

Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)

Aleksandra Wlodarczyk

▶ **To cite this version:**

Aleksandra Wlodarczyk. Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii). Biologie végétale. INSA de Lyon, 2010. Français. NNT : 2010-ISAL-0019 . tel-00526977

HAL Id: tel-00526977

https://theses.hal.science/tel-00526977

Submitted on 17 Oct 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.

N° d'ordre 2010-ISAL-0019 Année 2010

THESE

présentée par

Aleksandra WLODARCZYK

devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir

le grade de Docteur

Ecole Doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation
Spécialité : **Microbiologie environnementale**

Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)*

Soutenue publiquement le 22 mars 2010 devant le jury composé de :

Mr Comte G.	Professeur Université Lyon 1, Co-directeur de thèse
Mr Faure D.	Chargé de Recherche CNRS, Rapporteur
Mme Hugouvieux-Cotte-Pattat N.	Directeur de Recherche CNRS, Directeur de thèse
Mr Lejeune P.	Professeur INSA de Lyon, Examinateur
Mme Lojkowska E.	Professeur Université de Gdansk, Rapporteur

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales 2007

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://sakura.cpe.fr/ED206 M. Jean Marc LANCELIN Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université Claude Bernard Lyon 1 Bât CPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 Fax : lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://www.insa-lyon.fr/eea M. Alain NICOLAS Insa : D. BARBIER ede2a@insa-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE AM. 64.43 – Fax : 64.54	M. Alain NICOLAS Ecole Centrale de Lyon Bâtiment H9 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 eea@ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN
E2M2	**EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION** **http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2** **M. Jean-Pierre FLANDROIS** **Insa : H. CHARLES**	**M. Jean-Pierre FLANDROIS** **CNRS UMR 5558** **Université Claude Bernard Lyon 1** **Bât G. Mendel** **43 bd du 11 novembre 1918** **69622 VILLEURBANNE Cédex** **Tél : 04.26 23 59 50 Fax 04 26 23 59 49** **06 07 53 89 13** **e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr**
EDIIS	INFORMATIQUE ET INFORMATION POUR LA SOCIETE http://ediis.univ-lyon1.fr M. Alain MILLE Secrétariat : I. BUISSON	M. Alain MILLE Université Claude Bernard Lyon 1 LIRIS - EDIIS Bâtiment Nautibus 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 44 80 53 ediis@liris.cnrs.fr - alain.mille@liris.cnrs.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE M. Didier REVEL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Cardiologique de Lyon Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69500 BRON Tél : 04.72.35 72 32 Fax : Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
	MATERIAUX DE LYON M. Jean Marc PELLETIER Secrétariat : C. BERNAVON 83.85	M. Jean Marc PELLETIER INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
Math IF	MATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE FONDAMENTALE M. Pascal KOIRAN Insa : G. BAYADA	M.Pascal KOIRAN Ecole Normale Supérieure de Lyon 46 allée d'Italie 69364 LYON Cédex 07 Tél : 04.72.72 84 81 Fax : 04 72 72 89 69 Pascal.koiran@ens-lyon.fr Secrétariat : Fatine Latif - latif@math.univ-lyon1.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE M. Jean Louis GUYADER Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12	M. Jean Louis GUYADER INSA de Lyon Laboratoire de Vibrations et Acoustique Bâtiment Antoine de Saint Exupéry 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 18 87 12 mega@lva.insa-lyon.fr
SSED	SCIENCES DES SOCIETES, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU DROIT Mme Claude-Isabelle BRELOT Insa : J.Y. TOUSSAINT	Mme Claude-Isabelle BRELOT Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Claude-isabelle.brelot@univ-lyon2.fr

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (UMR 5240 CNRS-UCBL-INSA-BayerCropScience) sous la direction de Madame Nicole HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT Directeur de Recherche et en co-direction de Monsieur le Professeur Gilles COMTE (CESN UMR 5557 CNRS-UCBL), et l'Ecole Doctorale E2M2 Monsieur Jean-Pierre FLANDROIS directeur.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Ewa LOJKOWSKA (Université de Gdansk), Monsieur Denis FAURE Chargé de Recherche (ISV UPR 2355 CNRS, Gif-sur-Yvette) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Monsieur le Professeur Philippe LEJEUNE (INSA de Lyon).

Merci aux membres des deux équipes pour leur soutien et leurs conseils scientifique ainsi qu'aux étudiants.

Je remercie l'ensemble du personnel technique de l'UMR 5240 ainsi que l'UMR 5557 pour leur support précieux fourni durant ces trois années. En particulier Floriant BELLVERT pour son aide technique et toujours prêt à répondre à mes questions.

