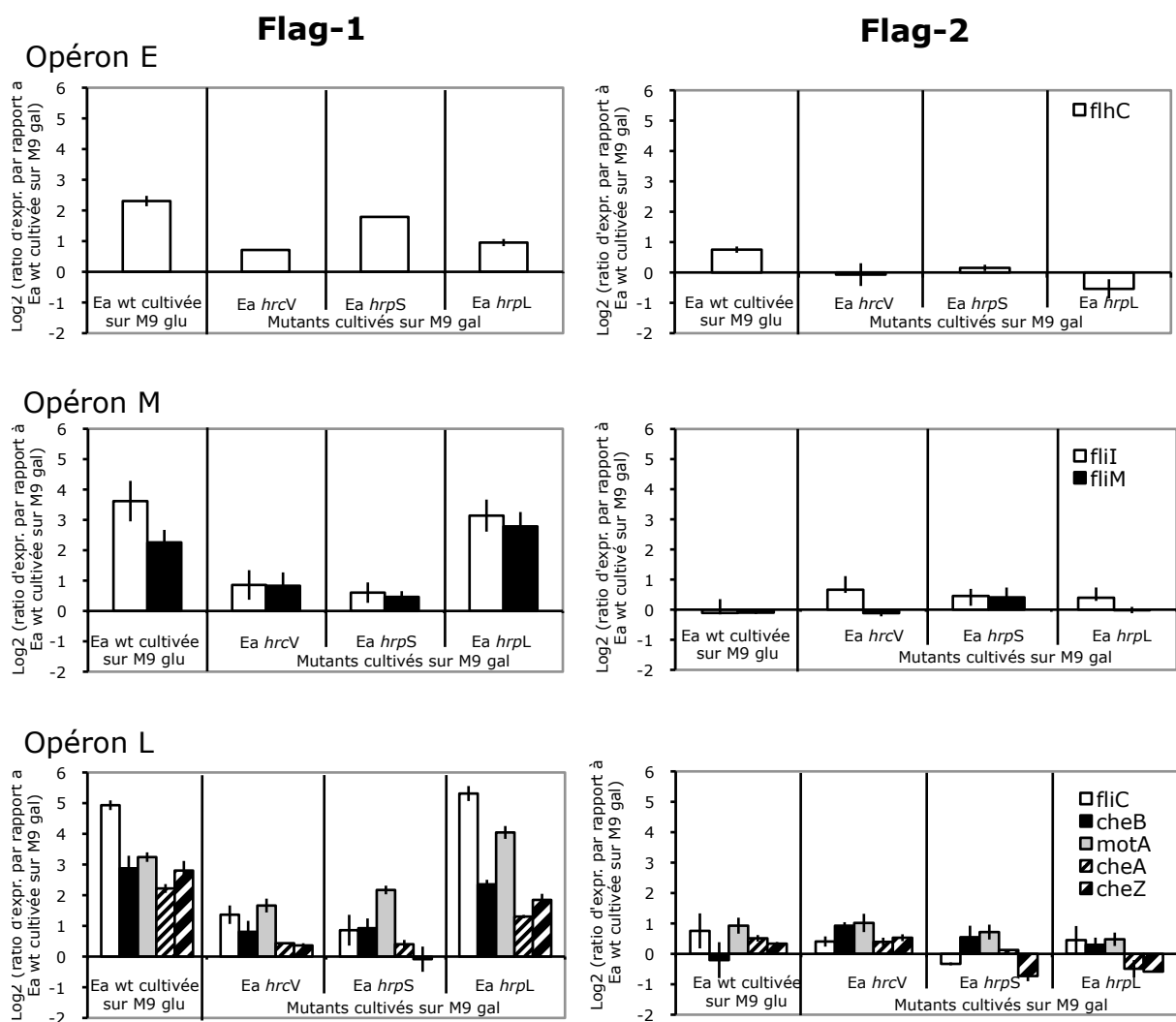


Figure 3.23 : Expression des gènes des deux systèmes flagellaires chez Ea wt cultivée sur M9 glu et les mutants Ea *hrcV*, Ea *hrpS* et Ea *hrpL* cultivés sur M9 gal, par rapport à Ea wt cultivée sur M9 gal. Les barres d'histogrammes représentent les moyennes de deux répétitions biologiques et les extrémités des traits verticaux, les valeurs des deux répétitions

également comparé les expressions des différents gènes flagellaires chez les mutants *hrp* de sécrétion et de régulation après 16 heures de culture en milieu M9 gal. Deux répétitions biologiques pour chacune des cultures a été réalisée.

Nous avons constaté que chez la souche sauvage, tous les gènes choisis pour représenter le système Flag-1 sont plus fortement exprimés sur M9 glu que sur M9 gal (figure 3.23). Le gène de la flagelline FliC1 est le plus fortement exprimé avec un \log_2 du ratio d'expression égal à 5. De même, la plupart des gènes des classes M et L représentant le système Flag-1 sont nettement surexprimés chez le mutant *Ea hrpL* en milieu M9 gal (figure 3.23). *flhC1* (classe E) est également surexprimé mais le \log_2 de son ratio d'expression est plus faible que celui des autres gènes puisqu'il est compris entre 1,5 et 2.

En revanche, les gènes représentant le système Flag-2 ne sont pas différentiellement exprimés (figure 3.23) chez la souche sauvage selon le milieu, avec un \log_2 du ratio d'expression compris entre 0 et 1 et l'expression des gènes des 3 classes représentant le système Flag-2, est peu variable (figure 3.23) chez les mutants comparés à la souche sauvage cultivés en milieu M9 gal.

3.5 DISCUSSION

La disponibilité de la séquence du chromosome d'*E. amylovora Ea 273* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_amylovora/) nous a permis de comparer les gènes flagellaires d'*E. amylovora* avec ceux de *S. enterica* ou *E. coli*. Nous avons alors constaté qu'*E. amylovora* possède non pas un mais deux systèmes flagellaires.

Deux systèmes flagellaires chez *E. amylovora*

Les microorganismes modèles de biosynthèse, d'assemblage et de régulation flagellaires pour les gamma-protéobactéries sont *S. enterica* serovar *typhimurium* et *E. coli*. Il est admis que la génétique et la physiologie de leur système flagellaire forment un modèle général pour les gamma-protéobactéries. Les gènes sont organisés en plusieurs clusters sur le chromosome et codent des flagelles latéraux. Chez *E. amylovora*, les gènes d'un premier système flagellaire, que nous avons appelé Flag-1, ont une organisation qui correspond au modèle général avec quatre clusters. Le second système flagellaire d'*E. amylovora* (Flag-2) présente par contre la particularité d'avoir ses gènes réunis sur un seul cluster. Un tel cluster de gènes flagellaires a déjà été identifié dans quelques génomes tels ceux de *Yersinia*, *Chromobacterium violaceum* ou *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2002 ; Ren *et al.*, 2005, Bresolin *et al.*, 2008). C'est la première fois avec *E. amylovora* que deux systèmes flagellaires sont repérés chez une bactérie phytopathogène.

Il existe dans le phylum des protéobactéries, des bactéries comme *Vibrio* sp. qui utilisent deux types de systèmes flagellaires pour la mobilité, l'un polaire pour les déplacements en milieu liquide et l'autre latéral pour les déplacements sur des surfaces (Atsumi *et al.*, 1996 ; Mac Carter, 2004). L'énergie du moteur n'est pas la même pour les deux systèmes et est dûe à un flux de protons pour les flagelles latéraux, et à un flux d'ions sodium pour le flagelle polaire. Les protéines du moteur sont propres à l'énergie utilisée : MotA et MotB pour le flux de protons, MotX et MotY pour le flux d'ions sodium. Chez *E. amylovora*, il semble que les deux systèmes flagellaires coexistants correspondent à des flagelles latéraux puisque des protéines homologues à MotA et MotB sont présentes dans chaque système. Cette coexistence d'un double système latéral chez *E. amylovora* au lieu de la combinaison plus fréquente système polaire-système latéral, a également été décrite chez *E. coli* 042 (Ren *et al.*, 2005). Chez cette dernière espèce, le système que ces auteurs ont appelé Flag-2 (et similaire au deuxième système flagellaire d'*E. amylovora* que nous avons donc aussi appelé Flag-2) est présent chez environ 20% des souches. Chez *E. amylovora*, Flag-2 est présent chez 100 % des

souches testées. Le fait que les gènes composant ce second système soient regroupés sur un cluster unique, chez plusieurs protéobactéries, suggère que ce locus pourrait avoir été acquis par transfert horizontal chez leur ancêtre commun.

Quelle est l'utilité de deux systèmes flagellaires coexistants?

Nous avons montré que le système Flag-1 s'exprime chez *E. amylovora* et qu'il est réprimé en conditions *hrp*-inductrices. C'est ce système qui confère la mobilité à cette bactérie puisqu'un mutant *Ea fliH* affecté dans la sécrétion de la flagelline du système Flag-1 n'est plus mobile en milieu M9 gal ou M9 glu. Cependant, il est possible que le système Flag-2 ait un rôle de complémentarité de la locomotion bactérienne dans des conditions environnementales particulières. Certaines bactéries disposent d'un autre système flagellaire pour les déplacements en milieux visqueux (swarming) (Harshey, 2003) comme plusieurs *Vibrio* (Mc Carter, 2004). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de swarming sur ce type de milieu chez *E. amylovora* (résultats non montrés), ni chez la souche sauvage, ni chez le mutant *Ea fliH*. Toutefois, il est possible que nous n'ayons pas trouvé les conditions optimales de test. Les analyses d'expression par RT-qPCR démontrent la présence de transcrits pour les 3 classes de gènes, mais ce système peut ne pas être correctement assemblé et donc non fonctionnel.

A l'aide du mutant *fliH* de Flag-1 non mobile, nous avons montré que la mobilité due au système Flag-1 est impliquée dans l'agressivité. D'autres pathogènes de plantes comme *R. solanacearum* ont besoin de la mobilité pour envahir les plantes (Tans-Kersten *et al.*, 2001). La mobilité est généralement nécessaire au tout début de l'infection, c'est-à-dire pour atteindre les sites d'infection. Les flagelles peuvent être impliqués aussi dans l'adhérence (Josenhans et Suerbaum, 2002). On peut ainsi penser que le système Flag-2 a plutôt un rôle dans la colonisation et l'adhésion chez l'hôte par homologie avec ce que l'on connaît de l'interaction entre cellules bactériennes chez d'autres pathogènes comme chez *Vibrio parahaemolyticus* ou *Aeromonas* (Belas et Colwell, 1982 ; Gavin *et al.*, 2002). Posséder plusieurs types de flagelles peut aider à la survie dans des niches écologiques particulières ou dans l'hôte. Il serait intéressant de construire des mutants dans des gènes du système Flag-2 afin d'analyser le rôle de Flag-2 dans le pouvoir pathogène.

Les flagellines d'*E. amylovora* en tant que MAMPs

Le gène de la flagelline du système Flag-1 code une protéine que nous avons appelé FliC1, dont la taille attendue est de 29,6 KDa mais dont la taille observée sur gel SDS-PAGE est d'environ 32 KDa. Il est probable que cette différence soit due à des modifications post-traductionnelles comme une glycosylation. Chez *P. syringae* pv *glycinea*, la glycosylation de la flagelline joue un rôle dans la spécificité d'hôtes (Taguchi *et al.*, 2003). Nous n'avons pas observé de variation de taille de FliC1 entre les différents mutants et la souche sauvage cultivés sur milieux M9 gal et M9 glu. Le gène de la flagelline du système Flag-2 code une protéine que nous avons appelé FliC2, dont la taille attendue est de 49,5 KDa. Nous avons montré que FliC2 possède un motif très proche de Flg22, capable d'induire des réactions de défense basale (Zipfel *et al.*, 2004) via sa reconnaissance par FLS2 (Chinchilla *et al.*, 2006) alors que FliC1 possède un épitope modifié. Certaines espèces pathogènes d'animaux produisent une flagelline qui n'élucite pas les défenses de l'hôte (Lee *et al.*, 2003 ; Gewirtz *et al.*, 2004 ; Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Les flagellines d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Ralstonia solanacearum* divergent dans un nombre suffisant de résidus au niveau de l'épitope Flg22, pour que les peptides synthétisés sur la base des séquences des flagellines de ces espèces n'élucitent pas les réactions de défense des plantes (Felix *et al.*, 1999 ; Pfund *et al.*, 2004). Chez *X. campestris* pv *campestris*, Sun et ses collaborateurs (2006) ont mis en évidence un polymorphisme de séquence pour la flagelline

de différentes souches. La comparaison des séquences de flagelline pour différentes souches montre qu'il existe 2 clades pour les produits du gène *fliC* corrélés à 2 classes phénotypiques d'activité élicitrice de la flagelline. Les auteurs démontrent que ce polymorphisme de séquence est impliqué dans la variation d'activité élicitrice de la flagelline, qu'il est situé dans le domaine Flg22 et que le polymorphisme d'un seul acide aminé (D, aspartate) (figure 3.20) est critique pour l'activité d'élicitation. Si cet acide aminé est remplacé par E (glutamate) ou V (valine) par exemple, la capacité d'élicitation de la flagelline chez *X. campestris* est altérée (Sun *et al.*, 2006). Or, dans la séquence de la flagelline FliC1 d'*E. amylovora*, on trouve aussi un polymorphisme au niveau de cet acide aminé (D dans FliC2 et E dans FliC1). De plus la séquence N-terminale de FliC1 reste très différente de Flg22, ce qui suggère que FliC1 peut ne pas être perçue de la même façon que FliC2 par le Pommier, voire non reconnue. Il serait intéressant de comparer les capacités d'élicitation des défenses du Pommier de chacune de ces flagellines ou de leur épitope correspondant à Flg22. L'utilisation d'un double mutant *fliH1-hrpL* a montré que la flagelline FliC1 n'a pas un rôle majeur dans la protection par le mutant *Ea hrpL*. Il est donc possible qu'*E. amylovora* ait évolué afin que la flagelline qu'elle exprime ne soit pas reconnue par le pommier et n'active pas les défenses non spécifiques de l'hôte.

Flag-2 est-il fonctionnel chez *E. amylovora* ?

Le système Flag-2 est fonctionnel chez *Yersinia enterocolitica* à basse température (15 à 20°C) (Bresolin *et al.*, 2008). Chez *E. coli* 042 et chez *Y. pestis*, il ne le serait pas du fait de mutations ou délétions dans des gènes clés. Chez *E. amylovora*, les systèmes Flag-1 et Flag-2 possèdent leurs propres gènes de régulation avec le master regulator *flhDC*, la combinaison de facteurs sigma/antisigma (FliA et FlgM), ainsi que leurs propres gènes de chimiotactisme, ce qui n'est pas le cas chez *E. coli* 042 ou chez *Y. pestis* (Ren *et al.*, 2005). Dans le cluster Flag-2, nous avons constaté que la majorité des gènes requis pour un système flagellaire fonctionnel est présente. Ces gènes ne semblent pas avoir de délétion ou de mutations en comparaison des gènes flagellaires d'autres génomes. Il manque toutefois dans Flag-2 trois gènes flagellaires par rapport à Flag-1 : un régulateur positif du système flagellaire (*fliZ₂*) et deux gènes impliqués dans le chimiotactisme. Seul *fliZ₂* pourrait avoir un impact sur l'expression du système Flag-2. Il a été démontré que chez *S. enterica* sv *typhimurium*, la mutation de *fliZ* entraîne une diminution de la quantité de flagelline sécrétée (Kutsukake *et al.*, 1999 ; Iyoda *et al.*, 2001). Chez *Xenorhabdus nematophila*, FliZ est également un régulateur positif du système flagellaire (Lanois *et al.*, 2008). S'il s'avère que le système Flag-2 est bien fonctionnel, cela porterait le nombre de systèmes de sécrétion de type III chez *E. amylovora* à quatre (2 T3SS flagellaires et 2 T3SS liés à des interactions). Si ce système n'est pas fonctionnel, il peut malgré tout exercer un effet sur d'autres T3SS fonctionnels comme cela a été démontré chez *E. coli* : c'est l'effet (négatif) « Cheshire cat » (Zhang *et al.*, 2004), dont le mécanisme n'est pas connu. Il est donc possible que même non fonctionnel, Flag-2 ait un effet régulateur sur l'un ou l'autre des T3SS d'*E. amylovora*. Chez *Yersinia*, le système flagellaire est même utilisé comme système de sécrétion pour un facteur de virulence (Young *et al.*, 1999). Par ailleurs, FlhD et FlhC interviennent aussi dans la régulation de gènes non flagellaires, liés au métabolisme ou à la division cellulaire (Stafford *et al.*, 2005 ; Kapatral *et al.*, 2004). Il serait intéressant d'essayer de déterminer les conditions d'expression de ce système ou de créer des mutants dans les gènes de régulation de ce second système, afin d'en discerner le rôle. La présence d'un cluster incomplet ou l'absence de ce cluster chez les *Erwinia* épiphytes est en effet troublante et suggère indirectement un rôle possible dans la virulence. Sa présence chez les autres *Erwinia* pathogènes devra être vérifiée.

Régulation négative du système Flag-1 par HrpL

Nous avons démontré que HrpL exerce une régulation négative sur toutes les classes d'expression des gènes du système flagellaire Flag-1 d'*E. amylovora* cultivée en milieu *hrp*-inducteur. En revanche, une mutation *hrpS* n'a pas d'effet sur l'expression du système flagellaire d'*E. amylovora*, bien que *hrpL* soit partiellement régulé par HrpS. Etant donné qu'un mutant *hrpS*, non pathogène, est capable de produire HrpL en petite quantité (Wei *et al.*, 2000), on peut penser que ce « bruit de fond » est suffisant pour exercer une régulation négative sur le système flagellaire en milieu *hrp*-inducteur, mais insuffisant pour exercer une régulation positive sur un système complexe tel que le T3SS. Les mécanismes décrits concernant une régulation opposée entre système flagellaire et système de virulence, impliquent souvent des régulateurs globaux comme PrfA chez *L. monocytogenes* (Michel *et al.*, 1998) ou PhcA chez *R. solanacearum* (Clough *et al.*, 1997). Ils peuvent aussi impliquer des régulateurs proches du haut de la cascade de régulation des deux systèmes. C'est le cas de SirA chez *S. enterica* ou *E. coli* (Goodier et Ahmer, 2001) ou de FlhDC chez *Y. enterocolitica* (Bleves *et al.*, 2002). Une étude plus récente indique une régulation négative indirecte d'opérons de virulence par FliA (facteur σ codé par un gène flagellaire de classe M) chez *Y. enterocolitica* (Horne et Prüss, 2006). Notre étude met en évidence pour la première fois une régulation négative inverse, c'est-à-dire une régulation négative du système flagellaire par un facteur σ alternatif situé en bas de la cascade de régulation du T3SS. Le mécanisme de cette régulation reste à déterminer. Elle peut être indirecte via le contrôle de l'expression d'un régulateur négatif du système flagellaire ou directe par antagonisme de facteurs sigma tel qu'il est décrit chez les pathogènes d'animaux (Boucher *et al.*, 2000). Ce dernier mécanisme intervient s'il y a, dans les séquences promotrices des gènes régulés négativement, un site de fixation incomplet du facteur sigma en question. Ce dernier peut alors se fixer, sans pour autant autoriser la transcription, empêcher la fixation du véritable facteur sigma spécifique de ce gène et donc l'activation de sa transcription. Dans notre cas, nous avons repéré la présence de la première partie seulement de la boîte *hrp* d'*E. amylovora* (GGAACC) dans la séquence du promoteur de l'opéron *flhDC*, ce qui suggère effectivement une régulation négative par antagonisme de facteurs sigma. Cependant, la région du promoteur de *flhDC* est très complexe : ainsi chez *S. typhimurium*, il existe plusieurs sites de régulation transcriptionnelle (Yanagihara *et al.*, 1999). De même, chez *E. coli*, l'expression de l'opéron *flhDC* est activée par plusieurs protéines de régulation dont H-NS (elle-même sensible à de nombreux signaux environnementaux), AMP cyclique (cAMP)-cAMP receptor protein (CRP) et CsrA (Soutourina et Bertin, 2003). Par conséquent, c'est l'expérimentation (par la technique du gel retard par exemple) qui pourrait permettre de déterminer si le mécanisme de la régulation négative du système flagellaire par HrpL est bien direct chez *E. amylovora*.

En ce qui concerne le mécanisme de la protection obtenue avec le mutant *Ea hrpL*, on peut supposer que la surexpression de gènes de régulation flagellaire tel *flhD₁C₁* et peut-être aussi de *fliA* ou de *fliZ*, entraîne une variation d'expression de gènes non flagellaires qui, eux, interviendraient dans la protection. En effet, les gènes de régulation flagellaire peuvent être impliqués chez d'autres bactéries (Kapatral *et al.*, 2004) dans la régulation de gènes liés par exemple au métabolisme. Il faudra construire des mutants de régulation du système Flag-1, en combinaison avec une mutation au niveau de *hrpL*, ainsi que des mutants du système flagellaire Flag-2 (dans les gènes de régulation ou de la flagelline...) afin de tester leur capacité à protéger contre la maladie. Enfin, le rôle éventuel de ce second système flagellaire dans l'agressivité d'*E. amylovora* mérite d'être étudié.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, il nous paraît souhaitable de souligner trois points, d'ordres différents, permettant de le replacer dans le cadre plus général de l'activité du laboratoire, qui est l'étude de l'interaction plante-bactérie.

Le choix du matériel biologique est crucial dans les études d'interactions

Cela s'applique à chacun des partenaires plante et bactérie. Nos résultats ont montré que, quel que soit le matériel utilisé, végétal (plantules de Pommier) ou bactérien (cultures *in vitro*), et la méthode, il n'est pas facile de recréer des conditions mimant les conditions naturelles dans lesquelles se déroule l'interaction. Les plantules de Pommier par exemple, qui présentent le double avantage, pour cette plante à cycle long, d'être disponibles toute l'année et d'être facilement manipulables grâce à leur petite taille, présentent néanmoins l'inconvénient d'être une population hétérogène. Cette hétérogénéité entraîne une variabilité des réponses au pathogène, qui peut être gênante dans le cadre d'une étude des réactions de défense de la plante. De même, on met en évidence une variabilité des taux d'infection selon la méthode d'inoculation utilisée. Autre problème pour les études d'expression de gènes chez la bactérie : les milieux de culture mimant les conditions rencontrées par la bactérie dans l'apoplasme sont probablement assez éloignés des conditions naturelles et conduisent à des niveaux d'expression des gènes peut-être bien inférieurs à ceux rencontrés dans la plante au cours de l'interaction. Le choix du biotest est donc critique pour l'étude des expressions de gènes chez le Pommier et chez *E. amylovora*. L'utilisation de clones de Pommier pour l'étude de réactions de défenses de la plante lors de l'interaction, et l'étude *in planta* des gènes bactériens induits lors de la confrontation *E. amylovora* / Pommier seraient adaptés pour la compréhension des mécanismes mis en jeu.

Un fait expérimental simple et facile à mettre en évidence peut reposer sur des mécanismes très complexes

L'origine de la capacité des mutants *hrp* de régulation d'*E. amylovora* à moduler la compatibilité de l'interaction est sans doute multifactorielle et probablement distincte entre les mutants *Ea hrpS* et *Ea hrpL*. L'aptitude de ces mutants à protéger contre la maladie n'est pas due à un antagonisme direct entre les mutants *hrp* de régulation et la souche sauvage. Une des hypothèses avancées est l'existence d'un antagonisme entre les mutants et la souche sauvage par compétition pour les sites d'infection puisque la souche pathogène et son mutant *Ea hrpL* sont localisées dans des zones différentes des tissus de feuilles de Pommier (Faize *et al.*, 2006). Nos analyses d'expression de gènes bactériens (avec *a priori* et par cDNA-AFLP) renforcent cette hypothèse puisque nous montrons que plusieurs gènes liés à des fonctions extracellulaires et potentiellement impliqués dans l'adhésion (gènes flagellaires, gènes du chimiotactisme, gènes de protéines de membrane, gènes de sécrétion) sont différentiellement exprimés chez l'un ou l'autre des mutants de régulation, ou dans les milieux *hrp* ou non *hrp*-inducteurs.

Il n'y a pas d'induction particulière de défenses systémiques SA-, JA- et ET-dépendantes en condition de protection. On peut envisager que la protection implique des réactions de défense locales ou transitoires (non mises en évidence avec les gènes que nous

avons choisis) ou qu'elle ne soit pas de nature protéique. Dans les deux hypothèses, des analyses complémentaires sont nécessaires soit au niveau de gènes impliqués par exemple dans des événements précoces après la détection d'un pathogène, soit au niveau de la production de formes actives d'oxygène. Nous avons également mis en évidence que la capacité des mutants de régulation à protéger contre la maladie est de courte durée et qu'elle n'existe que pour des mutants actifs métaboliquement. Ceci pourrait être dû au fait que les mutants de régulation ont besoin de la souche sauvage pour être actifs, parce qu'elle crée un environnement qui leur est favorable.

De nombreux facteurs de l'interaction *E. amylovora*/ Pommier sont encore insoupçonnés même chez la bactérie

En effet au cours de nos investigations sur les facteurs bactériens impliqués, nous avons pu mettre en évidence deux traits majeurs ignorés jusque là chez cette bactérie, en dépit des recherches intenses dont elle fait l'objet.

- La mobilité flagellaire est négativement régulée par HrpL en conditions *hrp*-inductrices. Ces résultats ont été valorisés par une publication (Cesbron *et al.*, 2006). Il reste à déterminer le mécanisme de cette régulation négative exercée par HrpL sur les gènes flagellaires. Nous faisons l'hypothèse que la surexpression des gènes flagellaires chez *Ea hrpL* a une incidence sur l'expression d'autres gènes qui eux seraient impliqués dans la protection. La construction d'un double mutant de régulation flagellaire et *hrp* pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. L'analyse bioinformatique des gènes flagellaires, réalisée sur la séquence chromosomique non encore annotée d'*E. amylovora*, a aussi révélé l'existence intrigante d'un second système flagellaire chez cette bactérie. C'est, à notre connaissance, la première description de l'existence d'un second système flagellaire chez une bactérie phytopathogène. Chaque système flagellaire possède l'ensemble des gènes nécessaires à son expression et en particulier son propre gène de flagelline. Nous avons montré que la flagelline de 32 KDa, négativement régulée par HrpL, et qui ne possède pas l'épitope Flg22 impliqué dans l'immunité des plantes, n'est pas le facteur principal impliqué dans la protection. En revanche, la flagelline du second système porte un épitope proche de Flg22 et pourrait donc être impliquée dans l'induction de défenses non spécifiques chez le Pommier. La construction d'un double mutant *Ea hrpL-fliC₂* permettra d'étayer cette supposition. Nous envisageons par ailleurs d'explorer les conditions d'expression du second système flagellaire en fonction de différents facteurs environnementaux comme la température par exemple, par qRT-PCR. La construction de mutants de régulation de ce second système flagellaire pourrait nous permettre d'analyser son rôle dans le pouvoir pathogène puisque ce système ne semble être présent que chez des *Erwinia* pathogènes.
- Si notre travail ne permet pas de répondre entièrement sur l'origine de la protection assurée par les mutants de régulation, il met en évidence que les deux régulateurs positifs du système Hrp d'*E. amylovora* sont impliqués dans des mécanismes différents et qu'ils sont capables de réguler positivement ou négativement, d'autres gènes *hrp*-indépendants (ce qui n'a jamais été décrit précédemment chez cette bactérie) :
 - gènes d'autres systèmes de sécrétion [T1SS (*tolC*), GSP (*secA*), ompW],
 - gènes flagellaires du système Flag-1 (T3SS flagellaire),
 - gènes du chimiotactisme lié au système Flag-1,
 - gènes de régulation de deux systèmes du quorum sensing,
 - gène potentiellement impliqué dans la synthèse d'éthylène bactérien.

Cette étude montre la complexité des réseaux de signalisation chez les bactéries et donne de nouvelles pistes de recherche dans l'étude de l'interaction *E. amylovora* / Pommier comme la synthèse d'éthylène chez la bactérie ou le quorum sensing. C'est en effet sur la compréhension des mécanismes de l'interaction et sur l'identification précise du rôle de chaque partenaire, bactérie et plante, que repose la conception de méthodes de lutte rationnelles contre le Feu Bactérien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbiss JS (1986) Competitive growth of Salmonella in buffered peptone water at 37°C. *Leatherhead Food Res Ass* N°537
- Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J* 22:60-69
- Abramovitch RB, Martin GB (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 7:356-364
- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:601-611
- Adam AL, Pike S, Hoyos ME, Stone JM, Walker JC, Novacky A (1997) Rapid and Transient Activation of a Myelin Basic Protein Kinase in Tobacco Leaves Treated with Harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 115:853-861
- Aizawa SI, Harwood CS, Kadner RJ (2000) Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J Bacteriol* 182:1459-1471
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801
- 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 J* 19:2304-2314
- Aldridge P, Karlinsey JE, Becker E, Chevance FF, Hughes KT (2006) Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm. *Mol Microbiol* 60:630-643
- Alfano JR and Collmer A (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 179:5655-5662
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9247-9252
- Arlat M, Van Gijsegem F, Huet JC, Pernollet 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 J* 13:543-553
- Armitage JP (1999) Bacterial tactic responses. *Adv Microb Physiol* 41:229-289
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-983
- Atsumi T, Maekawa Y, Yamada T, Kawagishi I, Imae Y, Homma M (1996) Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* 178:5024-5026
- Ausubel FM, Brent R, Jignston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) In : *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995) In : *Short Protocols in molecular Biology*. Wiley J & Sons, New York
- Bae W, Xia B, Inouye M, Severinov K (2000) *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7784-7789
- Baker MD, Wolanin PM, Stock JB (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* 28:9-22
- Bardy SL, NG SYM, Jarrell KF (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149:295-304
- Barny MA (1995) *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur J Plant Pathol* 101:333-340
- Barny MA, Guinebretière MH, Marçais B, Coissac E, Paulin JP, Laurent J (1990) Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *J Biol Chem* 265:777-786
- Barionovi D, Giorgi S, Stoeger AR, Ruppitsch W, Scortichini M (2006) Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *J Appl Microbiol* 100:1084-1094
- Bauer Z, Gómez-Gómez L, Boller T, Felix G (2001) Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. *J Biol Chem* 276:45669-45676
- Bayot RG and Ries SM (1986) Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* 76:441-445
- Bedini E, De Castro C, Erbs G, Mangoni L, Dow JM, Newman NA, Parrilli M, Unverzagt C (2005) Structure-dependent modulation of a pathogen response in plants by synthetic O-antigen polysaccharides. *J Amer Chem Soc* 127:2414-2416

- Belas MR et Colwell RR (1982) Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *J Bacteriol* 151:1568-1580
- Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 7:391-399
- Bennett JC, Thomas J, Fraser GM, Hughes C (2001) Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol Microbiol* 39:781-791
- Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* 6:1198-1214
- Bernhard F, Coplin DL, Geider K (1993) A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. *Mol Gen Genet* 239:158-168
- Bereswill S, Bugert P, Bruchmüller I, Geider K (1995) Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 61: 2636-2642
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 29:23-32
- Blair DF (1995) How bacteria sense and swim. *Annu Rev Microbiol* 49:489-522
- Blair DF (2003) Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 545:86-95
- Blechert S, Brodschelm W, Hölder S, Kammerer L, Kutchan TM, Mueller MJ, Xia ZQ, Zenk MH (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4099-4105
- Bleves S, Marenne MN, Detry G, Cornelis GR (2002) Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* *yop* regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J Bacteriol* 184:3214-3223
- Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* 39:652-663
- Blocker A, Komoriya K, Aizawa S (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3027-3030
- Bocsanczy AM, Nissinen RM, Oh CS, Beer SV (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* 9:425-434
- Bogdanove AJ, Wei ZM, Zhao L, Beer SV (1996) *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of *yopN* of *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 178:1720-1730
- Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV (1998) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *J Bacteriol* 180:2244-2247
- Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88:416-421
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Beer SV, Aldwinckle HS (2006) Increased resistance to fire blight in apple plants by silencing DspE-interacting proteins. *Phytopathology* 96:S176
- Bostock RM (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol* 43:545-580
- Boucher JC, Schurr MJ, Deretic V (2000) Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. *Mol Microbiol* 36:341-351
- Boureau T, ElMaarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny MA (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* 19:16-24
- 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* 7:248-254
- Braun SG, Meyer A, Holst O, Puehler A, Niehaus K (2005) Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:674-681
- Bresolin G, Trček J, Scherer S, Fuchs TM (2008) Presence of a functional flagellar cluster Flag-2 and low-temperature expression of flagellar genes in *Yersinia enterocolitica* W22703. *Microbiology* 154:196-206
- Bretz JR, Mock NM, Charity JC, Zeyad S, Baker CJ, Hutcheson SW (2003) A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol Microbiol* 49:389-400
- Brisset MN and Paulin JP (1991) Relationships between electrolyte leakage from *Pyrus communis* and virulence of *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:443-453
- Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur J Plant Pathol* 106:529-536
- Brisset MN, Chartier R, Didelot F, Parisi L, Paulin JP, Robert P, Tharaud M, Lemarquand A, Orain G, Toubon JF, Brun L, Derridj S, Sauphanor B (2005) Inducteurs de défenses naturelles des plantes : Potentialités contre les bioagresseurs du pommier et du poirier. *Phytoma LDV* 581:20-24

- Brown IR, Mansfield JW, Taira S, Roine E, Romantschuk M (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv *tomato* across the host plant cell wall. *Mol Plant Microbe Interact* 14:394-404
- Buban T, Földes L, Kormany A, Hauptmann S, Stammler G, Rademacher W (2003) Prohexadione-Ca in apple trees: control of shoot growth and reduction of fire blight incidence in blossoms and shoots. *J Appl Botany* 77:95-102
- Bugert P and Geider K (1995) Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* 15:917-933
- Büttner D and Bonas U (2002) Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* 10:186-192
- Büttner D and Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* 9:193-200
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 184:2389-2398
- Carrillo CD, Taboada E, Nash JH, Lanthier P, Kelly J, Lau PC, Verhulp R, Mykytczuk O, Sy J, Findlay WA, Amoako K, Gomis S, Willson P, Austin JW, Potter A, Babiuk L, Allan B, Szymanski CM (2004) Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem* 279:20327-20338
- Cesbron S, Paulin JP, Tharaud M, Barny MA, Brisset MN (2006) The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiol Lett* 257:221-227
- Chilcott GS and Hughes KT (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:694-708
- 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
- Chiou CS and Jones AL (1991) The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 81:710-714
- Chiou CS and Jones AL (1993) Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 175:732-740
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814
- Clough SJ, Lee KE, Schell MA, Denny TP (1997) A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179:3639-3648
- Cohn JR and 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
- Cordes FS, Komoriya K, Larquet E, Yang S, Egelman EH, Blocker A, Lea SM (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 278:17103-17107
- Cornelis GR and Van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *54:735-774*
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4:811-825
- Coventry HS, Dubery IA (2001) Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins of *Nicotiana glauca*. *Physiol Mol Plant Pathol* 58:149-158
- Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:355-381
- Cui Y, Chatterjee A, Yang H, Chatterjee AK (2008) Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA (lrhA)* expression. *J Bacteriol* 190:4610-4623
- Czarny JC, Grichkok VP, Glick BR (2006) Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. *Biotechnol Adv* 24:410-419
- Dale C, Young SA, Haydon DT, Welburn SC (2001) The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1883-1888
- Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* 46:1041-1051
- Darsonval A, Darrasse A, Durand C, Bureau S, Cesbron S, Jacques MA (2008) Adhesion, fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *MPMI (ID MPMI-10-08-0200, accepté)*.
- Das M, Chopra AK, Cantu JM, Peterson JW (1998) Antisera to selected outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* protect against challenge with homologous and heterologous strains of *V. cholerae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22:303-308

- Davies AR, Blood RM, Gibbs PA (1991) Competitive growth in *Salmonella* pre-enrichment medium. *Leatherhead Food Res Ass* N°688
- DebRoy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K, He SY (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc natl Acad Sci USA* 101:9927-9932
- Defilippi BG, Kader AA, Dandekar AM (2005) Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Sci* 168:1199-1210
- Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 8:734-742
- Dellagi A, Birch PR, Heilbronn J, Lyon GD, Toth IK (2000) cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology* 146:165-171
- Deng W, Burland V, Plunkett G 3rd, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, Perna NT, Rose DJ, Mau B, Zhou S, Schwartz DC, Fetherston JD, Lindler LE, Brubaker RR, Plano GV, Straley SC, McDonough KA, Nilles ML, Matson JS, Blattner FR, Perry RD (2002) Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol* 184:4601-4611
- Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, Tsuyumu S, Yamane H, Kaku H, Minami E, Shibuya N (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol* 47:1530-1540
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8024-8029
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RM, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* 18:923-937
- D'Haese W, Holsters M (2004) Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol* 12:555-561
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J* 20:207-215
- Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38:241-261
- Dow JM, Osbourn AE, Wilson TJG, Daniels MJ (1995) A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:768-777
- Durrant WE and Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209
- Eichelberg K and Galán JE (2000) The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system. *Infect Immun* 68:2735-2743
- El-Maarouf H, Barny MA, Rona JP, Bouteau F (2001) Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* 497:92-84
- Epple P, Apel K, Bohlmann H (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109:813-820
- Espinosa A, Guo M, Tam VC, Fu ZQ, Alfano JR (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol* 49:377-387
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman MA, Cooper RM (2008) Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem Biol* 15:438-448
- 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
- Eulgem T (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* 10:71-78
- Expert D, Dellagi A, Kachadourian R (2000) Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamineE, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp179-195
- Faize M, Brisset MN, Paulin JP, Tharaud M (1999) Secretion and regulation *hrp* mutants of *Erwinia amylovora* trigger different responses in apple. *FEMS Microbiol Lett* 171:173-178
- Faize M, Brisset MN, Perino C, Vian B, Barny MA, Paulin JP, Tharaud M (2006) Protection of apple against fire blight induced by an *hrpL* mutant of *Erwinia amylovora*. *Biol Plantarum* 50:667-674
- Falkenstein H, Bellemann P, Walter S, Zeller W, Geider K (1988) Identification of *Erwinia amylovora*, the Fireblight Pathogen, by Colony Hybridization with DNA from Plasmid pEA29. *Appl Environ Microbiol* 54:2798-2802

- Falkenstein H, Zeller W, Geider K (1989) The 29 kb plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fireblight symptoms. *Microbiology* 135:2643-2650
- Farmer EE and Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7713-7716
- Felix G and Boller T (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem* 278:6201-6208
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, 18:265-276
- Feistner GJ, Stahl DC, Gabrik AH (1993) Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometry study. *Org Mass Spectrom* 28:163-175
- Ffrench-Constant RH, Waterfield N, Burland V, Perna NT, Daborn PJ, Bowen D, Blattner FR (2000) A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. *Appl Environ Microbiol* 66:3310-3329
- Fislage R, Berceanu M, Humboldt Y, Wendt M, Oberender H (1997) Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 25:1830-1835
- Foster GC, McGhee GC, Jones AL, Sundin GW (2004) Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 70:7539-7544
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296
- Fouts DE, Abramovitch RB, Alfano JR, Baldo AM, Buell CR, Cartinhour S, Chatterjee AK, D'Ascenzo M, Gwinn ML, Lazarowitz SG, Lin NC, Martin GB, Rehm AH, Schneider DJ, Van Dijk K, tang X, Collmer A (2002) Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2275-2280
- Frederick RD, Ahmad M, Majerczak DR, Arroyo-Rodríguez AS, Manulis S, Coplin DL (2001) Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* hrp gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1213-1222
- Freebairn HT and Buddenhagen IW (1964) Ethylene production by *Pseudomonas solanacearum*. *Nature* 202:313-314
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401
- Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Rella MG, Meier B, Dincher S, Staub T, Uknes S, Métraux JP, Kessmann H, Ryals J (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J* 10:61-71
- Fujii M, Shibata S, Aizawa S (2008) Polar, peritrichous, and lateral flagella belong to three distinguishable flagellar families. *J Mol Biol* 379:273-283
- Gao Y, Song J, Hu B, Zhang L, Liu Q, Liu F (2008) The *luxS* gene is involved in AI-2 production, pathogenicity and some phenotypes in *Erwinia amylovora*. *Curr Microbiol* (DOI 10.1007/s00284-008-9256-z)
- Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol* 26:1057-1069
- Gaudriault S, Brisset MN, Barny MA (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett* 428:224-228
- Gavín R, Rabaan AA, Merino S, Tomás JM, Gryllos I, Shaw JG (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol* 43:383-397
- Geider K, Auling G, Du Z, Jakovljevic V, Jock S, Völksch B (2006) *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2937-2943
- Geier G and Geider K (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42:387-404
- Gerber IB, Zeidler D, Durner J, Dubery IA (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* 218: 647-657
- Gerber IB, Laukens K, Witters E, Dubery IA (2006) Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Physiol Biochem* 44:360-379
- Gerlach RG and Hensel M (2007) Protein secretion systems and adhesins : the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297 : 401-415
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM Jr (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 189:1914-1920
- Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Gominet M, Lereclus D, Wong AC, Senesi S (2002) Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 184:6424-6433

- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205-227
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18:277-284
- Gómez-Gómez L and Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003-1011
- Gonzalez-Pedrajo B, Fraser GM, Minamino T, Macnab RM (2002) Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol Microbiol* 45:967-982
- Goodier RI and Ahmer BM (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 183:2249-2258
- Goodman RN (1967) Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* infection by avirulent strains and three other bacterial species. *Phytopathology* 57: 22-24
- Gopalan S, Bauer DW, Alfano JR, Loniello AO, He SY, Collmer A (1996) Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell* 8:1095-1105
- Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 72:2160-2169
- 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
- Guo H and Ecker JR (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* 7:40-49
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282:32338-32348
- Hacker J and Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-679
- Harlow E and Lane D (1988) In : Immunoblotting. CSHL Press, New York, pp 471-510
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57:249-273
- Hauck P, Thilmony R, He SY (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8577-8582
- He P, Shan L, Sheen J (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* 9:1385-1396
- Hensel M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294:95-102
- Hirsch J, Deslandes L, Feng DX, Balagué C, Marco Y (2002) Delayed symptom development in ein2-1, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 92:1142-1148
- Hoiczuk E and Blobel G (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4669-4674
- Hong H, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B (2006) The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem* 281:7568-7577
- Horne SM and Prüss BM (2006) Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch Microbiol* 185:115-126
- Hueck C (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433
- Hussain MB, Zhang HB, Xu JL, Liu Q, Jiang Z, Zhang LH (2008) The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*. *J Bacteriol* 190:1045-1053
- Innes RW, Bent AF, Kunkel BN, Bisgrove SR, Staskawicz BJ (1993) Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol* 175:4859-4869
- Iyoda S, Kamidoi T, Hirose K, Kutsukake K, Watanabe H (2001) A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microb Pathog* 30:81-90
- Jakovljevic V, Du Z, Jock S, Geider K (2006) Epiphytic *Erwinias* to control fire blight. *Acta Hort* 704:289-292
- Jameson JE (1962) A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J Hygiene* 60:193-207
- 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
- Janeway CA and Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216

- Jin Q, Hu W, Brown I, McGhee G, Hart P, Jones AL, He SY (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 40:1129-1139
- Jock S, Völkisch B, Mansvelt L, Geider K (2002) Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in south africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol Lett* 211:247-252
- Jones JD and Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329
- Jones CJ, Homma M, Macnab RM (1989) L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* 171:3890-3900
- Josenhans C and Suerbaum S (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*. 291:605-614
- Kachadourian R, Dellagi A, Laurent J, Bricard L, Kunesch G, Expert D (1996) Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *Biometals* 9:143-150
- Kang JH, Wang L, Giri A, Baldwin IT (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell* 18:3303-3320
- Kapatral V, Campbell JW, Minnich SA, Thomson NR, Matsumura P, Prüss BM (2004) Gene array analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiology* 150:2289-2300
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Prufer D (2001) Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6511-6515
- Kazemi-Pour N, Condemine G, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* 4:3177-3186
- Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ (2005) Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:527-543
- Kessler A and Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53:299-328
- Kim JF and Beer SV (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* 180:5203-5210
- Kim HS, Desveaux D, Singer AU, Patel P, Sondek J, Dangl JL (2005) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6496-6501
- Kimbrough TG and Miller SI (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11008-11013
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301-307
- Kingsley MT, Gabriel DW, Marlow GC, Roberts PD (1993) The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J Bacteriol* 175:5839-5850
- Kirov SM (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 224:151-159
- Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:299-300
- 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
- Komitopoulou E, Bainton NJ, Adams MR (2004) Oxidation-reduction potential regulates RpoS levels in *Salmonella Typhimurium*. *J Appl Microbiol* 96:271-278
- Komitopoulou E, Bainton NJ, Adams MR (2004) Premature *Salmonella Typhimurium* growth inhibition in competition with other Gram-negative organisms is redox potential regulated via RpoS induction. *J Appl Microbiol* 97:964-972
- Korber DR, Lawrence JR, Sutton B, Caldwell DE (1989) Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb Ecol* 18:1-19
- Kondoh H and Hotani H (1974) Flagellin from *Escherichia coli* K-12: polymerization and molecular weight in comparison with *Salmonella* flagellins. *Biochim Biophys Acta* 336:117-139
- Kube M, Migdoll AM, Müller I, Kuhl H, Beck A, Reinhardt R, Geider K (2008) The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ Microbiol* 10:2211-2222
- Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 226:433-446