Je tiens à remercier le personnel administratif du CESN pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur patience. Merci à Stéphane MICHALAK pour sa sympathie, ses nombreux conseils et dépannages dans mes galères d'ordinateur !

Un grand merci à Yann FERRANDEZ de m'avoir accueilli dès le début de ma thèse.

Enfin je remercie beaucoup mes parents, mes grands-parents maternels avec une pensée toute particulière pour mon grand-père paternel, si « fier » de sa petite fille, qui vient de nous quitter. Je les remercie d'avoir eu confiance en moi dans le choix de mes études et de m'avoir soutenue comme l'on fait également les membres de ma famille ainsi que mes amis.

Un grand merci à Edmond LASNIER sans lequel ma thèse n'aurait pas pût arriver à son terme.

SOMMAIRE

Remerciements 3

Sommaire 4

Liste des abréviations 8

Liste des figures 10

Liste des tableaux 12

Résumé 14

Summary 15

Streszczenie 16

Partie bibliographique

Induction par des molécules végétales de gènes impliqués dans l'interaction plante-bactérie

Introduction **17**

I. Induction des facteurs Nod pendant les interactions *Rhizobium*-plante 20

I-1 L'interaction plante-*Rhizobium*, rôle des facteurs Nod dans l'établissement de la symbiose 20

I-2 Les inducteurs flavonoïdes 22

I-3 Les inducteurs non flavonoïdes des gènes *nod* 23

I-4 Les régulateurs transcriptionnels des gènes *nod* 23

I-5 Métabolisme des signaux moléculaires induisant le gène *nod* 24

II. Induction des gènes *vir* pendant les interactions *Agrobacterium*-plante 26

II-1 Les bactéries du genre *Agrobacterium* et les maladies provoquées 26

II-2 Inducteurs des gènes *vir* 28

II-3 Les régulateurs des gènes *vir* : VirA-VirG 31

II-4 Implication de ChvE dans la détection des sucres 33

II-5 Détection de l'acidité 34

II-6 Métabolisme des composés phénoliques 35

II-7 Autres composés affectant l'interaction plante-*Agrobacterium* 36

II-8 Interférences entre molécules végétales et la régulation de type quorum sensing 37

III. Induction des phytotoxines de *Pseudomonas syringae* 39
III-1 Les symptômes et les facteurs de virulence de *P. syringae* 39
III-2 Induction de la synthèse de la syringomycine 42
III-3 Induction de la synthèse de la coronatine 43
III-4 Régulation globale des phénotypes associés aux plantes 45
IV. Induction des enzymes pectinolytiques par les *Erwiniae* 46
IV-1 Les pectate lyases et la macération 46
IV-2 Détection des produits de dégradation de la pectine 49
IV-3 Le régulateur RhaS et la réponse au rhamnose 51
IV-4 Induction des enzymes pectinolytiques par des extraits de plante 52
IV-5 Effet du pH sur les gènes de pectate-lyases 53
IV-6 Les protéines PecS et PecT impliquées dans la régulation des gènes *pel* 53
IV-7 Analyse des régulateurs de la famille LacI d'*E. chrysanthemi* 54
Conclusion, présentation du projet de thèse 60

Partie expérimentale

Recherche de signaux moléculaires impliqués dans l'induction chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*

Matériel et Méthodes 61
I. Souches et conditions de culture 61
I-1 Souches bactériennes, phages et plasmides 61
I-2 Milieux de culture 61
I-3 Conservation des souches 63
II. Techniques de génétique bactérienne 63
II-1 Préparation du lysat de phage ϕEC2 63
II-2 Transduction avec le lysat de phage ϕEC2 64
III. Techniques de biologie moléculaire 64
III-1 Extraction rapide d'ADN plasmidique 64
III-2 Digestion des plasmides par action des enzymes de restriction 65
III-3 Inactivation des enzymes et précipitation de l'ADN 65
III-4 Réalisation des PCR et clonage des fragments obtenus 66