- Kubori T, Yamaguchi S, Aizawa S (1997) Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J Bacteriol* 179:813-817
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280:602-605
- Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5:325-331
- Kunz W, Schurter R, Maetzke T (1997) The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pestici Sci* 50:275-282
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16:3496-3507
- Kutsukake K, Ikebe T, Yamamoto S (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet Syst* 74:287-292
- Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh HS, Collmer A (2007) Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J Bacteriol* 189:8059-8072
- Kwon C, Bednarek P, Schulze-Lefert (2008) Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiol* 147:1575-1583
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxydatibe burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251-275
- Lanois A, Jubelin G, Givaudan (2008) FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Mol Microbiol* 68:516-533
- Latour X, Diallo S, Chevalier S; Morin D, Smadja B, Burini JF, Haras D, Orange N (2007) Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl Environ Microbiol* 73:4078-4081
- Laurent J, Barny MA, Katoujansky A, Dufrique P, Vanneste JL (1989) Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 2:160-164
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* 5:1345-1356
- Lee SH and Galán JE (2004) *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* 51:483-495
- Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85:1021-1027
- Leister RT, Ausubel FM, Katagiri F (1996) Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15497-15502
- Li CM, Brown I, Mansfield J, Stevens C, Boureau T, Romantschuk M, Taira S (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J* 21:1909-1915
- Li J, Brader G, Palva ET (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16:319-331
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* 168:512-522
- Liu R and Ochman H (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. 104:7116-7121
- Llop P, Donat V, Rodriguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E, Lopez MM (2006) An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEa29. *Phytopathology* 96:900-907
- Loake G and Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence: the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10:466-472
- Lochman J and Mikes V (2006) Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Mol Biol* 62:43-51
- Lonetto M, Gribskov M, Gross CA (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174:3843-3849
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165-178
- Ma W, Dong FF, Stavrinides J, Guttman DS (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet* 2:e209

- MacCarter LL (2004) Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7:18-29
- MacGhee GC and Jones AL (2000) Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. *Appl Environ Microbiol* 66:4897-4907
- MacGhee GC, Schnabel EL, Maxson-Stein K, Jones B, Stromberg VK, Lacy GH, Jones AL (2002) Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 68:6182-6192
- Mackey D, Holt BF 3rd, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754
- MacManus PS and Jones AL (1994) Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84:627-633
- MacManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40:443-465
- Macnab (1996) Flagella and motility. In : Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington DC, pp123-145
- Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57:77-100
- Malnoy M, Faize M, Venisse JS, Geider K, Chevreau E (2005) Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Rep* 23:632-638
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY, Aldwinckle HS (2007) Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1568-1580
- Manulis S, Kleitman F, Shtienberg D, Shwartz H (2003) Changes in the sensitivity of *Erwinia amylovora* populations to streptomycin and oxolinic acid in Israel. *Plant Dis* 87:650-654
- Marenda M, Brito B, Callard D, Genin S, Barberis P, Boucher C, Arlat M (1998) PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* 27:437-453
- Martin RG, Rosner JL (2001) The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* 4:132-137
- Mauch-Mani B and Mauch F (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8:409-414
- Maxson-Stein K, He SY, Hammerschmidt R, Jones A (2002) Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Dis* 86:785-790
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969-980
- Meng X, Bonasera JM, Kim JF, Nissinen RM, Beer SV (2006) Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol Plant Microbe Interact* 19:53-61
- Merighi M, Majerczak DR, Stover EH, Coplin DL (2003) The HrpX/HrpY two-component system activates hrpS expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:238-248
- Mészáros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardóczy V, Teige M, Koncz C, Peck S, Bögre L (2006) The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J* 48:485-498
- Meyer A, Pühler A, Niehaus K (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213:214-222
- Meyer D, Cunnac S, Guéneron 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
- Meziane H, Van der Sluis I, Van Loon LC, Höfte M, Bakker PAHM (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol* 6:177-185
- Michel E, Mengaud J, Galsworthy S, Cossart P (1998) Characterization of a large motility gene cluster containing the *cheR*, *motAB* genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes. 169:341-347
- Miller J (1972) In : *Experiments in Molecular Genetics*. CSHL Press, New York, pp 352-355
- Minamino T and Macnab RM (2000) Interactions among components of the *Salmonella flagellar* export apparatus and its substrates. 35:1052-1064
- Minardi P (1995) Altered expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in tobacco leaves pretreated with bacterial protein-lipopolysaccharides. *J Phytopathol* 143:199-205
- Molina L, Rezzonico F, Défago G, Duffy B (2005) Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *J Bact* 187:3206-3213

- Moller WJ, Beutel JA, Reil WO, Zoller BG (1972) Fire blight resistance to streptomycin in California. *Phytopathology* 62:779 (abstract)
- Momol and Aldwinckle (2000) Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp55-72
- Moscatiello R, Mariani P, Sanders D, Maathuis FJ. (2006) Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J Exp Bot* 57:2847-2865
- Moss WP, Byrne JM, Campbell HL, Ji P, Bonas U, Jones JB, Wilson M (2007) Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Bio Control* 41:199-206
- Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E (1998) First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. *Trends Biotech* 16:203-210
- Mudgett MB (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56:509-531
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33:887-898
- Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ (2008) Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae? *J Mol Evol* 66:630-642
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312:436-439
- Newman MA, Daniels MJ, Dow JM (1997) The activity of lipid A and core components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:926-928
- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* 29:487-495
- Nissan G, Manulis S, Weinthal DM, Sessa G, Barash I (2005) Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative sigma-factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe Interact* 18:634-643
- Nissinen RM, Ytterberg AJ, Bogdanove AJ, Van Wijk KJ, Beer SV (2007) Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected *hrp* mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol Plant Pathol* 8:55-67
- Nizan-Koren R, Manulis S, Mor H, Iraki NM, Barash I (2003) The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:249-260
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 41:1271-1281
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumphlin N, Jones J, He SY (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313:220-223
- Ochiai K, Kurita-Ochiai T, Kamino Y, Ikeda T (1993) Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol* 39:183-190
- Oh CS and Beer (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* 253:185-192
- Oh CS, Kim JF, Beer SV (2005) The *hrp* pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Molec Plant Pathol* 6:125-138
- Palmer EL, Teviotdale BL, Jones AL (1997) A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 63:4604-4607
- Pasare C and Medzhitov R (2004) Toll-receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6:1382-1387
- Patten CL, Kirchhof MG, Schertzberg MR, Morton RA, Schellhorn HE (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* 272:580-591
- Paulin JP (1996) Control of fire blight in European pome fruits. *Outlook Agricu* 25:49-55
- Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeño-Tárraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413:523-527
- Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S,

- Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35:32-40
- Parsot C, Hamiaux C, Page AL (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6:7-14
- Pauw B and Memelink J (2005) Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regul* 23:200-210
- Peng JL, Dong HS, Dong HP, Delaney TP, Bonasera JM, Beer SV (2003) Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:317-326
- Petnicki-Ocwieja T, van Dijk K, Alfano JR (2005) The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *J Bacteriol* 187:649-663
- Pfund C, Tans-Kersten J, Dunning FM, Alonso JM, Ecker JR, Allen C, Bent AF (2004) Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 17:696-706
- Pils H, Smajs D, Braun V (1999) Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Bacteriol* 181:3578-3581
- Piper KR, Beck Von Bodman S, Hwang I, Farrand SK (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32:1077-1089
- Pitman AR, Jackson RW, Mansfield JW, Kaitell V, Thwaites R, Arnold DL (2005) Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. *Curr Biol* 15:2230-2235
- Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, Panopoulos NJ, Mansfield J, Pugsley AP, Karamanou S, Economou A (2003) Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem* 278:25816-25824
- Psallidas and Tsiantos (2000) Chemical control of fire blight. In: Vanneste J (ed) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp199-234
- Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:501-531
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700
- Ray TC, Smith AR, Wait R, Hignett RC (1987) Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Erwinia amylovora* T. *Eur J Biochem* 170:357-361
- Raymundo K, Ries SM (1980) Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 70:1066-1069
- Raymundo K, Ries SM (1981) Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 71:45-49
- Reboutier D, Frankart C, Briand J, Biligui B, Rona JP, Haapalainen M, Barny MA, Bouteau F (2007) Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* 120:3271-3278
- Reitz M, Rudolph K, Schroder I, Hoffmann-Hergarten S, Hallmann J, Sikora RA (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Appl Environ Microbiol* 66:3515-3518
- Ren YY, West CA (1992) Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol* 99:1169-1178
- Ren CP, Beatson SA, Parkhill J, Pallen MJ (2005) The Flag-2 locus, an ancestral gene cluster, is potentially associated with a novel flagellar system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:1430-1440
- Rezzonico F and Duffy B (2007) The role of luxS in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* is limited to metabolism and does not involve quorum sensing. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1284-1297
- Robatzek S (2007) Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell Microbiol* 9:1-8
- Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu SH, Boller T (2007) Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* 64:539-547
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20:537-542
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10:372-379
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiaho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY (1997) Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3459-3464
- Ron M and Avni A (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16:1604-1615

- Roemmelt S, Zimmermann N, Rademacher W, Treutter D (2003) Formation of novel flavonoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64:709-716
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 13:964-972
- Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* 38:828-838
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, New York.
- Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H (2003) Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* 52:403-408
- Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48:253-267
- Schiemann DA and Olson SA (1984) Antagonism by Gram-negative bacteria to growth of *Yersinia enterocolitica* in mixed cultures. *Appl Environ Microbiol* 48:539-544
- Schleif R (2000) Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends Genet* 16:559-565
- Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11638-11643
- 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
- Shao F (2008) Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Opin Microbiol* 11:21-29
- Sharp JK, Valent B, Albersheim P (1984) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J Biol Chem* 259:11312-11320
- Sherlock O, Vejborg RM, Klemm P (2005) The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* 73:1954-1963
- Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* 16:1220-1234
- Silipo A, Molinaro A, Sturiale L, Dow JM, Erbs G, Lanzetta R, Newman MA, Parrilli M (2005) The elicitation of plant innate immunity by lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J Biol Chem* 280:33660-33668
- Singh P, Piotrowski M, Kloppstech K, Gau AE (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudomonas species* from *Malus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environ Microbiol* 6:1149-1158
- Shtienberg D, Zilberstaine M, Oppenheim D, Herzog Z, Manulis S, Shwartz H, Kritzman G (2001) Efficacy of oxolinic acid and other bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in pear orchards in Israel. *Phytoparasitica* 29:143-154
- Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu XR, Krogfelt KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL (1998) Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8922-8926
- Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, Weerasekera R, Al Rashid S, Ward LA, Der SD, Chan VL (2004) FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* 53:541-553
- Soutourina OA and Bertin PN (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27:505-523
- Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, Bleves S (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:3124-3132
- Spinelli F, Speakman JB, Rademacher W, Halbwirth H, Stich K, Costa G (2005) Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* 112:133-142
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux 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
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18842-18847
- Stafford GP, Ogi T, Hughes C (2005) Binding and transcriptional activation of non-flagellar genes by the *Escherichia coli* flagellar master regulator FlhD2C2. *Microbiology* 151: 1779-1788
- Steinberger EM, Cheng GY, Beer SV (1990) Characterization of a 56-kb plasmid of *Erwinia amylovora* Ea322: its noninvolvement in pathogenicity. *Plasmid* 24:12-24

- Stepanova AN and Alonso JM (2005) Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiol Plant* 123:195-206
- Stevens C, Bennett MA, Athanassopoulos E, Tsiamis G, Taylor JD, Mansfield JW (1998) Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol Microbiol* 29:165-177
- Stock JB and Surette MG (1996) Chemotaxis. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli and Salmonella*. ASM Press, Washington DC, pp 1103-1129
- Sukhan A, Kubori T, Wilson J, Galán JE (2001) Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol* 183:1159-1167
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* 18:764-779
- Taguchi F, Shimizu R, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2003) Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol* 44:342-349
- Taira S, Tuimala J, Roine E, Nurmiaho-Lassila EL, Savilahti H, Romantschuk M (1999) Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol* 34:737-744
- Takeuchi K, Taguchi F, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *J Bacteriol* 185:6658-6665
- Tamano K, Aizawa S, Katayama E, Nonaka T, Imajoh-Ohmi S, Kuwae A, Nagai S, Sasakawa C (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* 19:3876-3887
- Tameling WIL and Takken FLW (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol* 121:243-255
- Tampakaki AP, Fadoulglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* 6:805-816
- Tang X, Xiao Y, Zhou JM (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1159-1166
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* 183:3597-3605
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15:317-330
- Tharaud M, Laurent J, Faize M, Paulin JP (1997) Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 143:625-632
- Thilmony R, Underwood W, He SY (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J* 46:34-53
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15107-15111
- Thomson SV (1986) The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* 76:476-482
- Thordal-Christensen H (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6:351-357
- Triplett LR, Zhao Y, Sundin GW (2006) Genetic differences between blight-causing *Erwinia* species with differing host specificities, identified by suppression subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* 72:7359-7364
- Troisfontaines P and Cornelis GR (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20:326-339
- Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A, Daire X (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 21:232-243
- Tsiantos J and Psallidas P (2002) The effect of inoculum concentration and time of application of various bactericides on the control of fire blight (*Erwinia amylovora*) under artificial inoculation. *Phytopathol Mediterr* 41:246-251
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F (2008) Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* 53:763-775
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14:153-164

- 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 den Ackerveken G, Marois E, Bonas U (1996) Recognition of the bacterial avirulence AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 87:1307-1316
- Van der Hoorn RAL, De Wit PJGM, Joosten MHJ (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* 7:67-71
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034
- Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-483
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162
- Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11:184-191
- Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Trijssenaar A, Van't Westende YAM, Hartog F, Van Loon LC (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:716-724
- 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
- Venisse JS, Barny MA, Paulin JP, Brisset MN (2003) Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Lett* 537:198-202
- Venturi V, Venuti C, Devescovi G, Lucchese C, Friscina A, Degrassi G, Aguilar C, Mazzucchi U (2004) The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules *in vitro* and *in planta*. *FEMS Microbiol Lett* 241:179-183
- Wadhams GH and Armitage JP (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:1024-1037
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308:1036-1040
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17:1784-1790
- Wang G, Ellendorf U, Kemp B, Mansfield JW, Forsyth A, Mitchell K, Bastas K, Liu CM, Woods-Tör A, Zipfel C, deWit PJ, Jones JD, Tör M, Thomma BP (2008) A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in *Arabidopsis*. 147:503-517
- Watt SA, Wilke A, Patschkovski T, Niehaus K (2005) Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* 5:153-167
- Weingart H and Volksch B (1997) Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in planta*. *Appl Environ Microbiol* 63:156-161
- Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV (1992) Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* 174:1875-1882
- 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
- Wei ZM and Beer SV (1995) HrpL activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* 177:6201-6210
- Wei Z, Kim JF, Beer SV (2000) Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1251-1262
- Weissman SJ, Moseley SL, Dykhuizen DE, Sokurenko EV (2003) Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria. *Trends Microbiol* 11:115-117
- Wichmann G, Ritchie D, Kousik CS, Bergelson J (2005) Reduced genetic variation occurs among genes of the highly clonal plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, including the effector gene *avrBs2*. *Appl Environ Microbiol* 71:2418-2432
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562-565
- Willis DK, Rich JJ, Hrabak EM (1991) *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:132-138
- Wilson M and Lindow SE (1993) Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83:117-123
- Wodzinski RS and Paulin JP (1994) Frequency and diversity of antibiotic production by putative *Erwinia herbicola* strains. *J Appl Microbiol* 76:603-607

- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Loyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) *Nucleic Acids Res* 17:3469-3478
- Wright SA, Zumoff CH, Schneider L, Beer SV (2001) *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl Environ Microbiol* 67:284-292
- Yanagihara S, Iyoda S, Ohnishi K, Iino T, Kutsukake K (1999) Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. *Genes Gent Syst* 74:105-111
- Yang SF and Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155-189
- Yang B, Sugio A, White FF (2005) Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18:142-149
- Yap MN, Yang CH, Barak JD, Jahn CE, Charkowski AO (2005) The *Erwinia chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior. *J Bacteriol* 187:639-648
- Young GM, Schmiel DH, Miller VL (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6456-6461
- Zeidler D, Zahring U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15811-15816
- 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
- Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol* 187:8088-8103
- Zhao Y, He SY, Sundin GW (2006) The *Erwinia amylovora* avrRpt2EA gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2EA is recognized by Arabidopsis RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 19:644-654
- Zhang L, Chaudhuri RR, Constantinidou C, Hobman JL, Patel MD, Jones AC, Sarti D, Roe AJ, Vlisidou I, Shaw RK, Falciani F, Stevens MP, Gally DL, Knutton S, Frankel G, Penn CW, Pallen MJ (2004) Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* 72:7282-7293
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125:749-760

LISTE DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Cesbron S, Paulin JP, Tharaud M, Barny MA, Brisset MN (2006) The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiol Lett* 257:221-227

Darsonval A, Darrasse A, Durand C, Bureau S, Cesbron S, Jacques MA (2008) Adhesion, fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp *fuscans*. *MPMI* (ID MPMI-10-08-0200, accepté).

COMMUNICATIONS ORALES FAISANT L'OBJET D'UNE PUBLICATION

Cesbron Sophie, Brisset Marie-Noëlle, Tharaud Michel, Paulin Jean-Pierre (2006). « HrpL negatively regulates flagellar system in *Erwinia amylovora* », XIe workshop on Fire Blight, Bologna, July 5-9, 2004. *Acta Horticulturae*, **704**: 479-480.

AUTRES COMMUNICATIONS ORALES

Cesbron Sophie, Brisset Marie-Noëlle, Tharaud Michel, Paulin Jean-Pierre (2004). « Le facteur sigma hrpL régule négativement la synthèse de flagelles chez *Erwinia amylovora*, 6èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 5-9 janvier 2004.

POSTERS

Brisset Marie-Noëlle, Cesbron Sophie, Pontais Isabelle, Barny Marie-Anne, Tharaud Michel, Paulin Jean-Pierre (2003). « Réponses moléculaires du pommier à l'infection par *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien », 3èmes Rencontres des Microbiologistes de l'INRA, Dourdan, 5-7 mai 2003.

Cesbron Sophie, Tharaud Michel, Paulin Jean-Pierre, Brisset Marie-Noëlle (2008). « Coexistence de deux systèmes flagellaires chez *Erwinia amylovora* ». 8èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 14-18 janvier 2008.

The alternative σ factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions

Sophie Cesbron¹, Jean-Pierre Paulin¹, Michel Tharaud¹, Marie-Anne Barny² & Marie-Noëlle Brisset¹

¹Université d'Angers, Beaucouzé, France; and ²Université Paris VI, Paris, France

Correspondence: Sophie Cesbron, UMR 077, INRA/INH/Université d'Angers, 42 rue Georges Morel, BP 60057, 49071 Beaucouzé cedex, France. Tel.: +3 324 122 5700; fax: +3 324 122 5705; e-mail: scesbron@angers.inra.fr

Received 8 December 2005; revised 18 January 2006; accepted 20 January 2006.
First published online 21 February 2006.

doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00172.x

Editor: Rob Delahay

Keywords

σ factor; type III secretion system; flagellin; inverse regulation; fire blight; *Maloideae*.

Introduction

Erwinia amylovora is the causal agent of fire blight, a bacterial disease of most species of the *Maloideae* (Billing, 1983). Bacteria invade the plant apoplast primarily via natural openings in flowers or through wounds on young aerial vegetative parts. Typical symptoms on host plants include transient water soaking followed by progressive necrosis, ooze production (Thomson, 2000) and, on non-host plants such as tobacco, a hypersensitive response (HR), i.e. a rapid and localized death of tissues (Klement, 1963).

Erwinia amylovora pathogenicity involves a *hrp-dsp* gene cluster (Barny *et al.*, 1990) including (i) secretion genes that encode constituent proteins of a type III secretion system (TTSS) commonly described in other pathogenic bacteria (Cornelis & van Gijsegem, 2000), (ii) genes encoding secreted proteins, such as HrpN, DspA, HrpW and HrpA, that contribute to virulence (Wei *et al.*, 1992b; Gaudriault *et al.*, 1997, 1998; Jin *et al.*, 2001) and (iii) regulatory genes, such as *hrpL*, *hrpS*, *hrpX* and *hrpY* (Wei & Beer, 1995; Wei *et al.*, 2000). A functional TTSS is absolutely required for infection on the host plant as well as for the HR on the nonhost plant. The key regulatory gene is *hrpL*, which encodes the extracytoplasmic function (ECF) of σ -factor HrpL. HrpL recog-

Abstract

In this work we present evidence of an opposite regulation in the phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* between the virulence-associated Type III secretion system (TTSS) and the flagellar system. Using loss-of-function mutants we show that motility enhanced the virulence of wild-type bacteria relative to a nonmotile mutant when sprayed on apple seedlings with unwounded leaves. Then we demonstrated through analyses of motility, flagellin export and visualization of flagellar filament that HrpL, the positive key regulator of the TTSS, also down-regulates the flagellar system. Such a dual regulation mediated by an alternative σ factor of the TTSS appears to be a level of regulation between virulence and motility not yet described among Proteobacteria.

nizes conserved sequence motifs (*hrp* boxes) located in promoters of *hrp* secretion genes and of genes encoding secreted proteins. *hrpL* expression is partly regulated by HrpS, which is a member of the σ^{54} -dependent enhancer-binding protein family, and by HrpX/HrpY, a two-component regulatory system. Expression of the *hrp* gene cluster is modulated by environmental conditions, such as carbon source, temperature and pH (Wei *et al.*, 1992a; Gaudriault *et al.*, 1997).

Erwinia amylovora is motile by means of peritrichous flagella. One can assume that like in most Proteobacteria (although it has not been studied in this particular species), the flagellar basal body consists of components that function as a TTSS, facilitating the export and assembly of flagellar proteins (Macnab, 2003) and that the whole functional system is under the control of a complex regulatory cascade (Soutourina & Bertin, 2003). Motility of *E. amylovora* is temperature dependent and pH dependent (Raymundo & Ries, 1981) and appears to help the bacterium in its invasion of apple blossoms (Bayot & Ries, 1986). However, bacterial cells seem nonmotile after their entry into the apoplast (Raymundo & Ries, 1981), where *hrp* genes become activated to exploit the invaded plant tissues. This led us to investigate the hypothesis that there is inverse regulation between flagellar and *hrp* genes of *E. amylovora*.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains are listed in Table 1. Luria–Bertani (LB) was supplemented with appropriate antibiotics when needed. M9 minimal medium (Na_2HPO_4 6 g L⁻¹, KH_2PO_4 3 g L⁻¹, NH_4Cl 1 g L⁻¹, NaCl 0.5 g L⁻¹, MgSO_4 1 mM and CaCl_2 0.1 mM) was supplemented with nicotinic acid (0.2 g L⁻¹) and a carbon source. This carbon source was either galactose (2 g L⁻¹) or glucose (4 g L⁻¹) in order to grow bacteria in high or low *hrp*-Inducing Medium (*hrp*-IM), respectively (Gaudriault *et al.*, 1997). Growth rates were monitored on a Bioscreen (LabSystems, Helsinki, Finland) at 23 °C.