III-5 Transformation d'*E. coli* 67
III-6 Transformation d'*E. chrysanthemi* 67
III-7 Construction des mutants par génétique inverse 68
IV. Dosage et détection d'activités enzymatiques 69
IV-1 Préparation des extraits 69
IV-2 Dosage des pectate lyases 69
IV-3 Dosage de l'activité β-glucuronidase 70
IV-4 Détection d'activités enzymatiques sur milieux solides 70
V. Test du pouvoir pathogène sur feuilles d'endives 71
V-1 Préparation des inoculums 71
V-2 Infections simples 71
V-3 Infections suivies des dosages β-glucuronidase 71
VI. Préparation des extraits végétaux 72
VI-1 Préparation d'extraits à chaud 72
VI-2 Préparation d'extraits à froid 73
VII. Fractionnements et purification 73
VII-1 Test biologique en microplaque 73
VII-2 Préparation des extraits végétaux 74
VII-3 Extraction en phase solide SPE 75
VII-4 Système analytique en HPLC HILIC 75
VII-5 Systèmes préparatifs 76
VII-5-1 Fractionnement en Sephadex 76
VII-5-1-1 Sephadex LH-20 77
VII-5-1-2 Sephadex G-10 79
VII-5-2 Séparation par HPLC RP18 79
VII-6 Détermination de la structure de molécules purifiées 80
VII-6-1 Purification des composés P12A et P12B 80
VII-6-2 Caractérisation des composés P12A et P12B 80

Résultats **83**

I. Analyse de gènes induits par des signaux moléculaires végétaux 83
I-1 Description des régions *lfa* et *lfg* 83
I-2 Construction de mutant dans les régions *lfa* et *lfg* 85
I-3 Induction par des extraits de plantes des gènes *lfaA* et *lfgN* 86

I-4 Autres conditions affectant l'expression des gènes *lfa* et *lfg* 87
I-5 Effet du régulateur LfaR sur l'expression de *lfaA* et *lfaT* 89
I-6 Effet du régulateur LfgR sur l'expression de *lfgN* et *lfgB* 90
I-7 Effet d'autres régulateurs 91
I-8 Bilan des données sur chaque région 92
II. Mise au point d'un test biologique 93
II-1 Comparaison de l'effet de différentes plantes, choix des végétaux 93
II-2 Adaptation en microplaque de la mise en évidence de l'induction 95
II-3 Analyse de l'effet inducteur de différents composés 95
III. Fractionnement des extraits végétaux 97
III-1 Poids sec de l'extrait végétal 97
III-2 Extraction en phase solide 97
III-3 Fractionnement sur gel de perméation 98
III-4 Fractions actives de pomme de terre et d'endive 99
III-5 Analyse HPLC des fractions provenant de l'extrait de pomme de terre 100
III-6 Analyse HPLC des fractions provenant de l'extrait d'endive 103
III-7 Comparaison de composés présents dans les deux extrait de plantes 103
IV. Identification de molécules purifiées 105

Discussion et Perspectives **113**

Références bibliographiques **123**

Annexe **141**

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
AHL	N-acyl-homosérine lactone
AIA	Acide indol-acétique
Amp	Ampicilline
API-ES	Atmospheric Pressure Ionization - ElectroSpray
AS	Activité spécifique
CCM	Chromatographie couche mince
Cm	Chloramphénicol
CMC	Carboxy-méthylcellulose
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Diode Array Detection
DKI	5-céto-4-désoxyuronate
DKII	2,5-dicéto-3-désoxygluconate
dNTP	désoxyribonucléotides
EI-MS	Electro Impact-Mass Spectrometer
GL	Gélose de Luria Bertani
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GUS	β-glucuronidase
HILIC	Hydrophillic Interaction Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycine
KDG	2-céto-3-désoxygluconate
LB	bouillon de Luria Bertani
M63	milieu synthétique
MFS	Major Facilitator Superfamily
MS	Mass Spectroscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGA	Polygalacturonate
PNP	*para*nitrophénol

PNPU	*para*nitrophényl–β-D-glucuronide
PSB	Poids Sec Bactérien
RC	Regenerated Cellulose
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP18	Reverse Phase C18
SPE	Solid-Phase-Extraction
T3SS	Système de sécrétion de type III
TBE	tampon Tris-Borate-EDTA
Tris	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Liste des figures

Partie bibliographique

Figure 1. Exemples de molécules végétales reconnues comme signaux pour l'induction de réponses spécifiques chez diverses bactéries associés aux plantes 19

Figure 2. Formation de nodules sur la plante hôte par des bactéries du genre *Rhizobium* 20

Figure 3. Structure des facteurs Nod 21

Figure 4. Voies de dégradation proposées pour sept flavonoïdes incubés avec une souche de *Rhizobium* 25

Figure 5. Développement de galles dues à *Agrobacterium* sur rosier et érable 26

Figure 6. Structure des monosaccharides inducteurs des gènes *vir* d'*A. tumefaciens* 30

Figure 7. Régulation des gènes de virulence d'*A. tumefaciens* par des signaux de la plante hôte 32

Figure 8. Métabolisme des inducteurs phénoliques des gènes *vir* 36

Figure 9. Effet de molécules végétales sur la modulation de la régulation de type quorum sensing chez *A. tumefaciens* 38

Figure 10. Interaction entre *Pseudomonas syringae* et plantes hôtes 41

Figure 11. Structure de composés phénoliques activant le gène *syrB* de *P. syringae* pv. syringae 43

Figure 12. Voie de biosynthèse de la coronatine chez *P. syringae* pv. glycinea 44

Figure 13. Symptômes provoqués par *E. chrysanthemi* 47

Figure 14. Les pectate-lyases : activité enzymatique et structure 48

Figure 15. Voie de dégradation de la pectine et sa régulation chez *E. chrysanthemi* 50

Figure 16. Structure des inducteurs interagissant avec le répresseur KdgR 51

Figure 17. Les régulateurs transcriptionnels d'*E. chrysanthemi* 55

Figure 18. Arbre phylogénique des régulateurs de la famille LacI 57

Figure 19. Structure du répresseur LacI lié à l'ADN 58

Matériel et Méthodes

Figure 20. Schéma de préparation des extraits végétaux pour les fractionnements 74

Figure 21. Méthode de fractionnement en phase solide 75

Figure 22. Schéma de fractionnement de l'extrait de pomme de terre 77

Figure 23. Schéma de fractionnement de l'extrait d'endive 78

Figure 24. Schéma de purification et d'analyse des composés P12A et P12B 82

Résultats

Figure 25. Localisation des gènes codant un régulateur de la famille LacI chez *D. dadantii* 83
Figure 26. Test de la virulence sur endives 84
Figure 27. Organisation génétique des loci *lfa* et *lfg* 85
Figure 28. Effet de différentes concentrations d'extraits sur les fusions *lfaA* et *lfgN* 87
Figure 29. Effet du milieu sur la fusion *lfaA* 88
Figure 30. Expression des fusions *lfaA* et *lfgN* en présence d'extraits de chair et peau de tubercules de pommes de terre 94
Figure 31. Schéma de fractionnement bio-guidé des extraits végétaux 99
Figure 32. Analyse HPLC de l'extrait total et de fractions actives obtenues à partir de l'extrait de pomme de terre 102
Figure 33. Analyse HPLC de l'extrait total et de fractions actives obtenues à partir de l'extrait d'endive 104
Figure 34. Séparation de molécule P12A et P12B en HPLC semi-préparative 106
Figure 35. Spectre de masse pour le composé P12B 106
Figure 36. Analyse RMN du composé P12B 109
Figure 37. Structure de la guanosine et spectres en RMN proton et carbone-13, et LC-MS 110
Figure 38. Co-chromatographie de la guanosine commerciale et du composé P12B identifié comme étant la guanosine 111
Figure 39. Spectre de masse du composé P12A 112

Discussion

Figure 40. Modèle de fonctionnement du système *lfa* 117

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Tableau 1. Signaux végétaux utilisés par des bactéries associées aux plantes 18

Tableau 2. Induction de la fusion *virB::lacZ* chez *A. tumefaciens* par des composés phénoliques 29

Tableau 3. Les 18 régulateurs de la famille LacI codés par le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 56

Matériel et Méthodes

Tableau 4. Souches d'*Erwinia chrysanthemi* 62

Tableau 5. Plasmides utilisés 63

Tableau 6. Mise au point des conditions en microplaque pour les fusions *lfaA* et *lfgN* 74

Tableau 7. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse en HPLC avec la colonne HILIC 76

Tableau 8. Gradient d'élution pour la séparation en HPLC semi-préparative (RP18) 79

Tableau 9. Gradient d'élution pour la purification des molécules de la fraction P12 80

Tableau 10. Paramètres de la technique d'ionisation API-ES 81

Résultats

Tableau 11. Effet d'extraits de plantes sur les fusions *lfaA* et *lfgN* 86

Tableau 12. Expression de *lfaA* et de *lfgN* en fonction de la croissance 88

Tableau 13. Effet de la température, de l'osmolarité et du glucose 89

Tableau 14. Effet du régulateur LfaR sur les fusions *lfaA* et *lfaT* 90

Tableau 15. Effet du régulateur LfgR sur les fusions *lfgN* et *lfgB* 91

Tableau 16. Effet des régulateurs PecS, KdgR, PecT et ExpR sur les fusions *lfaA* et *lfgN* 92

Tableau 17. Effet de différents extraits de plantes sur la fusion *lfaA* 93

Tableau 18. Effet de différents extraits de plantes sur la fusion *lfgN* 93

Tableau 19. Récapitulatif des composés testés pour l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN* 96

Tableau 20. Effet d'extrait de maïs et de MBOA sur les fusions *lfaA* et *lfgN* 97

Tableau 21. Analyse après extraction SPE 98

Tableau 22. Activité des fractions obtenues à partir d'extrait de pomme de terre et d'endive 100