Plant tests

Assays to compare the virulence of motile and nonmotile strains of *Erwinia amylovora* were performed with young (four to six leaves) actively growing apple seedlings from open-pollinated cv. 'Golden Delicious' in greenhouse conditions (17–23 °C under natural photoperiod). Plants were sprayed with distilled water 24 h before inoculation and kept under a transparent plastic film shelter to maintain humidity to saturation. On the inoculation day, half of the plants were wounded with a double parallel incision perpendicular to the midrib of the youngest fully expanded leaf. The whole set of plants (wounded or not wounded) was immediately sprayed till run-off with a bacterial suspension (10^7 CFU mL⁻¹ in distilled water) from overnight cultures in LB. Plants were incubated first inside the shelter for 24 h then in normal greenhouse conditions. Symptoms were assessed 2 weeks after inoculation. A necrosis reaching the

stem was considered as a positive result. Percentages of diseased plants were analyzed by one-way analysis of variance after arcsin transformation and means were compared according to Duncan's multirange test.

Classical pathogenicity tests for inoculation of apple seedlings for virulence and infiltration on tobacco leaves for HR were performed according to Barny *et al.* (1990) and Klement (1963), respectively, in order to check the characteristics of constructed mutants. Briefly, on apple seedlings, the upper part of the youngest fully expanded leaf was cut off with scissors soaked in the bacterial inoculum (10^9 CFU mL⁻¹ in distilled water).

Recombinant DNA techniques and DNA sequencing

Methods for isolation of DNA and restriction fragments, digestion with restriction enzymes, ligation and electrophoresis were according to Sambrook *et al.* (1989). Introduction of plasmids into *E. amylovora* strains and DNA sequencing were performed as in Gaudriault *et al.* (1997).

Motility test

Ten microliters of 10^9 CFU mL⁻¹ suspensions in distilled water from overnight culture on LB were deposited at the center of soft agar (2.5 g L⁻¹) low or high *hrp*-IM plates. The diameter of the bacterial growth halo was assessed after 2 days for low *hrp*-IM or after 4 days for high *hrp*-IM incubation at 23 °C. Data were analyzed by one-way analysis of variance and means were compared according to Duncan's multirange test.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Designation (abbreviation)	Relevant characteristics*	Reference
<i>Erwinia amylovora</i> wild-type strains		
CFBP [†] 1430 (<i>Ea wt</i>)	Virulent isolate from <i>Crataegus</i> sp., France	Paulin & Samson (1973)
CFBP2585	Virulent isolate from <i>Sorbus</i> sp., Ireland	
CFBP3012	Virulent isolate from <i>Crataegus monogyna</i> , Belgium	
CFBP3792	Virulent isolate from <i>Prunus salicina</i> , USA	Mohan & Thomson (1996)
CFBP1197	Virulent isolate from <i>Crataegus</i> sp., UK	
CFBP3049	Virulent isolate from <i>Malus domestica</i> , Canada (Ea266)	Norelli <i>et al.</i> (1984)
CFBP3051	Virulent isolate from <i>Malus domestica</i> , USA (Ea273)	
CFBP1430 mutants		
PMV6023 (<i>Ea hrpsec</i>)	<i>hrcV</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁻ , path ⁻	Gaudriault <i>et al.</i> (1997)
PMV6046 (<i>Ea hrpS</i>)	<i>hrpS</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁻ , path ⁻	Tharaud <i>et al.</i> (1997)
M73 (<i>Ea hrpL</i>)	<i>hrpL</i> :: <i>uidA</i> , Kan ^r , HR ⁻ , path ⁻	Faize <i>et al.</i> (2006)
FB2208 (<i>Ea flhH</i>)	<i>flhH</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁺ , path ⁺	This work
Plasmid		
pMAB71	pUC18 (Amp ^r) with the 3.8 kb <i>EcoRI</i> fragment carrying <i>hrpL</i>	Gaudriault <i>et al.</i> (1997)

**hrc*, hypersensitive response and conserved (*hrp* secretion mutant); Cm^r, chloramphenicol resistance (20 µg mL⁻¹); Kan^r, kanamycin resistance (20 µg mL⁻¹); Amp^r, ampicillin resistance (400 µg mL⁻¹); path^{+/-}, pathogenic/nonpathogenic.

[†]CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, UMR PaVé, INRA, Angers, France.

Flagellin extraction and analysis

Two- or 4-day-old cultures grown at 23 °C on solid agar (15 g L⁻¹) low or high *hrp*-IM plates, respectively, were suspended in 0.5 mM BES (*N,N*-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid) buffer, pH 7, adjusted based on optical density to the same concentration and vortexed for 10 min. Flagella were separated from cells by centrifugation of equal volumes of culture supernatants (15 000 g, 20 min, 4 °C), pelleted by ultracentrifugation (100 000 g, 90 min, 4 °C), then resuspended in an equal volume of Laemmli electrophoresis buffer. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue (Sambrook *et al.*, 1989). Western analyses were performed according to Sambrook *et al.* (1989) using a rabbit antibody raised against FliC of *Dickeya (Erwinia) chrysanthemi* (kindly provided by V. Shevchik, INSA, Lyon, France) and a goat antirabbit second antibody conjugated with alkaline phosphatase.

Electron microscopy (EM)

Bacteria were grown on 300-mesh gold EM grids coated in 1% Formvar and stained as described in Brown *et al.* (2001), except that bacteria were grown on grids at 23 °C for 16 h in liquid high *hrp*-IM. They were fixed with glutaraldehyde 2% (volume in volume, v/v) in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 for 24 h at 4 °C, then washed with distilled water, negatively stained for 10 s in 1% (v/v) phosphotungstic acid and finally dried before carbon coating. The grids were viewed with a transmission electron microscope (Jeol 2011, Tokyo, Japan) operating at 120 kV.

Results

Involvement of flagella in the early infection process

A nonmotile mutant of *Ea wt* was screened out of a bank previously obtained after insertion of MudIIPR13 phage in *Ea wt* (Barny *et al.*, 1990) using the motility test on low *hrp*-IM plates (Fig. 1a). Location of the MudIIPR13 insertion was determined, after DNA sequencing, to be in a gene (GenBank accession no. AY743587) highly homologous to *fliH* of *Escherichia coli* (BlastX E-value: $5e^{-54}$; 57% identity), encoding a positive regulator of FliI, the ATPase responsible for driving flagellar protein export (Macnab, 2003).

Comparison of patterns of total pelleted extracellular proteins extracted from *Ea wt* and *Ea fliH* grown on low *hrp*-IM allowed the identification of the *Ea wt* flagellin as a 32 kDa protein and confirmed that *Ea fliH* is unable to export flagellin (Fig. 1b).

Inoculation of apple seedlings with *Ea wt* or *Ea fliH* showed that *Ea fliH* is as virulent as *Ea wt* when sprayed on injured plants, but significantly less virulent than *Ea wt* when sprayed on noninjured plants where bacteria must

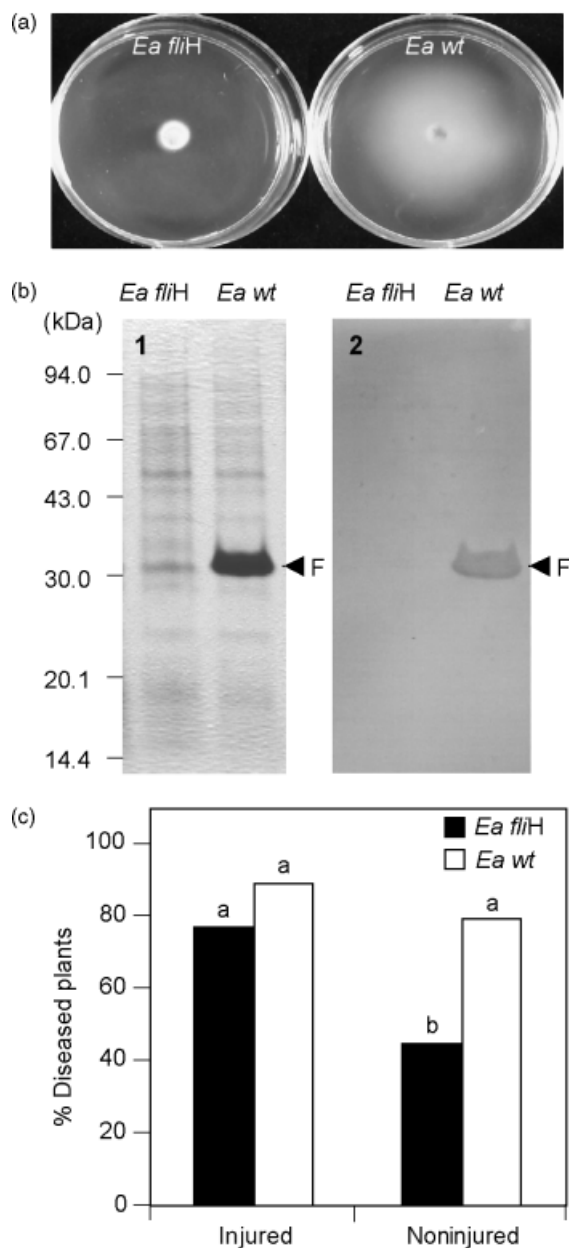


Fig. 1. Comparison of (a) motility, (b) flagellin export visualized in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (1) and immunoblot (2) and (c) virulence of *Ea fliH* and *Ea wt*. F, flagellin. Bars are means from three independent experiments with three replicates of 10 plants per experiment. Bars with the same letter represent percentages of diseased plants that are not significantly different at $P < 0.05$.

move by themselves to the natural infection sites such as stomata on the leaves (Fig. 1c).

Comparison of flagellar synthesis in low or high *hrp*-IM

Motility and flagellin export of *Ea wt* and *hrp* mutants of this strain (*Ea hrpsec*, *Ea hrpL* and *Ea hrpS*) were compared

in vitro on low and high *hrp*-IM. Results showed that *Ea wt* was highly motile and exported large amounts of flagellin when grown on low *hrp*-IM. In contrast *Ea wt* exhibited weaker motility and secreted smaller amounts of flagellin when cultivated on high *hrp*-IM (Fig. 2). This differential motility was not because of difference in growth, as growth rates of *Ea wt* cultivated in high *hrp*-IM showed a delay of 15 h when compared with low *hrp*-IM (data not shown) whereas the delay needed to reach the same colony diameter in the motility test was more than 48 h between the two media. Motility of various wild-type strains of *Erwinia amylovora* (Table 1) was also tested on low and high *hrp*-

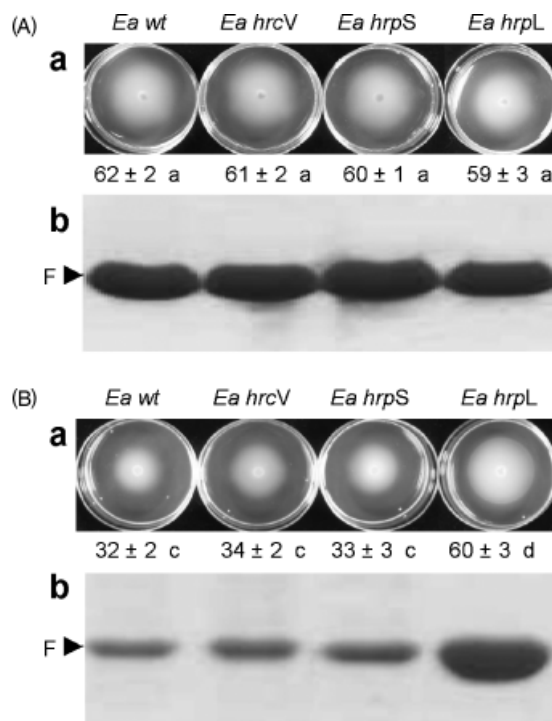


Fig. 2. Motility (a) and flagellin export (b) on low (A) and high (B) *hrp*-IM of *Ea wt*, *Ea hrpsec*, *Ea hrpS* and *Ea hrpL*. Motility values are colony diameter means \pm SEM (mm) from three experiments with three replicates per experiment. Values followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$. F, flagellin.

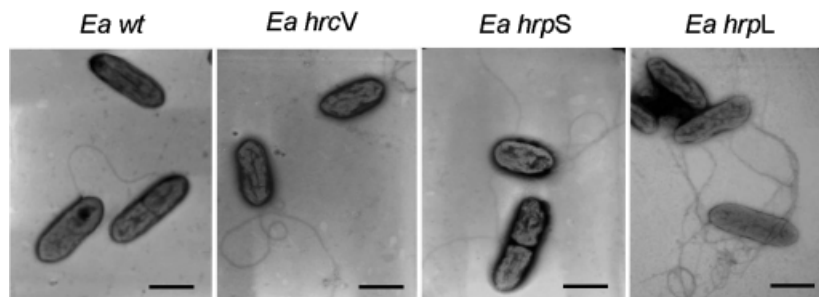


Fig. 3. Electron micrographs of *Ea wt*, *Ea hrpsec*, *Ea hrpS* and *Ea hrpL* grown on high *hrp*-IM. The experiment was repeated twice with similar results. Bar = 1 μ m

IM. A differential motility between these two media was found for each strain, thus demonstrating that this response was not strain specific.

Among the *hrp* mutants tested, only *Ea hrpL* expressed a higher motility and exported larger amounts of flagellin than *Ea wt* when grown on high *hrp*-IM (Fig. 2B). This differential motility and export of flagellin were not observed in bacteria grown on low *hrp*-IM (Fig. 2A). Again this difference was not because of difference in growth, as *Ea wt* and *hrp* mutants showed similar growth rates when cultivated on high or low *hrp*-IM (results not shown). Electron micrographs of bacteria showed that in high *hrp*-IM, corresponding to apoplastic conditions, strains expressing *hrpL*, i.e. *Ea wt*, *Ea hrpsec* and *Ea hrpS*, were scarcely flagellated on no more than 10% of the cells, while *Ea hrpL* had several peritrichous flagella on about 80% of the cells (Fig. 3).

To prove that HrpL was involved in the down-regulation of flagellar synthesis, we complemented the *hrpL* mutation with pMAB71, which carries a wild-type *hrpL* gene. As expected, complementation of *Ea hrpL* fully restored the ability of the mutant to elicit an HR and to infect apple seedlings (results not shown). Then we compared motility and flagellin export of strains expressing HrpL, either the genomic copy or *in trans* from pMAB71, on high *hrp*-IM. The resulting transformants were significantly less motile and exported less flagellin than *Ea hrpL* containing the plasmid alone (Fig. 4).

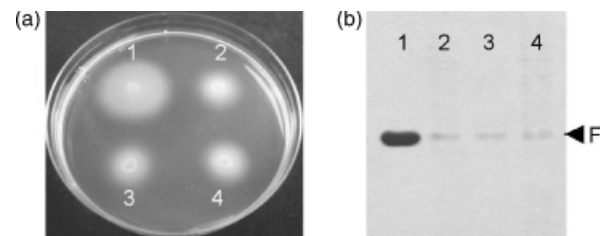


Fig. 4. Motility (a) and flagellin production (b) on high *hrp*-IM of the *hrpL* mutant carrying pUC18 (1) or pMAB71 (2) and *Ea wt* carrying pUC18 (3) or pMAB71 (4) used as controls. Similar results were obtained in three independent experiments.

Discussion

In this paper, we present evidence that *hrp* and flagellar systems are inversely regulated in *Erwinia amylovora*, and that HrpL, the positive key regulator of the *hrp* cluster, is required in the down-regulation of flagellar synthesis in *hrp*-inducing conditions, i.e. under conditions resembling those in the host apoplast. Incidentally, our work allowed the first estimation of the molecular mass of the flagellin of *E. amylovora* (32 kDa).

We assayed the virulence of a nonmotile mutant FB2208 (FliH) on apple seedlings using an inoculation method that required bacteria to move towards the infection sites. Our work definitely confirms that motility is necessary for full virulence in *E. amylovora* as previously suggested using an undefined chemically induced nonmotile variant and other bioassays (Bayot & Ries, 1986). The virulence of the nonmotile mutant can be fully recovered by inoculating the strain on injured leaves. Other plant pathogens such as *Ralstonia solanacearum* also need motility to invade host plants efficiently (Tans-Kersten *et al.*, 2001). Therefore, it is possible that this phenomenon may be general in necrogenic plant pathogen. Similarly motility and virulence have often been associated in animal-pathogenic bacteria. In most cases motility is needed in an initial step of the infection process, e.g. movement towards infection sites, adherence or penetration, but appears unnecessary afterwards (Moens & Vanderleyden, 1996; Tans-Kersten *et al.*, 2001; Josenhans & Suerbaum, 2002).

High bacterial motility on low *hrp*-IM plates and low motility on high *hrp*-IM suggest inverse regulation between flagellar and *hrp* systems in *E. amylovora*. These results suggest that bacteria display a motility when *hrp* genes are not induced, which is likely to be the case before infection, on flower stigma surface where *E. amylovora* multiplies actively but superficially (Thomson, 1986), and switch off their flagellar system when *hrp* genes are induced, which is the case in the plant after infection. However, specific in planta assays would be needed for further demonstration of this hypothesis.

Switching off flagellar synthesis may be vital for the bacteria because flagellins are often considered as general elicitors of antimicrobial plant defense responses (Gomez-Gomez & Boller, 2002) even if exception has been made for *R. solanacearum* (Pfund *et al.*, 2004). The actual eliciting ability of flagellin of *E. amylovora* is not known. However, our present results showing that *Ea hrpL* maintains high motility in plant-mimicking conditions, together with our recent demonstration (Faize *et al.*, 2006) that *Ea hrpL* elicits apple defenses and protects plant tissues against subsequent fire blight infection (unlike the TTSS mutant *Ea hrpsec*), are consistent with the hypothesis that elicitation of defense (and then protection from infection) is because of a larger amount of flagellins exported by *Ea hrpL*, and therefore that flagellins of *E. amylovora* could indeed act as general elicitors

in apple. However, induction of apple defense responses by purified flagellin remains to be demonstrated.

Overproduction of flagella by *Ea hrpL* in plant-mimicking conditions and complementation experiments demonstrates that HrpL, either directly or indirectly, negatively regulates the flagellar system in *E. amylovora*. It is interesting to note that a *hrpS* mutation has no effect on the flagellar system in our experimental conditions, although *hrpL* expression is partly regulated by *hrpS*. According to Wei *et al.* (2000), a *hrpS* mutant, although not pathogenic, is still able to produce some HrpL (one-sixth of the reference level). Our results taken together with those of Wei *et al.* (2000) suggest that a threshold level of HrpL protein is necessary to get a fully functional TTSS system, but that such a threshold is not necessary to exert a negative regulation on the flagellar system. One hypothesis could be that the repression of only one operon may be sufficient to repress motility, while several *hrp* secretory and effector operons must be simultaneously activated to get a functional TTSS.

Mechanisms mediating an opposite regulation between flagellar and virulence systems and described so far in pathogenic bacteria may involve global regulators, such as PrfA in *Listeria monocytogenes* (Michel *et al.*, 1998) or PhcA in *R. solanacearum* (Clough *et al.*, 1997). With regard to Proteobacteria containing a virulence-associated TTSS, these mechanisms may also involve regulators that are near the top of the hierarchy of one of the two systems, such as the two-component response regulator SirA of virulence genes in *Salmonella enterica* or *Escherichia coli* (Goodier & Ahmer, 2001), or the master regulatory operon *flhDC* of the flagellum in *Yersinia enterocolitica* (Bleves *et al.*, 2002). In contrast, our work presents evidence that implicates an alternative σ factor located near the bottom of the regulatory cascade of the TTSS of *E. amylovora* and described so far as regulating only limited and dedicated target *hrp* operons. It therefore demonstrates a new level of regulation between virulence and motility.

The mechanism by which the σ factor HrpL negatively controls flagellum expression remains to be determined. It may be indirect, i.e. through the control of expression of a negative regulator of the flagellar system. It may be also direct, based on σ factor antagonism as described between alternative σ factors in animal pathogens (Huang *et al.*, 1998; Boucher *et al.* 2000) and because of partial overlapping promoter sequences. The fact that flagellar export and Hrp systems are evolutionarily related (Gophna *et al.*, 2003) could support this hypothesis of joint regulation.

Acknowledgements

We thank Robert Filmon for technical help with TEM (SCME, University of Angers), Lucile Destrée for screening

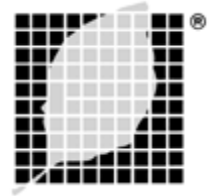
of nonmotile mutants and Roland Chartier for plant pathogenicity tests. This research was supported in part by a grant ('Programme Horticulture') from EPR Pays de la Loire, France.

References

- Barny MA, Guinebretière MH, Marçais B, Paulin JP, Coissac E & Laurent J (1990) Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol Microbiol* **4**: 777–789.
- Bayot RG & Ries SM (1986) Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* **76**: 441–445.
- Billing E (1983) Fire blight. *J Roy Horticult Soc* **1008**: 206–210.
- Bleves S, Marenne MN, Detry G & Cornelis GR (2002) Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J Bacteriol* **184**: 3214–3223.
- Boucher JC, Schurr MJ & Deretic V (2000) Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. *Mol Microbiol* **36**: 341–351.
- Brown IR, Mansfield JW, Taira S, Roine E & Romantschuk M (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector protein from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato across the host plant cell wall. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 394–404.
- Clough SJ, Flavier AB, Schell MA & Denny TP (1997) Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth. *Appl Environ Microbiol* **63**: 844–850.
- Cornelis GR & van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735–774.
- Faize M, Brisset MN, Perino C, Vian B, Barny MA, Paulin JP & Tharaud M (2006) Protection of apple against fire blight induced by an *hrpL* mutant of *Erwinia amylovora*. *Biol Plantarum* (accepted).
- Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP & Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via Hrp secretion pathway in a DspB dependent way. *Mol Microbiol* **26**: 1057–1069.
- Gaudriault S, Brisset MN & Barny MA (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett* **428**: 224–228.
- Gomez-Gomez L & Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251–256.
- Goodier RI & Ahmer BMM (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**: 2249–2258.
- Gophna U, Ron EZ & Graur D (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal transfer events. *Gene* **312**: 151–163.
- Huang X, Fredrick KL & Helmann JD (1998) Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *J Bacteriol* **180**: 3765–3770.
- Jin Q, Hu W, Brown I, Mc Ghee G, Hart P, Jones AL & He SY (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **20**: 1129–1139.
- Josenhans C & Suerbaum S (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605–614.
- Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* **199**: 299–300.
- Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77–100.
- Michel E, Mengaud J, Galsworthy S & Cossart P (1998) Characterization of a large motility gene cluster containing the *cheR*, *motAB* genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 341–347.
- Moens S & Vanderleyden J (1996) Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol* **22**: 67–100.
- Mohan SK & Thomson SV (1996) An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticult* **411**: 73–76.
- Norelli JL, Aldwinckle HS & Beer SV (1984) Differential host × pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **74**: 136–139.
- Paulin JP & Samson R (1973) Le feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill). Winslow et al., 1920, isolées du foyer franco-belge. *Annu Phytopathol* **5**: 389–397.
- Pfund C, Tans-Kersten J, Dunning FM, Alonso JM, Ecker JR, Allen C & Bent AF (2004) Flagellin is not the major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 696–706.
- Raymundo AK & Ries SM (1981) Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **71**: 45–49.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis TE (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Soutourina OA & Bertin PN (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 505–523.
- Tans-Kersten J, Huang H & Allen C (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* **183**: 3597–3605.
- Tharaud M, Laurent J, Faize M & Paulin JP (1997) Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **143**: 625–632.
- Thomson SV (1986) The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* **76**: 476–482.
- Thomson SV (2000) Epidemiology of fire blight. *Fire Blight, The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*

- (Vanneste JL, ed), pp. 9–36. CABI Publishing, Wallingford, NY.
- Wei ZM & Beer SV (1995) *HrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* **177**: 6201–6210.
- Wei ZM, Sneath BJ & Beer SV (1992a) Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* **174**: 1875–1882.
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A & Beer SV (1992b) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85–88.
- Wei ZM, Kim JF & Beer SV (2000) Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 1251–1262.

Molecular Plant-Microbe Interactions



**Adhesion, fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans**

Journal:	<i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i>
Manuscript ID:	MPMI-10-08-0200
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	13-Oct-2008
Complete List of Authors:	Darsonval, Arnaud; INRA, UMR PaVé Darrasse, Armelle; INRA, UMR PaVé Durand, Karine; INRA, UMR PaVé Bureau, Christine; INRA, UMR PaVé Cesbron, Sophie; INRA, UMR PaVé JACQUES, Marie-Agnès; INRA, UMR PaVé
Area That Best Describes Your Manuscript:	Molecular microbial ecology, microbiology < Molecular microbial ecology, host specificity of bacteria

1
2
3 1 **Adhesion, fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of *Xanthomonas***
4
5 2 ***fuscans* subsp. *fuscans*.**
6
7
8 3
9
10 4
11
12 5
13
14

15 6 A. Darsonval, A. Darrasse, K. Durand, C. Bureau, S. Cesbron and M.-A. Jacques*
16
17 7

18
19 8 UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, F-49071 Beaucouzé, France
20
21
22 9
23
24 10
25
26 11
27
28 12
29
30 13
31
32 14
33
34 15
35

36 15 ***Author for correspondance: Mailing address: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George**
37
38 16 **Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé cedex, France Phone: (33)-241-22-57-07. Fax:**
39
40 17 **(33)-241-22-57-05. Email: Marie-Agnes.Jacques@angers.inra.fr**
41
42
43 18
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Abstract

2 Deciphering the mechanisms enabling plant pathogenic bacteria to disperse, colonize and
3 survive on their hosts provides the necessary basis to set up new control methods. We
4 evaluated the role of bacterial attachment and biofilm formation in host colonization
5 processes for *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* on its host. This bacterium is responsible
6 for the common bacterial blight of bean (*Phaseolus vulgaris*), a seedborne disease. The five
7 adhesin genes (*pilA*, *fhab*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH*) identified in *X. fuscans* subsp. *fuscans*
8 CFBP4834-R strain were mutated. All mutants were altered in their abilities to adhere to
9 polypropylene or seeds. PilA was involved in adhesion and transmission to seeds, and
10 mutation of *pilA* led to lower pathogenicity on bean. YapH was required for adhesion to
11 seeds, leaves and abiotic surfaces but neither for *in planta* transmission to seeds nor
12 aggressiveness on leaves. Transmission to seeds through floral structures did not require any
13 adhesins. Conversely, all mutants tested, except in *yapH*, were altered in their vascular
14 transmission to seeds. In conclusion, we showed that adhesins are implicated in the various
15 processes leading to host phyllosphere colonization and transmission to seeds by plant
16 pathogenic bacteria.

17
18 *Additional keywords:* autotransporter, fimbrial, non-fimbrial, two-partner secretion system,
19 type IV pili, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

1 Introduction

Adhesion to host tissues is essential for successful infection by many microbial pathogens (Cao et al. 2001). Adhesion role in virulence was demonstrated for plant pathogens (Astua-Monge et al. 2005; Feil et al. 2007; Matthysse and McMahan 1998; Ojanen-Reuhs et al. 1997; Rosenblueth and Martinez-Romero 2006) and for animal bacterial pathogens (Barak et al. 2005; Gorski et al. 2003). The bacterial surface structures important for adhesion cover a broad group of fimbrial and non-fimbrial structures commonly known as adhesins (Barnhart and Chapman 2006; Hultgren et al. 1993; Klemm and Schembri 2000; Latasa et al. 2006). The fimbrial proteins include the type IV pili that deserve much interest (Craig et al. 2004). The type IV pili are polymeric assemblies of the protein pilin expressed by many Gram-negative bacteria (Craig et al. 2004; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Unlike other types of pili, type IV pili not only participate in adhesion to host cells (Carbonnelle et al. 2006; Finlay and Falkow 1997; Mattick 2002; Tobe and Sasakawa 2002), but are also involved in a surprisingly high number of functions (Merz et al. 2000), including bacterial aggregation, microcolony formation and more complex biological functions such as DNA transformation and a form of surface translocation known as twitching motility (Kaiser 2007; Merz et al. 2000). The non-fimbrial adhesins are widely represented in α -, β - and γ -proteobacteria and contain different classes of proteins implied in bacterial attachment (Gerlach and Hensel 2007; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). These proteins belong to the autotransporter family containing the trimeric autotransporters (ex: XadA and YadA proteins) (Cotter et al. 2005; Koretke et al. 2006) and to the two-partner secretion system as do filamentous hemagglutinin (ex: FhaB and YapH) (Mazar and Cotter 2006).

Sequenced genomes of plant pathogenic xanthomonads (da Silva et al. 2002; Lee et al. 2005; Thieme et al. 2005) contain many genes coding surface adhesion structures and comparative genomic studies suggested that they may play key roles in pathogenicity of

1 strains on plants (da Silva et al. 2002). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *X. campestris* pv.
2 *campestris* have genes for type IV fimbrial pili, for several proteins which could act as non-
3 fimbrial adhesins (Astua-Monge et al. 2005; Thieme et al. 2005), such as homologs of the
4 *Yersinia* proteins YapH and YadA (Hoiczyk et al. 2000) and for other filamentous
5 hemagglutinin proteins (Astua-Monge et al. 2005). YadA mediates adherence to epithelial
6 cells and autoagglutination (Hoiczyk et al. 2000). Homologs of YadA have been found in
7 several plant and animal pathogenic bacteria (Nummelin et al. 2004), e.g., in *X. oryzae* pv.
8 *oryzae*, where XadA was shown to play a role of virulence factor (Ray et al. 2002). Retractable
9 pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 had no apparent effect on pathogenicity but
10 enhance tolerance to environmental conditions such as exposure to UV light (Roine et al.
11 1998). Furthermore, homologs of filamentous hemagglutinin are also present in the plant
12 pathogens *Erwinia chrysanthemi* (Kim et al. 1998) and *Xylella fastidiosa* and their
13 involvement in attachment and virulence has been demonstrated (Feil et al. 2007; Guilhabert
14 and Kirkpatrick 2005; Rojas et al. 2002). The presence of numerous genes coding for surface
15 structures in xanthomonads genomes may indicate a general importance of these proteins in
16 xanthomonads lifestyle. In natural settings, bacteria prefer a sedentary lifestyle in
17 communities to a nomadic existence (Costerton et al. 1999; Danhorn and Fuqua 2007;
18 O'Toole et al. 2000; West et al. 2006). Aggregation followed by biofilm formation is a
19 strategy used by *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* during colonization of bean
20 phyllosphere for its protection from stresses and maintenance of inoculum reservoirs (Jacques
21 et al. 2005).

22 Seeds are the carriers of numerous plant pathogens. Seedborne bacterial plant
23 pathogens are of particular concern because, unlike seedborne fungi, strategies for the
24 management of bacterial diseases are very limited given the rare and antiquated chemical
25 options available. *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Schaad et al. 2005) and *X. axonopodis* pv.

1
2
3 1 *phaseoli* (Vauterin et al. 1995; Vauterin et al. 2000) are causal agents of common bacterial
4
5 2 blight of bean (*Phaseolus vulgaris* L) a seedborne disease (Vidaver 1993). These pathogens
6
7 3 are transmitted to seeds during cultivation of mother plants. Transmission of pathogens to
8
9 4 seeds has been reported to occur through three pathways: i) seeds can be internally
10
11 5 contaminated via the host xylem, as it occurs for virus transmission, some fungi and other
12
13 6 bacteria. This usually results in the invasion of seeds through the hilum; ii) seeds may also
14
15 7 become infested via the pistil, where bacteria move from the stigma through the stylar tissues
16
17 8 down to the embryo, and finally iii) an external contamination of seeds occurs via fruits as a
18
19 9 consequence of contact of the seed with fruit tissue showing symptoms, or at harvest and
20
21 10 during threshing with residues carrying large bacterial populations (Maude 1996). While there
22
23 11 is accumulating data concerning plant-pathogen interactions during vegetative growth, the
24
25 12 interactions of bacterial pathogens with reproductive organs have not yet received much
26
27 13 attention, and therefore almost nothing is known on the molecular mechanisms underlying the
28
29 14 transmission of bacterial pathogens to seeds. We recently showed that the type III secretion
30
31 15 system (T3SS) which is a major pathogenicity determinant of plant pathogenic bacteria
32
33 16 (Gurlebeck et al. 2006; Puhler et al. 2004) is strongly involved in the bean colonization of
34
35 17 seeds by *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Darsonval et al. 2008). Unlike the wild-type strain, strains
36
37 18 with mutations in T3SS regulatory and structural genes are not transmitted to seeds by
38
39 19 vascular pathway. Transmission to seeds by floral structures remains possible but with a low
40
41 20 efficiency for both type of mutants (Darsonval et al. 2008).

42
43
44
45
46
47
48
49
50
51 21 The intent of the present study was to investigate the role of fimbrial and non-fimbrial
52
53 22 proteins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in phyllosphere (i.e. the environment of leaf surfaces,
54
55 23 Hirano and Upper, 2000) colonization and transmission to the seeds. Here, we report the
56
57 24 identification and the characterization of one fimbrial and four non-fimbrial proteins in
58
59 25 *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R and their role in the *in vitro* adhesion and

1 biofilm formation. We also compared their individual contribution in the CFBP4834-R
2 behavior during bean asymptomatic colonization of leaves and transmission to seeds.

4 Results

5 **Five genes coding adhesins were identified and disrupted in *X. fuscans* subsp.**
6 ***fuscans*.** Among adhesins that have been previously identified in xanthomonads (da Silva et
7 al. 2002; Lee et al. 2005; Qian et al. 2005; Thieme et al. 2005; Szureck et al. 2006)
8 homologues of *pilA* (XAC3805), *fhaB* (XAC1815), *xadA1* (XCV3670), *xadA2* (XCV3672) and
9 *yapH* (XAC2151) genes were detected by PCR with specific primers (Table 1) in *X. fuscans*
10 subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R. The nucleotide sequences of the PCR fragments
11 confirmed the identity of the target genes (data not shown). Mutation of the *pilA* resulted in a
12 deletion of 108 nucleotides from the 268 bp position. A stop codon was inserted after the
13 273th nucleotide position. We verified using the InterProScan software that the remaining 91
14 amino acids did not present any functional domain. Mutation of the other genes resulted in an
15 insertion of the pVO155 in the recombining sequence by simple crossing-over. PCR
16 amplifications using specific primer sets (Table 1) confirmed that pVO155 unique insertions
17 were at the correct positions in mutated strains. Southern blot hybridizations confirmed the
18 single plasmid insertion event. Growth rates of the wild type CFBP4834-R and of every strain
19 mutated in each adhesin genes were similar in 10% TSB, indicating that mutations did not
20 impair the *in vitro* growth of the corresponding strain (data not shown). Furthermore, all
21 constructions were stable both *in vitro* and *in planta* as no reversions were observed *in vitro*
22 after 54 generations without selection pressure. Population sizes of each mutant enumerated
23 from leaf samples on non-selective medium were not significantly ($p>0.05$) higher than those
24 enumerated on selective medium. The RT-PCR confirmed that no mRNAs were transcribed
25 from the disrupted genes in strains with mutations in *fhaB*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH* (Fig.1).

1 **Mutation in *yapH* suppressed adhesion to abiotic and biotic surfaces and biofilm**
2 **formation in *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.** The crystal violet incorporation
3 assay revealed that 4834YAPH mutant was totally defected in adhesion to polypropylene (PP)
4 surface, a relatively hydrophobic surface (Fig. 2). The capacities of adhesion to PP were also
5 significantly ($p<0.05$) decreased for three other mutants: 4834PILA, 4834FHAB and
6 4834XADA2. In contrast, the mutant 4834XADA1 did not show any significant ($p>0.05$)
7 differences in adhesion to PP, as compared to the wild-type. According to Yap et al. (2005)
8 biofilms are defined as aggregates of cells around the edge of the culture tube at the air-
9 liquid-surface interface and pellicles as thick aggregates of cells on the culture surface. As
10 biofilm and pellicle formations were never visible for cultures in PP plates, we modified a
11 method developed by Yap et al. (2005) for *Erwinia chrysanthemi* to look for such formations
12 in our strains. Briefly this method is based on a stationary culture in a rich liquid medium in
13 glass tubes. We added a step of biofilm coloration with crystal violet. No pellicles were
14 visible for any strains. Biofilm formation was altered only for 4834YAPH mutant compared
15 to wild type with a quasi absence of biofilm formation for this mutant (Fig. 3).

16 Adhesion capacities on biotic surfaces were significantly altered for the five mutants
17 compared to the wild type (Fig. 4). Adhesion to bean seeds was evaluated after 25 min and
18 2 h of contact time between cells and seeds. The decreased adhesion capacities observed for
19 every mutant were noticed both after the short and the long time of contact, except for
20 4834XADA2. For this particular mutant a significant ($p<0.05$) lesser adhesion than for the
21 wild type was noticed only after the longer time of contact. Adhesion to bean seeds of every
22 mutant was lower after 2 h than after 25 min of contact while adhesion to bean seeds of the
23 wild type did not vary in time. Although XadA2 role appeared only after the longer time of
24 contact between seeds and cells, adhesion measures to a biotic surface suggest that all five
25 adhesins were required for the adhesion on seeds and were not redundant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Mutation in *pilA* decreased aggressiveness of *X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean.**

2 When inoculated onto bean leaves every mutant (4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA1,
3 4834XADA2 and 4834YAPH) was able to cause typical water-soaked spots. However,
4 4834PILA mutant was significantly less aggressive than the wild type strain as revealed by
5 inoculation at a low concentration (1×10^6 CFU/ml) (Fig. 5). Conversely, the pathogenicity of
6 4834YAPH was significantly ($p < 0.05$) higher than that of the wild type when inoculated at 1
7 $\times 10^7$ CFU/ml. No significant differences were observed for other mutants in comparison to
8 the wild-type.

9 **Mutation in *yapH* of *X. fuscans* subsp. *fuscans* partially altered its capacity to**
10 **colonize bean phyllosphere.** To quantify the whole bacterial population sizes colonizing the
11 phyllosphere a rough stomaching of leaves was used. To quantify endophytic population sizes
12 and populations aggregated in biofilms and adherent to leaf surfaces, leaves were disinfected
13 with chloroform vapors before stomaching (Pruvost et al., submitted). Verifications of the
14 efficacy of chloroform vapors disinfection method included that (i) 90% to 99% of solitary
15 cells deposited on bean leaf surfaces were killed following a chloroform treatment right after
16 leaves had dried (Fig. 6); and (ii) all cells that were infiltrated into intercellular spaces of the
17 leaf mesophyll were not (data not shown).

18 Capacities to colonize the phyllosphere was similar for strains 4834PILA, 4834FHAB,
19 4834XADA2, 4834YAPH and the wild type CFBP4834-R when determined after stomaching
20 of leaves (Fig. 6A). No differences were observed among the dynamics and the population
21 sizes. However, when the leaf surfaces were disinfected with chloroform vapors, bacterial
22 population enumeration showed that the remaining population sizes of 4834YAPH were
23 significantly ($p < 0.05$) lower than those of the wild type eleven days after inoculation (Fig.
24 6B). No such differences were observed at the previous sampling dates and for other strains.
25 Similar results were observed for the independent repetitions of the experiment. These results

1
2
3 1 suggest that 4834YAPH was not able to adhere to leaf surfaces and form biofilms. Indeed, we
4
5 2 confirmed *in vitro* that wild-type planktonic cells were more sensitive to chloroform vapors
6
7 3 than cells in biofilms. Less than 2% of the planktonic cells survived to chloroform vapors
8
9 4 whereas about 33% of the aggregated cells survived. Mean control biofilm cell densities were
10
11 5 3.3×10^4 CFU/ml whereas mean chloroform treated biofilm densities were 1.1×10^4 CFU/ml.
12
13 6 Values for planktonic cells were 8.9×10^6 CFU/ml and 1.5×10^5 CFU/ml, respectively.
14
15 7 Hence, aggregation in biofilms protected cells from chloroform vapors. As *yapH* was required
16
17 8 for *in vitro* biofilm formation, the *in planta* susceptibility of 4834YAPH populations to
18
19 9 disinfection with chloroform vapors strongly suggests that 4834YAPH did not form biofilms
20
21 10 in the phyllosphere compared to the wild type (Jacques et al. 2005).
22
23
24
25
26

27 11 **Mutation in *pilA* and *fhaB* altered transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to**
28
29 12 **seeds.** According to the method developed by Darsonval et al. (2008) to monitor bacterial
30
31 13 transmission to bean seeds plants at the flower bud-stage were spray-inoculated with
32
33 14 suspensions of the wild type or mutated strains. With this inoculation procedure all aerial
34
35 15 organs of plants (mainly leaves and buds) were contaminated on their surfaces; later bacteria
36
37 16 could ingress in tissues. Using this inoculation procedure contamination of seeds could result
38
39 17 from a vascular colonization following bacterial penetration by hydathodes and from a floral
40
41 18 contamination following bud and flower colonization. We observed that the 4834PILA
42
43 19 mutant was the most altered in its ability to transmit to bean seeds, with the lowest
44
45 20 transmission rate ($p < 0.05$) (Table 2). Transmission rate of 4834FHAB mutant was affected
46
47 21 compared to the wild type although not significantly ($p > 0.05$). Transmission rates of
48
49 22 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH mutants were similar or even slightly higher
50
51 23 than that of the wild type strain. Bacterial population sizes on seeds were not significantly
52
53 24 different among strains. Thus, PilA was clearly involved in the bacterial transmission to bean
54
55 25 seeds. The contributions of the other adhesins seemed less obvious. For a better understanding
56
57
58
59
60

1 of their respective contribution it was necessary to differentiate the different contamination
2 pathways and the role of each adhesin in the floral and vascular pathways.

3 **Mutation in *pilA*, *fhaB*, and *xadA2* limited vascular transmission of *X. fuscans***
4 **subsp. *fuscans* to seeds but not its transmission through the floral pathway.**

5 To monitor bacterial transmission to seeds through the vascular pathway, bacteria
6 were sprayed on leaves while floral structures of the plants were protected from any aerial
7 contamination by cellophane bags. With this method, only bacteria that are endophytes or that
8 colonize the vascular system can move from the leaf surfaces to seeds (Darsonval et al. 2008).
9 Only the wild type (CFBP4834-R) and 4834YAPH were able to transmit to seeds with high
10 frequencies through the vascular pathway (Table 3). Frequencies of transmission to seeds
11 were low for 4834PILA, 4834FHAB and 4834XADA2. Mean bacterial population sizes on
12 seeds were low (Table 3). To monitor bacterial transmission to seeds through the floral
13 pathway, inoculum was directly deposited into flower buds. None of the selected mutants in
14 the non-fimbrial adhesins (4834FHAB, 4834XADA2 and 4834YAPH) was impaired in its
15 ability to infect seeds through the floral pathway as transmission rates and associated
16 population sizes were high and similar to those of the wild type (Table 3). When originating
17 from the vascular pathway, mean bacterial population sizes on seeds were lower than
18 populations on seeds contaminated through the floral structures (Table 3). Altogether, these
19 results suggest that PilA, XadA2 and FhaB were required for a vascular transmission to bean
20 seeds but not through the floral pathway; YapH was not involved in bacterial transmission to
21 seeds either through the floral or the vascular pathways.

22

23 **Discussion**

24 To gain insight into the dynamics of *X. fuscans* subsp. *fuscans*-host interactions during
25 colonization processes we analyzed the role of bacterial surface structures in survival and

1 multiplication on leaves, transmission and adhesion to seeds. *In planta* characterization of
2 mutant behavior followed the determination of the role of adhesins in bacterial adhesion *in*
3 *vitro*, and formation of biofilms. The five different genes coding adhesin structures identified
4 in *X. fuscans* subsp. *fuscans* contributed at various levels in host colonization. While *pilA* was
5 involved in bacterial adhesion to seeds and transmission to seeds, *yapH* was essential for
6 adhesion to seeds, leaves and abiotic surfaces but not for *in planta* transmission to seeds. The
7 contributions of *xadA1*, *xadA2* and *fhaB* were partial in seed adhesion and transmission to
8 seeds. The only significant impact of the mutations in bacterial phyllospheric colonization
9 was the lesser resistance of 4834YAPH to chloroform vapors manifesting its alteration in
10 biofilm formation.

11 Dispersion of a pathogen is a major determinant of fitness (Fenton et al. 2002;
12 McCallum et al. 2001). Transmission by seeds is one of the most efficient means of
13 dispersion for the majority of the plant pathogenic bacteria (Gitaitis and Walcott 2007).
14 However, determinants of this biological process are still poorly understood. Recently, we
15 demonstrated that the T3SS of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and its master regulators HrpG and
16 HrpX are major determinants of bacterial transmission to seeds (Darsonval et al. 2008).
17 Mainly, T3SS regulatory and structural genes are required for bacterial transmission to seeds
18 through the vascular pathway. Here, we showed that PilA fimbrial protein and in a lesser
19 extent XadA1 and FhaB were also involved in transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to
20 bean seeds by the vascular pathway. The intimate mechanisms depending on adhesins and
21 resulting in bacterial colonization of xylem vessels and ultimately transmission to seeds
22 remain however to be discovered. Darsonval and colleagues (2008) showed that T3SS is also
23 implicated in the bacterial transmission through the floral pathway. In contrast, here we
24 showed that none of the adhesins seemed to be required for transmission to seeds through the
25 floral pathway. This is consistent with the fact that flowers are considered excellent microbial

1 habitats being well supplied with nutrients (Ngugi and Scherm, 2006) and offering protected
2 habitats against abiotic stresses. Furthermore flowers provide short-lived but non hostile
3 environments to microbes (Stockwell, 2005) and long-term advantages conferred by adhesion
4 and aggregation in biofilms are not necessary to survive in this ephemeral habitat and have no
5 time to take place.