Résumé

Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)*

Dickeya dadantii est une bactérie responsable de pourritures sur un large spectre de plantes. Sa virulence est principalement due à la sécrétion d'enzymes dégradant la paroi végétale. Ce travail de thèse a porté sur l'identification de molécules jouant un rôle de signal dans les interactions entre plantes et bactéries. Divers phytoconstituants sont connus pour être impliqués dans les phénomènes de communication entre plantes et microorganismes. Chez *D. dadantii*, nous avons caractérisé deux régions génomiques, *lfa* et *lfg*, codant des protéines exprimées seulement lors de l'infection de plantes ou en présence d'extraits végétaux. Leur expression est modulée par des répresseurs agissant différemment en présence ou absence d'inducteur. Ces régulateurs, LfaR et LfgR, contrôlent également l'expression de gènes permettant le transport de l'inducteur dans le cytoplasme bactérien. Après mise au point d'un test de criblage, la recherche de l'inducteur végétal a été réalisée à partir d'extraits de feuilles d'endive et de tubercules de pomme de terre. Plusieurs étapes chromatographiques ont permis d'obtenir plusieurs fractions actives, dont une très fortement. Cette fraction provenant de pomme de terre contient seulement deux composés qui ont été purifiés. Le composé majeur a été identifié comme étant un nucléoside, la guanosine, mais cette molécule pure n'a pas d'activité inductrice. La quantité de l'autre composé était insuffisante pour permettre l'identification de cette molécule active. Les résultats de ce travail montrent l'implication et le mécanisme d'action de petites molécules hydrophiles agissant comme signaux dans l'interaction entre la plante et *D. dadantii*.

Mots clés
Erwinia chrysanthemi, *Dickeya dadantii*, activité biologique, régulation génétique, molécule signal, fractionnement bioguidé, interaction plante-bactérie

Adresse du laboratoire
Microbiologie, Adaptation et Pathogénie
UMR 5240 CNRS – UCBL – INSA - BayerCropScience
Domaine Scientifique de la Doua
Bat. André Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne Cedex
FRANCE
http://map.univ-lyon1.fr/

Summary

Search for plant molecular signals involved in the induction of genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)*

Dickeya dadantii is an enterobacterium causing soft rot diseases in a wide range of plant species. The maceration of plant tissues is essentially caused by the secretion of a set of plant cell wall degrading enzymes. This thesis focused on the identification of molecules involved in signalling processes during biological interactions. Various secondary metabolites and phytoconstituants are known to play a role in the interactions and communication between plants and microorganisms. In *D. dadantii*, we have characterized two genomic loci, *lfa* and *lfg*, coding for proteins that are expressed only during plant infection or in the presence of plant extracts. The expression of the genes *lfaA* and *lfgN* is modulated by repressors that act differently depending on the presence or absence of the inducer. These regulators, LfaR and LfgR, also control the expression of genes involved in the transport of the inducer in the bacterial cytoplasm. After achievement of a screening test to analyse the fractions, a search for the inducer was performed in extracts from chicory leaves and potato tubers. Several chromatographic fractionations allowed the recovery of different active fractions, including a highly active fraction from potato. This fraction contained two compounds which were further purified. The main compound was identified as a nucleoside, guanosine, but the pure molecule has no inducing capacity. The low amount of the second molecule was insufficient for the final identification of the inducer. The results of this work show the involvement and mechanism of action of small hydrophilic molecules acting as signals in the interactions between plants and *D. dadantii*.

Keywords
Erwinia chrysanthemi, *Dickeya dadantii,* biological activity, genetic regulation, signalling molecule, bioguided fractionation, plant-bacterium interaction

Address of the laboratory
Microbiologie, Adaptation et Pathogénie
UMR 5240 CNRS – UCBL – INSA - BayerCropScience
Domaine Scientifique de la Doua
Bat. André Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne Cedex
FRANCE
http://map.univ-lyon1.fr/

Streszczenie

Badanie roślinnych cząsteczek sygnałowych zaangażowanych w indukcję genów w komórkach bakterii fitopatogennej *Erwinia chrysanthemi (Dickeya dadantii)*