6 Although both fimbrial and non fimbrial adhesins appeared to contribute to initial
7 attachment to abiotic surfaces such as PP, YapH played an essential role in this step. Mutation
8 in *yapH* totally impaired *X. fuscans* subsp. *fuscans* for *in vitro* adhesion to PP. In contrast,
9 mutation in *pilA*, *fhaB* and *xadA2* modified partially adhesion capacities of *X. fuscans* subsp.
10 *fuscans* to this surface. Our results confirmed a recent study suggesting that non-fimbrial
11 HxfB proteins (filamentous hemagglutinins) of *Xylella fastidiosa* are involved in the adhesion
12 on glass, another abiotic surface (Feil et al. 2007). As observed for *X. fastidiosa* (Feil et al.
13 2007) we did not see evidence of cell-to-cell aggregates formed within broth cultures for
14 *X. fuscans* subsp. *fuscans* wild-type but, instead, biofilm formation (*i.e.* aggregation of cells to
15 each other after some cells had attached to a surface). Although adhesion to PP surface was
16 decreased for mutants in fimbrial (PilA) and non-fimbrial adhesins (FhaB and XadA2), all
17 mutants in adhesins except in non-fimbrial YapH were still able to initiate attachment to
18 abiotic surfaces, the first step in biofilm formation. Hence we can speculate as Feil et al.
19 (2007) did that the process of biofilm formation involves the sequential contribution of
20 primarily and essentially a non-fimbrial adhesin (YapH for *X. fuscans* subsp. *fuscans*) to
21 initial attachment of cells to the abiotic surface; whereas secondarily cells can be added to the
22 primarily colonists by a process involving pili. We cannot eliminate the possibility of other
23 adhesins involved in this phenomenon. Sequencing of *X. fuscans* subsp. *fuscans* genome may
24 reveal the existence of other genes coding adhesins that we could not identified with our
25 strategy. Results found for the adhesion to biotic surfaces are also consistent with this model

1
2
3 1 in which adhesins contribute sequentially in adhesion to surface and later on to cell-to-cell
4
5 2 aggregation. FhaB and YapH are necessary for initial attachment as determined after 25 min
6
7 3 of contact time between seeds and bacterial suspensions. Contribution of other adhesins and
8
9 4 especially the fimbrial one, PilA, is dominant later.

5 Several adhesins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* seems to be involved in its pathogenicity
6 on bean. Indeed, we observed that aggressiveness of *X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean was
7 strongly attenuated by the disruption of *pilA*, but increased by the disruption of *yapH* and
8 remained unmodified for other genes coding adhesins. As previously shown for fimbrial
9 adhesins of *Ralstonia solanacearum*, *X. citri* subsp. *citri* and *X. campestris* pv. *hyacinthi*
10 (Kang et al. 2002; Ojanen-Reuhs et al. 1997; van Doorn et al. 2001) the type IV pili of *X.*
11 *fuscans* subsp. *fuscans* contributed to aggressiveness on its host, as revealed by the mutation
12 of *pilA*. In contrast, mutation of *yapH* increased aggressiveness of *X. fuscans* subsp. *fuscans*.
13 It has previously been shown that *yapH* could act as an antivirulence gene (Foreman-Wykert
14 and Miller 2003). Mutations in such locus result in a hypervirulent phenotype, as measured by
15 a lower lethal dose and a colonization advantage (Foreman-Wykert and Miller 2003). We
16 were not able to show any substantial involvement of other adhesins in pathogenicity of
17 *X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean even with different inoculum concentration and inoculum
18 procedures (data not shown). Results obtained separately for mutants of *Xyllella fastidiosa* in
19 HxfA (Guilhabert and Kirkpatrick 2005) and HxfB (Feil et al. 2007) adhesins were however
20 not consistent: mutant in the *hxfA* produced more severe symptoms, and earlier grapevine
21 death, while mutant in *hxfB* exhibited lower incidence of disease. The non-fimbrial adhesin
22 XadA is required for optimum virulence in *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ray et al. 2002). For
23 *Erwinia chrysanthemi*, Rojas and associates (2002) reported that each mutant in filamentous
24 hemagglutinin HecA have limited leaf surface attachment and aggregate formation, failed to
25 express macerating enzymes and were avirulent. Furthermore *hecA::Tn7* hemagglutinin

1 mutant was reduced in virulence on *Nicotiana clevelandii* seedlings after inoculation without
2 wounding (Rojas et al. 2002).

3 YapH is the only adhesin of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R required for a
4 complete phyllosphere colonization process, as demonstrated by quantification of population
5 sizes adherent to leaves following surface disinfection with chloroform vapors. This behavior
6 of the strain 4834YAPH mutated in *yapH* could be associated with its total incapacity to
7 adhere to biotic and abiotic surfaces and to form biofilms. This disadvantage for surface
8 colonization under highly stressful conditions could be in turn an advantage as it could allow
9 extensive colonization of vessels, leading to an extensive development of symptoms. This
10 hypothesis can be supported by data obtained with the pathosystem *X. fastidiosa* and *Vitis*
11 *vinifera* (Guilhabert and Kirkpatrick 2005). In this case, ability to form biofilms *in planta*
12 leads to the congestion of some rare vessels while for mutants in *rpfF*, a high proportion
13 (>80%) of vessels were colonized by large population sizes of planktonic cells able to
14 disperse in vascular system and consequently to provoke symptoms (Newman et al. 2004).
15 This is coherent with the efficient transmission of 4834YAPH of *X. fuscans* subsp. *fuscans*
16 mutated in *yapH* to bean seeds through the vascular pathway. This last observation allows us
17 to confirm that *yapH* is required for leaf adhesion and more generally for biofilm formation
18 on leaf surfaces but not for its ingress in host tissues.

19 Pathogenic bacteria have evolved an incredibly large and diverse array of adhesion
20 proteins to exploit a variety of host-cell surface component (Pizarro-Cerda and Cossart 2006).
21 The results reported in this study present the individual and complementary contribution of
22 five adhesins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* during the colonization of the phyllosphere and the
23 transmission to the seeds. These results are coherent with the idea that xanthomonads host a
24 large repertoire of bacterial surface structures necessary to exploit the various environments
25 they have to face in their life. Indeed, we showed that each of the five identified adhesins in

1
2
3 1 *X. fuscans* subsp. *fuscans* was involved in at least one of the various steps of the phyllosphere
4
5
6 2 and the anthosphere colonization during the colonization of its host.
7
8
9 3

4 **Materials and Methods**

5

6 **Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** The bacterial strains and
7
8 plasmids used in this study are described in Table 4. Xanthomonad strains were grown at
9
10 28°C in 10% TSA medium (1.7 g/l tryptone, 0.3 g/l soybean peptone, 0.25 g/l glucose, 0.5 g/l
11
12 NaCl, 0.5 g/l K₂HPO₄ and 15 g/l agar), 10% TSB (10% TSA without agar) or in MME
13
14 minimal medium (10.5 g/l K₂HPO₄, 5.4 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄ supplemented with
15
16 glutamate 20mM, MgSO₄ 1mM and casamino acids 0.15 g/l) (Arlat et al. 1991). *Escherichia*
17
18 *coli* cells were cultivated at 37°C in Luria Bertani medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract,
19
20 5 g/l NaCl, 15 g/l agar). SOB + Glycerol (SOBG) medium (Yap et al. 2005) was used to
21
22 induce aggregation in glass tubes. Media were supplemented with appropriate antibiotics.
23
24 Antibiotics were used at the following final concentrations: rifamycin (R): 50 mg/l;
25
26 kanamycin (Km): 25 mg/l; rifampicin (Rif): 50 mg/l; chloramphenicol (Cm): 12.5 mg/l and
27
28 tetracyclin (Tet): 10 mg/l. For *in planta* studies media were supplemented with 50 mg/l
29
30 cycloheximide and 10 mg/l propiconazole to inhibit fungal growth. To prepare inocula,
31
32 strains were grown 48 h in 10% TSA supplemented with appropriate antibiotics. Bacterial
33
34 streak cultures were suspended in sterile water by sterile swab to 1×10⁸ CFU/ml. Suspensions
35
36 were adjusted to the desired final concentrations with sterile distilled water.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Plant material.** *In planta* experiments were conducted with a variety of common bean
55
56 (*P. vulgaris* cv. Flavert) susceptible to common bacterial blight. Seeds were provided by
57
58 Vilmorin and were considered to be free of *X. fuscans* subsp. *fuscans* following the analysis
59
60 of about 100,000 seeds per lot with standard tests (International Seed Testing Association,

1 2007). When necessary, seeds were sown in 10×10×18 cm pots (1 seed per pot) containing
2 soil substrate (Neuhaus humin substrat S NF 11-44-551, Proveg, La Rochelle, France). Beans
3 were grown in growth chamber until the first trifoliolate leaf was fully expanded (Michael
4 1994) or until the flower bud stage (five-week old) (Michael 1994) depending on the
5 experiments. Beans were grown in growth chambers under 16 h of light at 25°C (28°C for
6 pathogenicity tests) and 8 h of darkness at 20°C (22°C for pathogenicity tests) and under high
7 (95%) relative humidity (RH). Before inoculations, plants were incubated under 16 h of light
8 at 25°C and 8 h of darkness at 20°C and 95 % relative humidity (RH). For experiments on
9 phyllosphere colonization and transmission to seeds RH was decreased to 50% from two days
10 after inoculation. Plants were watered three times per week and supplemented with 0.3 g/l
11 NPK (18/14/18) once a week. Plant inoculations were carried out under quarantine at UMR
12 PaVé, Centre INRA, Beaucouzé, France. To avoid cross-contaminations, plants receiving a
13 similar treatment were grouped in growth chamber and were separated by polypropylene
14 curtains from other treatments. Every experiment with plants was repeated at least three
15 times.

16 **Molecular biology techniques.** Chromosomal DNA was extracted with the
17 Nucleospin[®] tissue kit (Macherey-Nagel Hoerd, France). Plasmid preps were performed with
18 the Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Restriction enzymes,
19 DNA ligase, GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega) were used according to the manufacturer's
20 recommendations. Polymerase chain reactions (PCR) were done in 20 µl volumes containing
21 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer (Table 2), 0.4 U/µl GoTaq
22 polymerase, and 4 µl of a boiled bacterial suspension (1×10⁷ CFU/ml). PCR conditions were
23 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C and
24 ended with 7 min at 72°C. Southern hybridizations were performed using gene and vector-
25 specific PCR fragments as probes. Probes were labeled using the PCR Digoxigenin DIG

1
2
3 1 labeling mix (Roche Applied Science, France). Genomic DNA was digested by *Bam*HI and
4
5 2 transferred to nylon membrane Hybond N⁺ (Amersham) according to supplier's instructions.
6
7 3 Blots were hybridized for 16 h at 42°C in 50% formamide, 5X SSC 20% SDS, 2% blocking
8
9 4 reagent and 0.1% N-lauryl-sarcosine, followed by washes in 2X SSC, 0.1% SDS and 0.1X
10
11 5 SSC, 0.1 % SDS at 68°C. The probes were detected using the Fab fragments of an Anti-
12
13 6 digoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (Anti-DIG-AP) and Nitro-Blue
14
15 7 Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt NBT/BCIP
16
17 8 solution according to the supplier's instructions (Roche Applied Science, France).
18
19
20
21

22 9 Total RNA of each strain was isolated by a modification of the method of Piper et al.
23
24 10 (1999). A 2 ml late-exponential-phase culture grown in TSA 10% was centrifuged 30 s at
25
26 11 14,000 × g. The pellet was resuspended in of 600 µl of hot (65°C) Trizol (Invitrogen, France)
27
28 12 and the mixture was shaken at 65°C for 5 min. After 5 min at room temperature, the cell
29
30 13 debris were removed by centrifugation (2,500 × g, 5 min at 15°C) and the supernatant was
31
32 14 transferred to a fresh tube. Chloroform (120 µl) was added to 600 µl of the supernatant, and
33
34 15 the mixture was vortexed vigorously 30 s. After 2 min at room temperature, the phases were
35
36 16 separated by centrifugation at 12,000 × g for 15 min at 4°C, the upper phase (300 µl) was
37
38 17 removed to a fresh tube. Isopropyl alcohol (250 µl) was added and the mixture was incubated
39
40 18 at room temperature for 10 min. The precipitated RNA was collected by centrifugation at
41
42 19 12,000 × g for 20 min at 4°C. The supernatant was removed, and the pellet was washed with
43
44 20 500 µl of 75% ethanol. A new pellet of RNA was collected by centrifugation at 7,500 × g for
45
46 21 5 min at 4°C and was air-dried to near completion. The RNA was dissolved in 89 µl of sterile
47
48 22 double-distilled H₂O, and the preparation was treated with 1 µl of DNase (Ambion, Applied
49
50 23 Biosystems, France; 2 U µl⁻¹) to remove contaminating DNA during 1 h at 37°C. The
51
52 24 preparation was heated 10 min at 75°C to inactivate the DNase and RNA was ethanol
53
54 25 precipitated and dissolved in 50 µl of double-distilled H₂O. Five µg of total RNA was reverse
55
56
57
58
59
60

1 transcribed into cDNA in a 35 µl volume using 15 µl mix of 11mer primers at 10 µM each
2 (Fislage et al. 1997), 8 µl dNTP at 2,5 mM, 0.8 µL RNasin (40 U/µl, Promega, France) and
3 0.2 µl Reverse Transcriptase (200 U/µl, Promega, France). Reaction mixture was incubated
4 10 min at 65°C, 5 min at 4°C and 1 h at 42°C. The RNA-cDNA mix was ethanol precipitated,
5 dissolved in double-distilled H₂O and used for PCR reactions.

6 **Mutagenesis techniques to construct *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans***

7 **CFBP4834-R mutants in adhesins.** Specific primers (Table 2) for each target gene were
8 designed based on consensus sequences obtained by comparison of sequences from *X. citri*
9 subsp. *citri* strain 306 (da Silva et al. 2002), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain 85-10
10 (Thieme et al. 2005), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain. KACC10331 (Lee et al. 2005) and
11 *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (Qian et al. 2005) available in the GenBank
12 database. Multiple alignments were performed using ClustalW2 at the EMBL-EBI.

13 Identification of homologues of these genes was checked by PCR in the CFBP4834-R.
14 CFBP4834-R deletion mutant lacking *pilA* were generated using the allelic exchange vector
15 pCM184 (Marx and Lidstrom 2002). Two DNA fragments (543 and 604 bp) were PCR
16 amplified in *pilA* of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R using primers described in
17 Table 2. They were cloned in pCM184 in the *ApaI-SacI* and *EcoRI-NotI* cloning sites,
18 respectively. These cloning sites flanked the loxP sites boarding a kanamycin cassette. A
19 marker exchange kanamycin resistant mutant of CFBP4834-R was then generated by
20 triparental mating using the mobilizing *Ec* K12 (pRK600) (Finan et al. 1986). Unmarked
21 deletion 4834PILA mutant was generated using the *cre*-expressing plasmid pCM157. This
22 plasmid provides expression of a Cre recombinase that catalyses *in vivo* excision of DNA
23 regions flanked by co-directional loxP recognition sites (Marx and Lidstrom 2002). The *pilA*
24 region of the mutant was sequenced to validate the deletion. Presence of functional domains
25 in the remaining *pilA* fragment of the mutated strain was analyzed with InterProScan.

1
2
3 1 For specific inactivation of other genes in CFBP4834-R, a plasmid-integration
4
5 2 mutagenesis strategy was used as previously described (Oke and Long 1999). Fragment of
6
7 3 each target gene was amplified using specific oligonucleotidic primers (Table 2). The PCR
8
9 4 fragment was ligated into the suicide vector pVO155 (Oke and Long 1999) and this
10
11 5 construction was introduced into *E. coli* DH5 α . PCR fragments cloned into the pVO155 were
12
13 6 sequenced to verify their identity with BlastN (Altschul et al. 1997). Plasmid was transferred
14
15 7 into the strain CFBP4834-R by triparental mating (Arlat et al. 1992; Glazebrook and Walker
16
17 8 1991) using the mobilizing *E. coli* K12 (pRK600) (Finan et al. 1986). Disruption of each
18
19 9 target gene was verified by (i) PCR using one primer in the plasmid (proR or proF) and a
20
21 10 second primer in the genome outside the recombinant region (Table 2), (ii) Southern blotting
22
23 11 using the recombinant fragment as a specific probe and a vector-specific probe (Table 2) to
24
25 12 confirm single insertion and (iii) RT-PCR to confirm that no mRNA were transcribed from
26
27 13 the mutated gene using specifically designed primers (Table 2). Primers (HrpG-F and HrpX-
28
29 14 R2, Darsonval et al. 2008) designed in two contiguous genes with opposite orientations *hrpG*
30
31 15 and *hrpX* were used to show the absence of contaminant DNA in each sample. Primers (Table
32
33 16 2) designed in *orf3* of the *pig* locus of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BX01 (Goel et al. 2002)
34
35 17 were used as positive control for each sample as this gene is transcribed in our conditions.
36
37
38
39
40
41
42

43 18 The stability of the constructions was verified *in vitro* by testing the kanamycin
44
45 19 resistance of the insertion mutants. Liquid cultures at initial concentration of 1×10^6 CFU/ml
46
47 20 of each strain were cultured in 10% TSB without antibiotic selection pressure at 28°C under
48
49 21 constant agitation (120 rpm), 24h later they were 10 times-diluted and grown up again, this
50
51 22 step was repeated during four days. Finally bacterial populations were plated on selective and
52
53 23 non-selective media (10% TSA) and population sizes were compared. Three independent
54
55 24 cultures of every strain were analyzed and the experiment was repeated three times. The
56
57 25 stability of the mutation was also verified *in planta* by comparison of the bacterial population
58
59
60

1 sizes on selective and non-selective media the day of inoculation and at the last sampling
2 date. To confirm stability of the construction *vs.* antibiotic resistance acquisition and to check
3 for cross-contamination among treatments the identity of ten colonies per plant that developed
4 on the non-selective medium was verified by PCR using specific primers (Table 1).

5 To assess that mutations had no impact on *in vitro* growth, growth curves were
6 established for each mutant and the wild type strain CFBP4834-R by growing strains at an
7 initial concentration of 1×10^7 CFU/ml in 100-well honeycomb microtiter plates (Thermo
8 Electron, France) in 10% TSB. Plates were incubated at 28°C with continuous shaking over a
9 period of 30 hours. Growth measurements were monitored automatically every 2 h by optical
10 density measurements at 600 nm using the Bioscreen C instrument (Labsystems, Helsinki,
11 Finland). Non-inoculated wells were used as aseptic controls. The experiment was repeated
12 three times for each strain.

13 ***In vitro* and *in planta* adhesion assays.** Bacterial adhesion under static conditions was
14 quantified by a crystal violet incorporation assay with 96-well polypropylene microtiter plates
15 (Microwell, Nunc, Denmark) using a modification of a previously reported protocol (O'Toole
16 and Kolter 1998). Every well was fulfilled with 200 μ l MME minimal medium per well.
17 Three wells per strain containing each 200 μ l MME minimal medium were inoculated with
18 1:20 dilutions of an inoculum calibrated at 1×10^7 CFU ml⁻¹ and incubated at 28°C for 3 days.
19 Then supernatants containing planktonic bacteria were transferred into a 96-well plate
20 (Nunclon, Nunc, Denmark) to determine their OD₆₀₀ using the μ Quant™ platereader
21 (Bio-Tek Instruments, Inc., USA) as an indication of bacterial growth. To quantify surface-
22 attached bacteria, the 96-well PP microtiter plates were rinsed twice with distilled water, and
23 surface-attached cells were stained for 15 min at room temperature with 200 μ l per well of a
24 1% (wt:vol) crystal violet (CV) solution. Then supernatants were discarded, the wells were
25 washed thoroughly and repeatedly with distilled water, and finally the dye incorporated in

1
2
3 1 attached cells was solubilized in 200 μ l of 95% ethanol per well and the OD₆₀₀ were
4
5 2 determined in the microplate reader. These tests were repeated at least three times for every
6
7 3 bacterial strain.
8
9

10 4 Bacterial adhesion to bean seeds was tested as previously described (DeFlaun et al.
11
12 5 1994) with some modifications. To evaluate the adhesion ability of the wild type and mutant
13
14 6 strains, series of three independent columns were filled with 12 g of bean seeds and fully
15
16 7 saturated with 6 ml of inoculum at 1×10^5 CFU/ml. The contact time between the culture and
17
18 8 the seeds was 25 min and 2 hours. After removal of the inoculum, columns were washed
19
20 9 twice with 6 ml of distilled water. To quantify bacterial cells adherent to seeds, seeds of each
21
22 10 column were soaked overnight at 4°C in 24 ml of sterile distilled water. Every sample was
23
24 11 then vigorously shaken, and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech,
25
26 12 Bethesda, MD) on selective medium to enumerate bacterial population sizes. These tests were
27
28 13 repeated at least three times for every bacterial strain.
29
30
31
32
33

34 14 **Biofilm and pellicle assay.** The method developed by Yap et al. (2005) was used and
35
36 15 completed with a crystal violet coloration step. Bacterial cultures were suspended in SOBGM to
37
38 16 approximately 1×10^7 CFU/ml. Cultures were incubated at 28°C in stationary 13 mm glass
39
40 17 tubes for 7 days. Pellicle and biofilm formation were evaluated by visual examination of the
41
42 18 culture surface and of the size of the ring deposited on the glass. Then liquid cultures were
43
44 19 eliminated from tubes and remaining biofilms adherent to the glass were stained with 5 ml of
45
46 20 a 1% (wt:vol) CV solution. After 15 min incubation CV solution was discarded and tubes
47
48 21 were gently rinsed by adding 5 ml of sterile water three times. Biofilm formation was
49
50 22 observed visually.
51
52
53
54

55 23 **Pathogenicity tests.** Tests were performed by immersing whole trifoliolate leaf of bean
56
57 24 at the V3 stage (Michael 1994) into bacterial suspensions calibrated at 1×10^7 and 1×10^6
58
59 25 CFU/ml. One leaf per plant and three plants per strain were inoculated. Symptoms were
60

1 recorded on the 11th day following inoculation. Symptom development on each inoculated
2 leaflet was individually scored using the following scale: 1: no symptom; 3: 1 to 20 spots; 6:
3 21 to 40 spots; 9: > 41 spots, and 11: leaf death.

4 **Sterilization of the leaf surface and dynamics of bacterial population sizes in bean**
5 **phyllosphere.** Plants at the first trifoliolate stage (Michael 1994) were spray-inoculated until
6 runoff with bacterial suspensions at 1×10^6 CFU/ml. The first trifoliolate leaf of five plants was
7 sampled 3 hours, and 1, 4 and 11 days after inoculation. To remove planktonic cells and have
8 access to the adherent and aggregated phyllospheric bacterial populations, a surface
9 sterilization assay was used. One leaflet of each leaf was placed during 3 min in a saturated
10 chloroform vapor box (1 ml of chloroform in 0.37 dm^3 closed box) and then its bacterial
11 content was analyzed. The two other leaflets were directly analyzed for their bacterial content.
12 Total bacterial population sizes were quantified by adding 10 ml of distilled water to the
13 leaflets and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at maximum
14 power. Every sample and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech, Bethesda,
15 MD) on appropriate media to enumerate inoculated strain.

16 We analyzed the behavior of aggregated cells and planktonic cells faced to chloroform
17 vapors. Six independent cultures of CFBP4834-R biofilms were produced as described above
18 in SOBG medium in glass tubes during 11 days. Cultures were then filtered on Isopore
19 polycarbonate filters (pore diameter: $5 \mu\text{m}$) to retain aggregated cells. Tubes were rinsed
20 twice with sterile distilled water to remove adherent biofilms and finally filters were rinsed
21 once more with sterile distilled water. The filtered suspensions were filtered on polycarbonate
22 filters (pore diameter: $0.22 \mu\text{m}$) to retain planktonic cells. Three filters of planktonic cells and
23 three filters of biofilm cells were faced to chloroform vapors as described above. All 12 filters
24 were sonicated for 2 min in 20 ml of sterile distilled water at 70% sonicator amplitude with
25 pulsations (1s off and 2 s on), namely an energy of sonication of 0.45 W/ml . Cell counts of

1 every suspension were determined by dilution plating.

2 **Frequencies of transmission to seeds and associated bacterial population sizes.**

3 Beans at the flower bud stage (Michael 1994) were spray-inoculated until runoff with
4 bacterial suspensions at 1×10^5 CFU/ml. Bacterial population sizes were quantified in flower
5 buds from five plants 3 hours after spray-inoculation and in seeds from 50 plants six weeks
6 after inoculation. Samples (flower buds or seeds) were bulked per plant. Bulks of flower buds
7 were weighed and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at
8 maximum power in 5 ml of distilled water. Seeds were carefully extracted from asymptomatic
9 pods without any exogenous contamination. For that, in a sterile environment using gloves,
10 every pod was dissected with a sterile scalpel taking care not to touch the seeds. Once the pod
11 was opened, seeds were detached one by one from the pod using sterile forceps. By this
12 method, seeds never enter in contact with the external surface of the pod nor with any
13 contaminated material. Seeds were soaked overnight at 4°C in 2 ml of sterile distilled water
14 per g of seeds (5.56 seeds/g). Samples were then weighed and vigorously shaken. To quantify
15 population sizes of mutants and to look for reversion events aliquots of 500 µl of samples and
16 appropriate dilutions were plated on 10% TSA-R or 10% TSA-R-Km medium. For every
17 sample, the identity of ten colonies grown on 10% TSA-R was confirmed by PCR with
18 appropriate primers (Table 1).

19 To compare the occurrence of the floral and the vascular pathways in bacterial
20 transmission to seeds two different inoculation methods were used. On a first set of plants
21 direct flower bud inoculation was performed by depositing 20 µl of a 1×10^6 CFU/ml
22 inoculum per flower bud on three groups of flower buds per plant taking every possible
23 precaution to avoid dispersion of the inoculum on leaves. After inoculum drying, inoculated
24 flower buds were enclosed in transparent cellophane bags to avoid any subsequent
25 contamination of leaf by contact with inoculated flowers. On a second set of plants, three

1 groups of flower buds per plant were protected with transparent cellophane bags before plants
2 were inoculated by spraying the phyllosphere with a 1×10^5 CFU/ml inoculum. Three hours
3 after inoculations bacterial population sizes were quantified on leaves bulked per plant when
4 flower buds were inoculated by depositing drops of inoculum, and on the third trifoliate leaf
5 for spray inoculated plants. Bacterial population sizes were also quantified in inoculated and
6 protected flower buds. At harvest (six weeks after inoculation) bacterial population sizes were
7 quantified in seeds extracted from pods as described above. Three plants per strain and per
8 treatment were analyzed the day of inoculation and 10 plants per strain and per treatment at
9 harvest. Sample analyses were performed as described above.

10 **Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using Statbox Pro software
11 (Grimmer Logiciels, Optima France). Log-transformed data were analyzed with Kruskal-
12 Wallis and Mann-Whitney tests. Comparisons of transmission frequencies were based on a
13 Pearson's χ^2 test. To compare paired population sizes quantified on selective and non selective
14 media Wilcoxon's signed-ranks test for two groups was used (Sokal and Rohlf 1969).

16 Acknowledgments

18 This work was supported by grant from Conseil Régional des Pays de la Loire. We are
19 grateful to M. Arlat and E. Lauber for providing strains and mutagenesis protocol. We thank
20 J. Benard and P. Horeau for plant production, K. Goislot for assistance, T. Boureau and J.-P.
21 Paulin for critical reviews of the manuscript.

23 Literature Cited

- 1
2
3 1 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, N., and Lipman,
4
5 2 D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
6
7 3 programs. *Nucleic Acids Res.* 25.
8
9
10 4 Arlat, M., Gough, C.L., Barber, C.E., Boucher, C., and Daniels, M.J. 1991. *Xanthomonas*
11
12 5 *campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas*
13
14 6 *solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 593-601.
15
16
17 7 Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A., and Boucher, C. 1992.
18
19 8 Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas*
20
21 9 *solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 187-193.
22
23
24 10 Astua-Monge, G., Freitas-Astua, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, S.A., and
25
26 11 Machado, M.A. 2005. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of
27
28 12 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* 187: 1201-1205.
29
30
31 13 Barak, J.D., Gorski, P., Naraghi-Arani, P., and Charkowski, A.O. 2005. *Salmonella enterica*
32
33 14 virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ.*
34
35 15 *Microbiol.* 71: 5685-5691.
36
37
38 16 Barnhart, M.M., and Chapman, M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev.*
39
40 17 *Microbiol.* 60: 131-147.
41
42
43 18 Cao, H., Baldini, R.L., and Rahme, L.G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants
44
45 19 and animals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 259-284.
46
47
48 20 Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., and Pelicic, V. 2006. A systematic genetic analysis in
49
50 21 *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality,
51
52 22 stabilization and export of type IV pili. *Mol. Microbiol.* 61: 1510-1522.
53
54
55 23 Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause
56
57 24 of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
58
59
60

- 1
2
3 1 Cotter, S.E., Surana, N.K., and St Geme, J.W., 3rd. 2005. Trimeric autotransporters: a distinct
4
5 2 subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 13: 199-205.
6
7
8 3 Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. 2004. Type IV pilus structure and bacterial
9
10 4 pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 363-378.
11
12
13 5 da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-
14
15 6 Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini,
16
17 7 M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina,
18
19 8 L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B.,
20
21 9 Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C.,
22
23 10 Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali,
24
25 11 E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J.,
26
27 12 Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira,
28
29 13 M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola,
30
31 14 L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M.,
32
33 15 Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the
34
35 16 genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-
36
37 17 463.
38
39 18 Danhorn, T., and Fuqua, C. 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu.*
40
41 19 *Rev. Microbiol.* 61: 401-422.
42
43
44 20 Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C.,
45
46 21 and Jacques, M.A. 2008. The Type III Secretion System of *Xanthomonas fuscans* subsp.
47
48 22 *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of
49
50 23 susceptible beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2669-2678.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 1 DeFlaun, M.F., Marshall, B.M., Kulle, E.P., and Levy, S.B. (1994) Tn5 insertion mutants of
4
5 2 *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. Appl. Environ. Microbiol.
6
7 3 60: 2637-2642.
8
9
10 4 Devoret, R., and Blanco, M. 1970. Mutants of *Escherichia coli* K12 (λ)+ non-inducible by
11
12 5 thymine deprivation. Mol. Gen. Genet. 107: 272-280.
13
14
15 6 Feil, H., Feil, W.S., and Lindow, S.E. 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of
16
17 7 *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. Phytopathology 97: 318-
18
19 8 324.
20
21
22 9 Fenton, A., Fairbairn, J.P., Norman, R., and Hudson, P.J. 2002. Parasite transmission:
23
24 10 reconciling theory and reality. J. Anim. Ecol. 71: 893-905.
25
26
27 11 Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F., and Signer, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid
28
29 12 in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol.
30
31 13 167: 66-72.
32
33
34 14 Finlay, B.B., and Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited.
35
36 15 Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 136-169.
37
38
39 16 Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M., and Oberender, H. 1997. Primer design
40
41 17 for a prokaryotic differential display RT-PCR. Nucleic Acids Res. 25: 1830-1835.
42
43
44 18 Foreman-Wykert, A.K., and Miller, J.F. 2003. Hypervirulence and pathogen fitness. Trends
45
46 19 Microbiol. 11: 105-108.
47
48
49 20 Gerlach, R.G., and Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular
50
51 21 armory of Gram-negative pathogens. Int. J. Med. Microbiol. 297: 401-415.
52
53
54 22 Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial
55
56 23 diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 45: 371-397.
57
58
59 24 Glazebrook, J., and Walker, G.C. 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. Method.
60 25 Enzymol. 204: 398-418.

- 1
2
3 1 Goel, A.K., Rajagopal, L., Nagesh, N., and Sonti, R.V. 2002. Genetic locus encoding
4 functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in
5
6 2
7
8 3
9
10 4
11
12 5
13
14
15 6
16
17 7
18
19 8
20
21
22 9
23
24
25 10
26
27 11
28
29 12
30
31
32 13
33
34 14
35
36 15
37
38 16
39
40
41 17
42
43 18
44
45 19
46
47
48 20
49
50 21
51
52 22
53
54
55 23
56
57
58
59
60
- Goel, A.K., Rajagopal, L., Nagesh, N., and Sonti, R.V. 2002. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 184: 3539-3548.
- Gorski, P., Palumbo, J.D., and Mandrell, R.E. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 258-266.
- Guilhabert, M.R., and Kirkpatrick, B.C. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 856-868.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* 163: 233-255.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hirano, S. S., and C. D. Upper. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 624–653.
- Hoiczyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J.* 19: 5989-5999.
- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W., 3rd, and Normark, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73: 887-901.

- 1
2
3 1 Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv.
4
5 2 *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of
6
7 3 field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2008-2015.
8
9
10 4 Kaiser, D. 2007. Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol.*
11
12 5 17: 561-570.
13
14
15 6 Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. 2002. *Ralstonia solanacearum*
16
17 7 requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and
18
19 8 virulence. *Mol. Microbiol.* 46: 427-437.
20
21
22 9 Kim, J.F., Ham, J.H., Bauer, D.W., Collmer, A., and Beer, S.V. 1998. The *hrpC* and *hrpN*
23
24 10 operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of
25
26 11 hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Mol. Plant-Microbe*
27
28 12 *Interact.* 11: 563-567.
29
30
31 13 Klemm, P., and Schembri, M.A. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med.*
32
33 14 *Microbiol.* 290: 27-35.
34
35
36 15 Koretke, K.K., Szczesny, P., Gruber, M., and Lupas, A.N. 2006. Model structure of the
37
38 16 prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J. Struct. Biol.* 155: 154-
39
40 17 161.
41
42
43 18 Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R., and Lasa, I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C. R.*
44
45 19 *Biol.* 329: 849-857.
46
47
48 20 Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H.,
49
50 21 Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H.,
51
52 22 Koh, N.H., Seo, J.S., and Go, S.J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae*
53
54 23 pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33:
55
56 24 577-586.
57
58
59
60

- 1
2
3 1 Marx, C.J., and Lidstrom, M.E. 2002. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker
4 recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* 33: 1062-1067.
5
6 2
7
8 3 Matthyse, A.G., and McMahan, S. 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is
9 reduced in *cel*, *attB*, *attD* and *attR* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2341-2345.
10
11 4
12
13 5 Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 289-314.
14
15 6 Maude, R.B. 1996. Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. CAB
16 International, Oxon, UK.
17
18 7
19
20 8 Mazar, J., and Cotter, P.A. 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin
21 suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62: 641-654.
22
23 9
24
25 10 McCallum, H., Barlow, N., and Hone, J. 2001. How should pathogen transmission be
26 modelled? *Trends Ecol. Evol.* 16: 295-300.
27
28
29 12 Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility.
30
31 13 Nature 407: 98-102.
32
33
34 14 Michael, T.E. 1994. The bean plant. Pages 1-4 in: *Compendium of bean diseases*. R. Hall, ed.
35 APS Press, Saint Paul.
36
37 15
38
39 16 Newman, K., Almeida, R.P.P., Purcell, A.H., and Lindow, S.E. 2004. Cell-cell signaling
40 controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
41 U.S.A. 101: 1737-1742.
42
43 18
44
45 19 Ngugi, H. K., and Scherm, H. 2006. Biology of flower-infecting fungi. *Annu. Rev.*
46 *Phytopathol.* 44: 261-282.
47
48 20
49
50 21 Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M., and Goldman, A. 2004.
51
52 22 The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel
53 beta-roll. *Embo J.* 23: 701-711.
54
55 23
56
57 24 O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development.
58
59 25 *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
60

- 1
2
3 1 O'Toole, G.A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas*
4
5 2 *fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic
6
7 3 analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
8
9
10 4 Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K.,
11
12 5 Nurmiaho-Lassila, E.L., Wengelnik, K., Bonas, U., and Korhonen, T.K. 1997.
13
14 6 Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen
15
16 7 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 179: 1280-1290.
17
18
19 8 Oke, V., and Long, S.R. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the
20
21 9 *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32: 837-849.
22
23
24 10 Piper, K.R., Von Bodman, S.B., Hwang, I., and Farrand, S.K. 1999. Hierarchical gene
25
26 11 regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by
27
28 12 opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 32: 1077-1089.
29
30
31 13 Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:
32
33 14 715-727.
34
35
36 15 Puhler, A., Arlat, M., Becker, A., Gottfert, M., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. 2004. What can
37
38 16 bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr. Opin. Plant Biol.*
39
40 17 7: 137-147.
41
42
43 18 Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J.,
44
45 19 Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B.L., Zeng, S., Gu, W.Y., Lu, G., Rong, L.,
46
47 20 Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L.,
48
49 21 and He, C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of
50
51 22 phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15.
52
53
54 23 Ray, S.K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., and Sonti, R.V. 2002. A high-molecular-weight outer
55
56 24 membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial
57
58
59
60

- 1
2
3 1 adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. Mol.
4
5 2 Microbiol. 46: 637-647.
6
7
8 3 Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M., and Nunn, D.N. 1998.
9
10 4 Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Mol.
11
12 5 Plant-Microbe Interact.: 1048-1056.
13
14
15 6 Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W.L., Doyle, J.J., and Collmer, A. 2002. HecA, a member of a
16
17 7 class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment,
18
19 8 aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16
20
21 9 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 13142-13147.
22
23
24 10 Rosenblueth, M., and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions
25
26 11 with hosts. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 827-837.
27
28
29 12 Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E.,
30
31 13 Stromberg, V.K., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv.
32
33 14 *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse)
34
35 15 sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom.
36
37 16 rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp.
38
39 17 nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X.*
40
41 18 *smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and
42
43 19 Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom.
44
45 20 rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X.*
46
47 21 *fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 28: 494-518.
48
49
50 22 Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. 1969. Biometry. The principles and practice of statistics in
51
52 23 biological research. W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
53
54
55 24 Stockwell, V. O. 2005. Flowers: diverse and mutable microbial habitats. Phytopathology 95:
56
57 25 S128.
58
59
60

- 1
2
3 1 Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L.,
4
5 2 Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F.,
6
7 3 Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O.,
8
9 4 Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorholter, F.J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D.,
10
11 5 and Kaiser, O. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant
12
13 6 pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete
14
15 7 genome sequence. *J. Bacteriol.* 187: 7254-7266.
16
17
18 8 Tobe, T., and Sasakawa, C. 2002. Species-specific cell adhesion of enteropathogenic
19
20 9 *Escherichia coli* is mediated by type IV bundle-forming pili. *Cell Microbiol* 4: 29-42.
21
22
23 10 van Doorn, J., Hollinger, T.C., and Oudega, B. 2001. Analysis of the type IV fimbrial-subunit
24
25 11 gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow
26
27 12 disease in Hyacinths. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 598-607.
28
29
30 13 Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*.
31
32 14 *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
33
34
35 15 Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus
36
37 16 *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90: 677-682.
38
39
40 17 Vidaver, A.K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight
41
42 18 of bean. Pages 40-44 in: *Xanthomonas*. J.G. Swings, and E.L. Civerolo, eds. Chapman &
43
44 19 Hall, London.
45
46
47 20 West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. 2006. Social evolution theory for
48
49 21 microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 597-607.
50
51
52 22 Yap M.-N., C.-H. Yang, J.D. Barak, C.E. Jahn, and A.O. Charkowski. (2005). The *Erwinia*
53
54 23 *chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior. *J. Bacteriol.*
55
56 24 187 :639-648.
57
58
59
60 25

1 **Author-Recommended Internet Resources**

2

3 NCBI BLAST webpage:

4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

5 EMBL-European Bioinformatics Institute, InterProScan sequence search webpage:

6 <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>.

7 EMBL-European Bioinformatics Institute, ClustalW2 webpage:

8 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>.

1 **Table 1.** PCR primers used in this study to construct and validate mutations in *pilA*, *fhaB*, *xadA1*, *xadA2*, *yapH* of *X. fuscans* subsp. *fuscans*

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

2 CFBP4834-R.

Target gene (gene name) ^a	PCR primer code	Nucleotide sequence ^b	Relevant characteristic	PCR fragment size
<i>pilA</i> (<i>XAC3805</i>)	PilA1-F	CCGAATTCTCGATGGACCGGTGCGTATCTAT	<i>EcoRI</i> site	604 bp
	PilA1-R	CTGCGCGCGGCCGCCGGCGCGATGGACGGAT	<i>NotI</i> site	
	PilA2-F	CGCGGGCCCCGGCCTATAACGATTAAGCCGC	<i>ApaI</i> site	
	PilA2-R	GTGGAGCTCCACCCACTGCGCCAGACCTT	<i>SacI</i> site	
	Pil-ext-R	GGAAAGCGGGTCGTTGTTGG	To be used with PilA1-F	
<i>fhaB</i> (<i>XAC1815</i>)	FhaB-F	CGGACTAGTTGTCGCAGGCGACGCATTG	<i>SpeI</i> site	563 bp
	FhaB-R	CTGGCTCGAGAGCGATCACCTTTGCGCTGTTA	<i>XhoI</i> site	
	FhaB-ext-R ^{c, d}	AGCTGGCCATTACTGACAATGCTG	To be used with ProF ^c To be used with FhaB-F ^d	
<i>xadA1</i> (<i>XCV3670</i>)	XadA1-F	GGGACTAGTCCATCGGCGCCAATAGCCA	<i>SpeI</i> site	377 bp
	XadA1-R	CACCTCGAGCAACTGCGCAACGTTGAC	<i>XhoI</i> site	
	XadA1-ext-F ^c	AATGCGCAATCGGTCGAAGT	To be used with ProR	
	XadA1-ext-R ^d	CGCTGTCGCCTTCGACATA	To be used with XadA1-F	

1					
2					
3	<i>xadA2</i>	XadA2-F	CTC <u>ACTAGT</u> TGGGAAATACGCAGGGGAGA	<i>SpeI</i> site	
4					474 bp
5	(XCV3672)	XadA2-R	GGCTCGAGCCGTTGGCATCGTAATCAAACAC	<i>XhoI</i> site	
6					
7		XadA2-ext-F ^c	ATTTATCTGGAGGCTGGTCG	To be used with ProR	607 bp
8					
9		XadA2-ext-F2 ^d	ACCGGGCCCATCCAGGGCGCCAGCTACAACAACGTC	To be used with XadA2-ext-R2	425 bp
10					
11		XadA2-ext-R2 ^d	CTGGAGCTCGCGGTGTCGTTGGGGCCATGCGCATAACGC	To be used with XadA2-ext-F2	
12					
13					
14	<i>yapH</i>	YapH-F	TGG <u>ACTAGT</u> ACGCAGCCATTGGCAATTGGG	<i>SpeI</i> site	
15					326 bp
16	(XAC2151)	YapH-R	CCGCTCGAGTTGAGTGTGGAATTGGTACCGC	<i>XhoI</i> site	
17					
18					
19		YapH-ext-R ^{c, d}	AAACGCGGCCGCTGATGGTGCCTGAG	To be used with ProF ^c	860 bp ^c
20					
21					To be used with YapH-F ^d
22					738 bp ^d
23		ProR	TTCACGGGTTGGGGTTTCTACA	pVO155 primer	
24		ProF	GAGATCCCCAGCCCGCCTAATG	pVO155 primer	
25					
26					
27	<i>XCV4203</i>	4203-F	CGG <u>ACTAGT</u> CACCATCAATGCCGTCAA	<i>SpeI</i> site	
28					482 bp
29		4203-R	CTGCCTCGAGACCGGCGAGCGTGATG	<i>XhoI</i> site	
30					
31					
32	<i>XCV4444</i>	4444-F	CTA <u>ACTAGT</u> GCACCAATATGGCTGCAGGCG	<i>SpeI</i> site	
33					355 bp
34		4444-R	CC <u>ACTCGAGT</u> CTTCCAGCGGAAACGTGT	<i>XhoI</i> site	
35					
36	<i>orf3</i>	Orf3-F	TGATACTAGTCCAGGGCAGCATGTGCC		
37					262 bp
38	(AAG38836) ^e	Orf3-R	AGATAGAGCTCGTGCACCTCCACGC		
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					

- 1
2
3 1 ^a NCBI gene name, XAC- indicates a gene in *X. axonopodis* pv. *citri* ATCC33913 genome and XCV- in *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10
4
5
6 2 genome.
7
8 3 ^b underlined sequences indicates the relevant restriction site and bold sequences indicates stop codon added to the primer.
9
10 4 ^c primers used to identify mutants in *in planta* tests.
11
12 5 ^d primers used to confirm that no mRNA were transcribed from the mutated gene.
13
14
15 6 ^e NCBI locus AAG38836 corresponds to the *orf3* in a cluster of genes implied in xanthomonadin biosynthesis in *X. oryzae* pv. *oryzae* BXO1.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table 2. Transmission rates of *X. fucans* subsp. *fucans* strain CFBP4834-R and of mutants 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH to bean seeds after spray inoculation (1×10^5 CFU/ml) of plants at the flower bud stage. The rates of plants producing contaminated seeds out of 50 inoculated plants for each strain are indicated followed by the mean bacterial population sizes per g of seeds (and SEM) for plants with contaminated seeds.

Strain	Transmission rate	Bacterial population size
		(Log CFU/g Fr. wt.) (SEM)
CFBP4834-R	0.68	3.77 (0.45)
4834PILA	0.40*	3.06 (0.48)
4834FHAB	0.58	4.43 (0.51)
4834XADA1	0.70	3.77 (0.40)
4834XADA2	0.72	4.29 (0.39)
4834YAPH	0.75	3.77 (0.42)

* indicate significant ($p < 0.05$) different values from the wild type CFBP4834-R, according to a χ^2 test

Table 3. Transmission rates to bean seeds and associated mean population sizes of the wild type CFBP4834-R and 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA2 and 4834YAPH strains through the floral and the vascular pathways. Transmission to seeds through the floral pathway was determined following inoculations of flower buds by depositing 20 μ l of a 1×10^6 CFU/ml inoculum per flower bud on three groups of flower buds per plant. Transmission to seeds through the vascular pathway was obtained by spraying the phyllosphere of plants with a 1×10^5 CFU/ml suspension; flower buds were protected with transparent cellophane bags before plants were inoculated. Six weeks after inoculation bacterial population sizes were quantified in seeds from ten plants per strain and per treatment.