Bakterie z gatunku *Dickeya dadantii* powodują w tkankach szeregu roślin chorobę zwaną mokrą zgnilizną. Występowanie objawów chorobowych warunkowane jest przede wszystkim przez wytwarzanie enzymów pektynolitycznych degradujących składniki ścian komórkowych roślin. Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była identyfikacja roślinnych cząsteczek sygnałowych warunkujących oddziaływania między komórkami roślinnymi i bakteryjnymi. W genomie *D. dadantii* scharakteryzowano dwa loci *lfa* i *lfg*. Geny zlokalizowane w tym regionie ulegają ekspresji gdy w środowisku jest obecny ekstrakt roślinny lub podczas infekcji tkanki roślinnej. Ekspresja, zlokalizowanych w tych loci genów strukturalnych: *lfaA* i *lfgN* jest modulowana przez białka regulatorowe - represory oddziaływujące w różny sposób w zależności od obecności lub braku induktora. Ekspresję genów, które warunkują biosyntezę białek zaangażowanych w transport induktora pochodzenia roślinnego w cytoplazmie bakteryjnej jest również kontrolowana przez regulatory LfaR i LfgR. Przeprowadzono badania zmierzające do identyfikacji cząsteczki induktora w ekstraktach z liści cykorii i bulw ziemniaka. Przeprowadzeniu frakcjonowanie ekstraktu stosując kilka różnych podłoży chromatograficznych. W efekcie otrzymano wiele frakcji wykazujących aktywność, jedna z nich była bardzo aktywna. Najaktywniejsza frakcja wyizolowana z tkanki bulw ziemniaka zawiera tylko dwa rodzaje cząsteczek, które zostały oczyszczone do homogenności. Związek, który stanowił większość frakcji aktywnej, został zidentyfikowany jako nukleozyd – guanozyna. Stwierdzono jednak, iż nie wykazuje on, w zastosowanym stężeniu, zdolności do indukcji genów regulatorowych *lfaA* i *lfgN*. Ilość drugiego, obecnego we frakcji aktywnej, związku była niewystarczająca aby zidentyfikowac jego strukturę. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy wyjaśniają mechanizm działania niskocząsteczkowych związków hydrofilnych, odgrywających rolę cząsteczek sygnałowych w interakcji między komórkami roślinnymi i komórkami *Dickeya dadantii*.

Słowa kluczowe
Erwinia chrysanthemi, Dickeya dadantii, aktywność biologiczna, regulacja genetyczna, cząsteczki sygnałowe, frakcjonowanie i wykrywanie frakcji aktywnych w wyniku testów biologicznych, oddziaływania między komórkami roślinnymi i bakteryjnymi.

Adres laboratorium
Microbiologie, Adaptation et Pathogénie
UMR 5240 CNRS – UCBL – INSA - BayerCropScience
Domaine Scientifique de la Doua
Bat. André Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne Cedex
FRANCE
http://map.univ-lyon1.fr/

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Induction par des molécules végétales de gènes impliqués dans l'interaction plante-bactérie.

Introduction

De nombreux types de bactéries sont associés à des plantes hôtes et profitent de cette association pour assurer leur nutrition en carbone et autres substances nutritives. Les événements conduisant à l'établissement de ces interactions sont basés sur la reconnaissance de signaux moléculaires spécifiques des plantes. Ces signaux sont détectés par des protéines régulatrices bactériennes qui vont adapter le métabolisme aux conditions de l'interaction (Tableau 1). Les mécanismes de reconnaissance jouent en particulier un rôle essentiel dans la gamme d'hôte des bactéries. Le cas le plus largement décrit est la reconnaissance des flavonoïdes d'origine végétale par la protéine régulatrice NodD de *Rhizobium*.

Pendant l'interaction plante-microbe, les bactéries vont s'adapter aux changements physiologiques de la plante hôte. Ces changements résultent en particulier des réactions aux activités spécifiques des bactéries qui colonisent la plante. La détection de divers signaux végétaux par les bactéries est donc un processus qui réajuste en continu la réponse bactérienne lors de l'interaction. Dans de nombreux cas, en plus de protéines régulatrices spécifiques, des régulateurs globaux peuvent jouer un rôle important dans l'ajustement du métabolisme bactérien aux conditions de l'interaction. Le processus de détection et de signalisation est très semblable, que les interactions soient bénéfiques ou non, c'est-à-dire dans les cas de symbiose comme de pathogénie.

Un bon exemple de détection de signaux de l'hôte est l'établissement de la symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses, avec l'implication de flavonoïdes mais aussi de bétaïnes ou de composés phénoliques. De même, la pathogénèse entre *Agrobacterium tumefaciens* et la plante hôte, aboutissant à la galle du collet, résulte de la perception successive de divers signaux : une combinaison entre composés phénoliques, monosaccharides et acidité pour l'induction des étapes précoces, la présence d'opines ou d'acide gamma-aminobutyrique pour l'expression de fonctions impliquées dans le maintien de l'interaction. *Pseudomonas syringae* est une autre bactérie qui a développé des mécanismes spécifiques de reconnaissance de l'hôte par l'intermédiaire de glycosides phénoliques et de sucres.