Strains	Floral pathway		Vascular pathway	
	Transmission rate	Bacterial population sizes (Log CFU/g Fr. wt.) (SEM)	Transmission rate	Bacterial population sizes (Log CFU/g Fr. wt.) (SEM)
CFBP4834-R	0.8	6.06 (0.75)	0.6	1,80 (0.40)
4834PILA	0.9	4.81 (0.83)	0.1	1.34 (nd)
4834FHAB	0.9	6.79 (0.41)	0.2	0.96 (0.18)
4834XADA2	1	7.06 (0.21)	0.1	0.78 (nd)
4834YAPH	0.9	6.87 (0.67)	0.5	3.91 (1.15)

nd : not determined

Table 4. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics	Source or reference
Plasmids		
pVO155	Derivative plasmid of pUC19 containing the promoterless <i>gus</i> (<i>uidA</i>) gene; Km ^R , Amp ^R , Bleo ^R	(Oke and Long 1999)
pRK600	Cm ^R , <i>traRK2</i> , <i>oriColE1</i>	(Finan et al. 1986)
pCM184	Broad-host-range allelic exchange vector	(Marx and Lidstrom 2002)
pCM157	Broad-host-range <i>cre</i> expression vector	(Marx and Lidstrom 2002)
Strains		
CFBP4834-R	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R wild-type; Rif ^R	(Jacques et al. 2005)
K12	<i>Escherichia coli</i> wild type strain	(Devoret and Blanco 1970)
DH5 α	<i>E. coli</i> F, Φ 980 <i>lacZ</i> :M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> ,:(<i>lacZYA-argF</i>)U169	(Hanahan 1983)
Mutants		
4834FHAB	CFBP4834-R <i>fhaB</i> (592)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834XADA1	CFBP4834-R <i>xadA1</i> (618)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study

1			
2			
3	4834XADA2	CFBP4834-R <i>xadA2</i> (538)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4			
5	4834YAPH	CFBP4834-R <i>yapH</i> (356)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
6			
7			
8	4834PILA	CFBP4834-R Δ <i>pilA</i>	This study
9			

10 *numbers indicate the position from start codon of pVO155 insertion in the target gene in *X. citri* subsp. *citri* str. 306.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

For Peer Review

1
2
3 **FIG. 1.** Verification of the absence of transcription of the mutated genes in 4834FHAB,
4 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH strains by RT-PCR on mRNAs. PCR
5 amplifications using specific primer sets (Table 1) were run on cDNAs synthesized on
6 extracted mRNAs from cultures of the different strains (lanes 6, 8, 10 and 12) and on DNAs
7 as positive control (lanes 5, 7, 9 and 11). HrpG-F and HrpX-R2 primers (Darsonval et al.
8 2008) designed in two contiguous genes with opposite orientations *hrpG* and *hrpX* were used
9 to show the absence of contaminant DNA in each sample; one example is given in lanes 2
10 (control on DNA) and 3 (no amplification from cDNA). Primers (Table 2) designed in *orf3* of
11 the *pig* locus of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BX01 (Goel et al. 2002) were used as positive
12 control for each sample as this gene is transcribed in our conditions, one example is given in
13 lanes 4 (amplification from DNA) and 5 (amplification from cDNA); lane 1: 1kb ladder
14 (Invitrogen).

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 **FIG. 2.** Quantification of adhesion of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFB4834-R and
34 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH mutants on
35 polypropylene microtiter plates. Crystal violet-stained, surface-attached cells were quantified
36 by solubilizing the dye in ethanol and determination of the absorbance at 600 nm. Error bars
37 represent the SD. Different letters refers to significantly different values based on a Mann-
38 Whitney test. Three repetitions were monitored with similar results.

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50 **FIG. 3.** Observation of *in vitro* biofilm formation by *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain
51 CFB4834-R and 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH
52 mutants. Biofilms adherent to the glass tubes were stained with crystal violet after seven days
53 of stationary culture at 28°C in SOBG.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **FIG. 4.** Quantification of adhesion of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFB4834-R and
4 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH mutants to bean seeds.
5
6 Bars represent the ratio of the number of attached cells on seeds after 25 min (white) or 2 h
7 (black) incubation in inoculum suspensions (#Ac) versus the total number of inoculated cells
8 (#Ic). Error bars represent the SEM. Inoculum was calibrated at 1×10^5 CFU ml⁻¹. For a given
9 time of contact, different letters refer to significantly different values based on a Mann-
10 Whitney test. Three repetitions of the assay were done with similar results.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

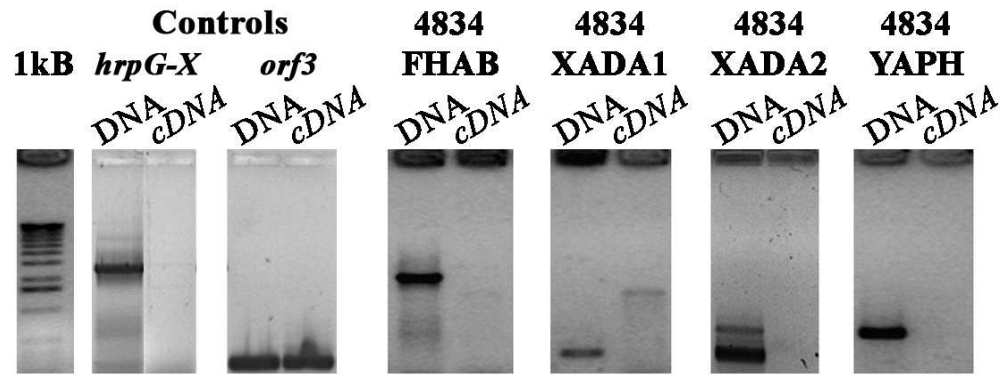
22 **FIG. 5.** Severity on bean of wild-type CFBP4834-R, and mutants 4834PILA, 4834FHAB,
23 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH after bathing the first trifoliolate leaf in 1×10^5
24 CFU/ml and 1×10^6 CFU/ml inocula. Disease symptoms were scored 11 days after inoculation
25 by quantification of symptoms on the three leaflets of each inoculated leave according to the
26 following scale: no symptoms = 1; 1 to 20 spots = 3; 21 to 40 spots = 6; > 41 spots = 9; leaf
27 death = 11. Mean disease severity indexes and SEM were calculated from the values of five
28 plants per strain. For each inoculum concentration different letters refer to significantly
29 different values based on a Mann-Whitney test. Three repetitions of the assay were done with
30 similar results.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **FIG. 6.** Colonization of the bean phyllosphere by *X. fuscans* subsp. *fuscans* wild type
47 CFBP4834-R and selected mutants 4834PILA, 4834FHAB, 4834XADA2 and 4834YAPH.
48 Leaves were spray-inoculated (1×10^6 CFU/ml). Five leaves were analyzed by stomaching on
49 the day of inoculation, after 3 hours drying, and one, four and eleven days later. **A**, Mean
50 bacterial population sizes. **B**, Mean bacterial population sizes determined after disinfection of
51 the leaf surface with chloroform vapor on each sampling date. Error bars represent the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 standard error of the mean. Mean population sizes followed by different letters are
4
5 significantly ($p<0.05$) different on the basis of the Mann-Whitney test.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

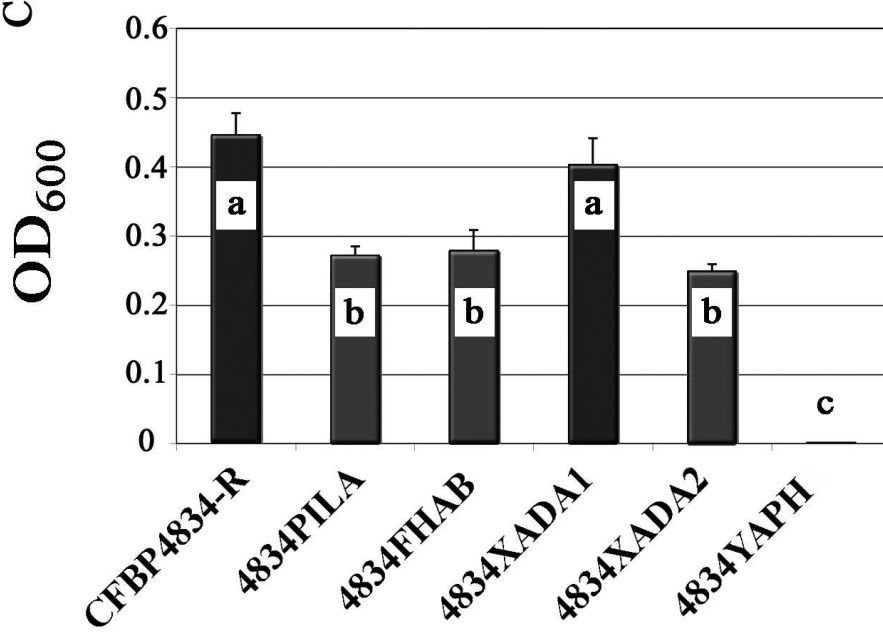
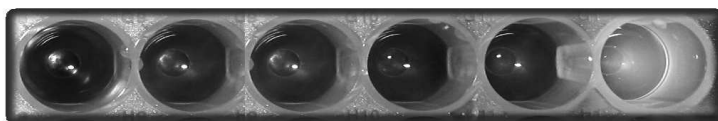


395x157mm (72 x 72 DPI)

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Crystal violet staining

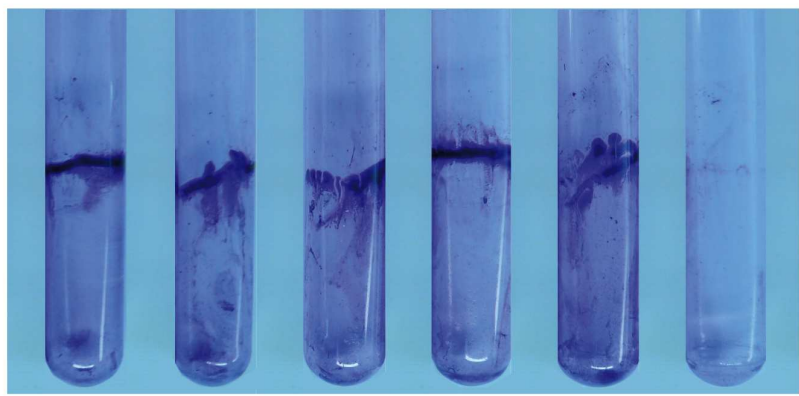


495x443mm (72 x 72 DPI)



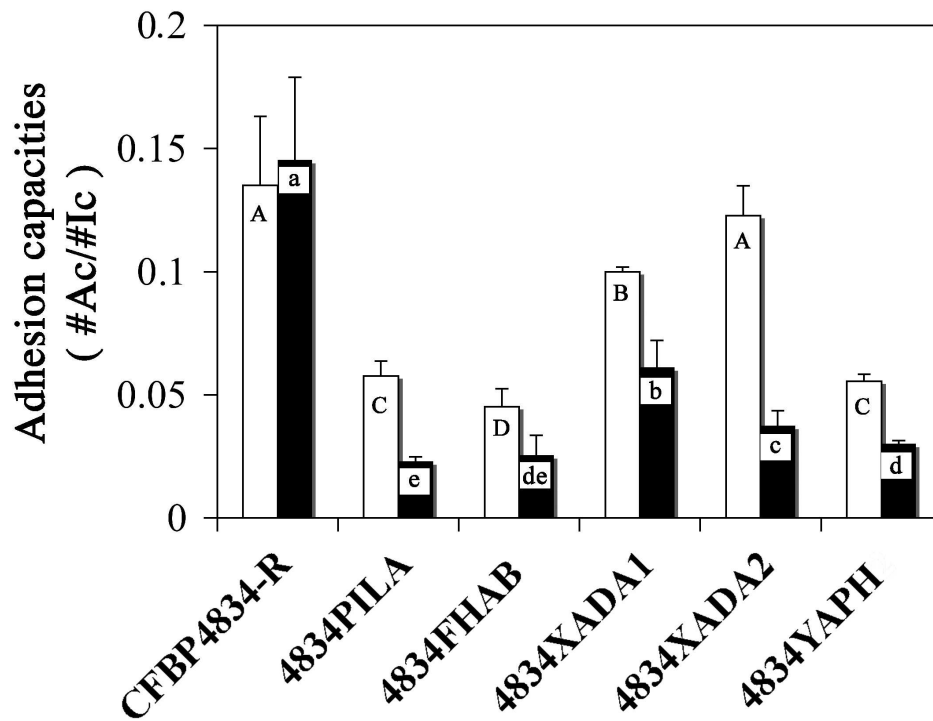
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CFBP4834-R **4834PILA** **4834FHAB** **4834XADA1** **4834XADA2** **4834YAPH**



585x416mm (72 x 72 DPI)

review

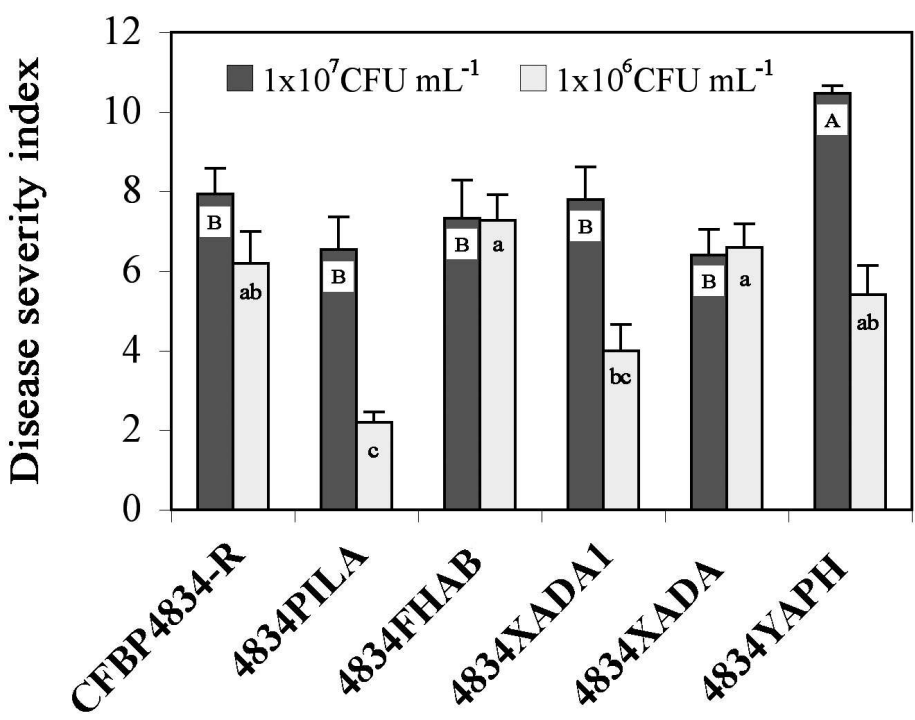


1605x1296mm (72 x 72 DPI)

view

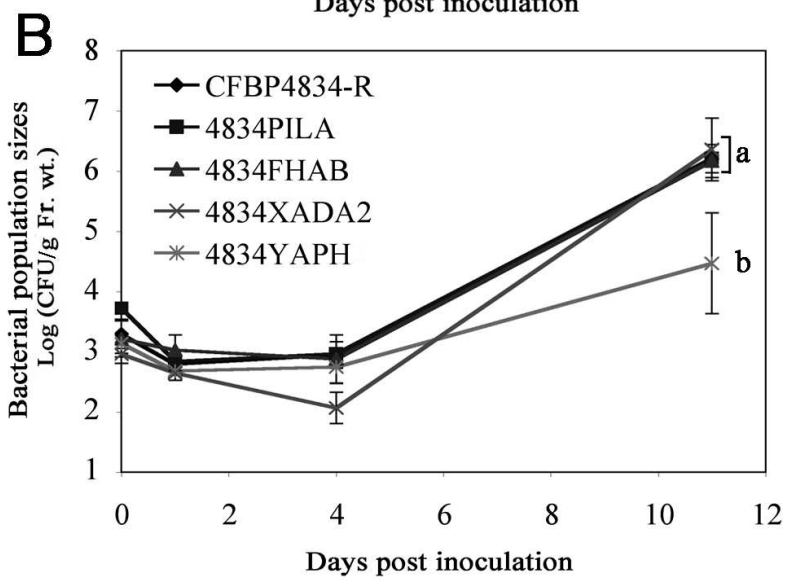
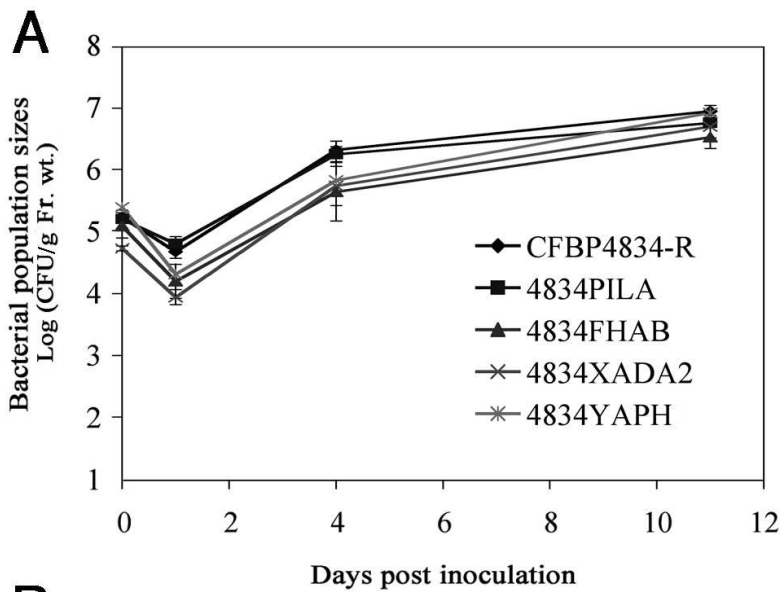
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



508x394mm (72 x 72 DPI)

view



349x520mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTERACTION ENTRE DES MUTANTS *HRP* D'*ERWINIA AMYLOVORA*, AGENT DU FEU BACTERIEN, LE PARENT PATHOGENE ET LA PLANTE HOTE : RECHERCHE DE MECANISMES MODULANT LA COMPATIBILITE

Le feu bactérien des *Maloideae* est provoqué par *Erwinia amylovora*, gamma-protéobactérie dont le pouvoir pathogène repose un système de sécrétion de type trois (T3SS). Des travaux antérieurs ont révélés que des mutants *hrp* de régulation de ce système (*hrpL*, *hrpS*), avirulents, sont capables de protéger la plante d'une infection par la souche sauvage. Nous avons d'abord voulu savoir si la protection est due à une induction de défenses chez la plante. L'étude de l'expression de gènes de défense dépendants des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique, de l'éthylène et des phénylpropanoïdes montre qu'aucune de ces voies n'est particulièrement induite par les mutants de régulation. Puis après avoir écarté l'hypothèse d'un effet direct des mutants sur la souche sauvage, nous avons recherché des différences au niveau protéique et surtout transcriptomique entre ces bactéries par des démarches avec et sans *a priori* (gènes-cibles vs cDNA-AFLP). Les résultats montrent que HrpS et HrpL sont capables de réguler différemment d'autres gènes que les gènes *hrp* : HrpL régule négativement les gènes flagellaires, le chimiotactisme et un gène du GSP, et positivement un gène du T1SS et une OMP ; HrpS régule négativement le quorum sensing et positivement un gène potentiellement impliqué dans la synthèse de l'éthylène. Nous avons particulièrement approfondi le système flagellaire d'*E. amylovora*. Une analyse bioinformatique a révélé que cette bactérie possède deux systèmes flagellaires, secrétant deux flagellines distinctes (32 vs 50 KDa). La flagelline de 32 KDa, réprimée par HrpL, ne joue pas de rôle majeur dans la protection et ne possède pas l'épitope flg22 impliqué dans l'immunité des plantes. Si notre travail n'élucide pas complètement l'origine de la protection conférée par les mutants de régulation, il apporte des informations nouvelles sur *E. amylovora* et sur la régulation de certains de ses gènes au cours de l'interaction avec son hôte.

INTERACTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* *HRP* MUTANTS WITH THE PATHOGENIC PARENT AND THE HOST PLANT LEADING TO CONTROL OF FIRE BLIGHT DISEASE OF APPLE : RESEARCH FOR THE MECHANISMS WHICH MODULATE COMPATIBILITY

Erwinia amylovora is the causal agent of fire blight, a disease that affects *Maloideae*. This gamma-proteobacteria requires a type three secretion system (T3SS) for its pathogenicity. Previous work has shown that avirulent *hrp* mutant strains of *E. amylovora* affected in regulatory functions (*hrpL* and *hrpS*) protect apple seedlings from developing fire blight symptoms. We investigated molecular mechanisms leading to this protection. In a first part of our work, we studied molecular responses of the protected plant, according to major defense pathways (salicylic acid, jasmonic acid, ethylene) and in the phenylpropanoid pathway. Results show that none of these pathways is particularly induced by *Ea hrpL* or *Ea hrpS* mutants. Then, the hypothesis of a direct effect of mutants on the wild type strain has been denied. We tried to trace differential transcripts and proteins between these bacteria through targeted and global approaches (targeted genes vs cDNA-AFLP). Results show that HrpL and HrpS are able to differentially regulate other genes than *hrp* genes : HrpL negatively regulates flagellar system, chemotaxis and genes related to GSP, and positively regulates one gene of T1SS and one OMP ; HrpS negatively regulates quorum sensing and positively regulates one gene implicated in the synthesis of ethylene. We were particularly interested in flagellar system of *E. amylovora*. An *in silico* analysis of flagellar genes led to the discovery that *E. amylovora* possesses two flagellar systems with distinct flagellins (32 vs 50KDa). The 32KDa flagellin, overexpressed in *hrpL* mutant, does not display the flg22 peptide classically implicated in elicitation and is not necessary for protection. On the whole, our work does not entirely explain the origin of the plant protection, induced by regulatory *hrp* mutants, nevertheless it provides new key information on *E. amylovora* and on the regulation of several genes during the interaction with the host plant.

SPECIALITE DOCTORALE : biologie cellulaire et moléculaire végétale

MOTS-CLES : *Erwinia amylovora*, HrpL, HrpS, MAMPs, réseau bactérien de signalisation, protection, Pommier, réactions de défense

ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 077 Pavé INRA-Agrocampus Ouest-Université d'Angers,
42 rue Georges Morel, BP 60057, 49071 Beaucouzé cedex