TABLEAU 1 : Signaux végétaux utilisés par des bactéries associées aux plantes
Ce tableau présente divers exemples de signaux végétaux identifiés chez des bactéries associées aux plantes. Dans chaque cas, sont indiqués les régulateurs correspondants ainsi que les cibles et phénotypes impliqués dans l'interaction avec la plante régulés par ces signaux.

Bactérie	Signal végétal	Régulateur (s)	Famille du régulateur	Opéron(s) cible	Phénotypes régulés
Rhizobium spp.	flavonoides, betaines, acides, composés phénoliques simples	NodD	famille LysR	*nod*	Synthèse du facteur Nod
Sinorhizobium meliloti	stachydrine trigonelline	?		*stc* *trc*	Catabolisme des inducteurs des gènes *nod*
Bradyrhizobium japonicum	flavonoides	NodV-NodW	système à 2-componsants	*nod*	Synthèse du facteur Nod
Agrobacterium tumefaciens	composés phénoliques (acétosyringone…), pH acide, monosaccharides (glucuronate, galacturonate…)	VirA-VirG ChvE	système à 2-componsants, protéine liant les sucres	*vir*, *rep*	transfert du T-DNA, réplication du plasmide Ti
	pH acide	ChvG-ChvI	système à 2-componsants	*virG*, *katA*, *aopA*	Régulation des gènes *vir*, catalase, protéine de la membrane externe
	monosaccharides	GbpR	famille LysR	*chv*	chimiotaxie et transport de sucres
	Agrocinopine GABA, acide salicylique…	AccR? AttJ	Famille LacI Famille IclR	*aiiB* *attM*	Lactonase codée par le plasmide Ti Lactonase codée par le plasmide At
Pseudomonas syringae pv. *syringae*	glycosides phénoliques, sucres (fructose, saccharose…)	(GacA-GacS SyrF, SalA)	système à 2-componsants, famille LuxR famille LuxR	*syr*	production de syringomycine
P. syringae pv. *tomato*	Shikimate, quinate, malate, citrate, sucres (glucose, inositol…)	(CorS-CorR)	système à 2-componsants	*cor*	production de coronatine
	limitation en nutriments	HrpL	Facteur Sigma	*hrp*, *avr*	sécrétion de type III et effecteurs
Erwinia chrysanthemi	métabolites de la pectine (DKI, DKII, KDG)	KdgR	famille IclR	*pel*, *pem*, *out*, *ogl*, *kduDI*, *kdgKA*	catabolisme de la pectine
	?	PecS	famille MarR	*peh*, *pel*, *cel*, *fli*	pectate-lyases, mobilité
	?	PecT	famille LysR	*pel*, *cel*, *prt*, *eps*, *fli*	pectate-lyases, cellulases, protéases, production d'exopolysaccharides, mobilité
	extraits de plantes	Pir	famille IclR	*pel*	pectate-lyases
	rhamnose	RhaS	Famille AraC	*rhiE*, *rhiTN*	Catabolisme du rhamnogalacturonane
Erwinia carotovora	extraits de plantes	AepA	?	*pel*, *cel*, *peh*, *prt*	pectate-lyases, cellulases, protéases
	?	RexZ	famille IclR	*pel*, *cel*, *prt*	pectate-lyases, cellulases, protéases
	agents endommageant l'ADN	RdgA RdgB (+RecA)	Famille LexA Famille Mu-C	*pnlA*	pectine lyase

Bien qu'un peu moins connus, des processus fins de détection des plantes-hôtes sont mis en œuvre dans le cas des entérobactéries pectinolytiques comme *Erwinia chrysanthemi*. De nombreuses autres bactéries vivent en association directe avec les plantes, en particulier dans les genres *Xanthomonas, Ralstonia* ou *Frankia,* et modulent ces interactions par l'échange de signaux (Tableau 1, Figure 1).

Dans cette introduction de mon travail de thèse, j'ai choisi de présenter trois types d'interactions très étudiées (*Rhizobium, A. tumefaciens* et *P. syringae*) ainsi que mon modèle d'étude, *E. chrysanthemi*, en insistant sur les signaux végétaux reconnus par les bactéries, les protéines bactériennes impliquées dans cette détection et, lorsqu'ils sont connus, les mécanismes de régulation qui induisent l'expression de gènes bactériens en réponse à la reconnaissance des signaux végétaux.

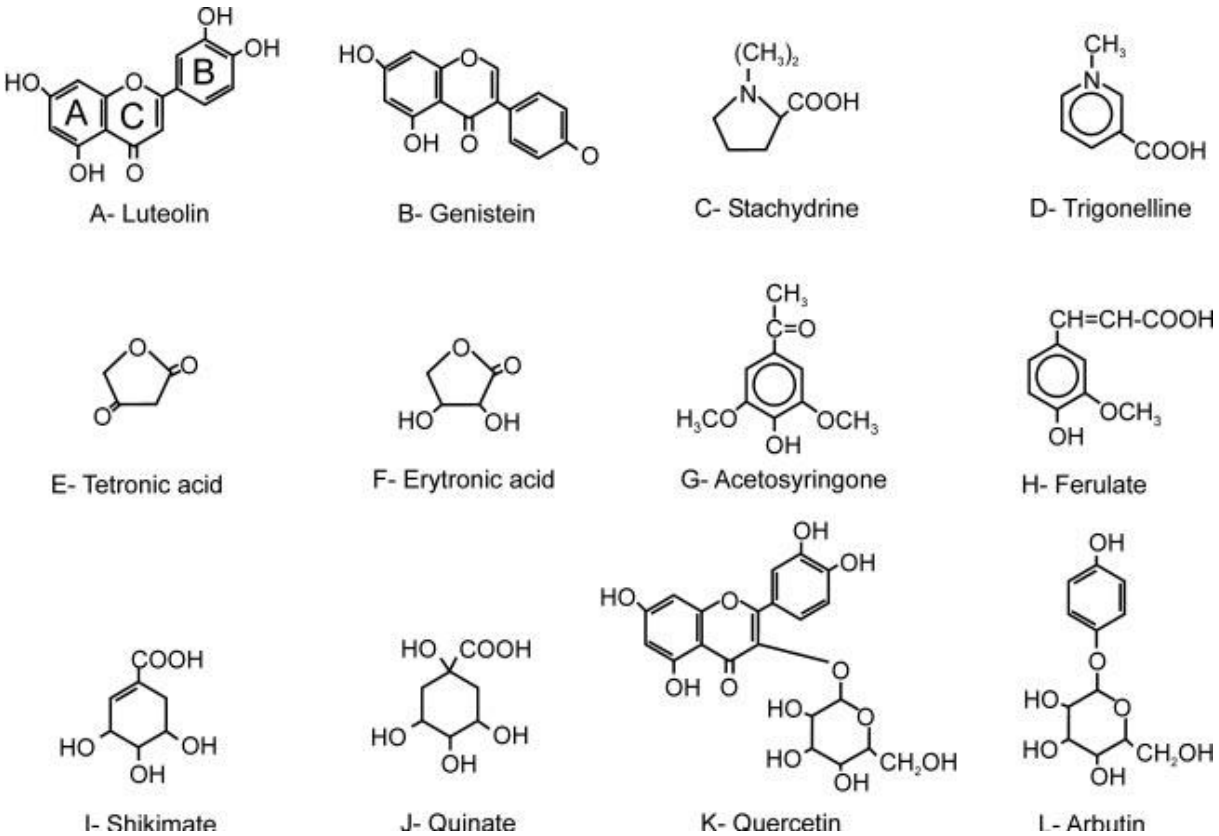


FIGURE 1 : Exemples de molécules végétales reconnues comme signaux pour l'induction de réponses spécifiques chez diverses bactéries associées aux plantes (d'après Brencic et Winans, 2005)

La lutéoline (A) et la génistéine (B) sont des flavonoïdes qui induisent la transcription des gènes de nodulation chez divers *Rhizobium*. Des composés non flavonoïdes, comme la stachydrine (C) et la trigonelline (D) induisent les gènes *nod* chez *S. meliloti*. L'acide tétronique (E) et l'acide érytronique (F) activent aussi l'expression des gènes *nod* chez *S. meliloti, M. loti*, et *R. lupini*.

L'acétosyringone (G) et le férulate (H) sont des composés phénoliques qui induisent les gènes *vir* chez *A. tumefaciens*.

Le shikimate (I) et le quinate (J) induisent les gènes de biosynthèse de la coronatine chez *P. syringae* pv. tomato. La quercétine (K) et l'arbutine (L) sont des glycosides phénoliques qui activent la production du syringomycine chez *P. syringae* pv. syringae.

I. Induction des facteurs Nod pendant les interactions *Rhizobium*-plante

I-1 L'interaction plante-*Rhizobium*, rôle des facteurs Nod dans l'établissement de la symbiose

Les α-protéobactéries incluent des symbiontes variés de plantes, fixant l'azote, comme les genres *Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Azorhizobium* et *Bradyrhizobium*. Elles incluent aussi des pathogènes de plantes, regroupés sous le nom d'*Agrobacterium* comme *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. Les espèces de *Rhizobium* et *Agrobacterium* sont très apparentées, au niveau de leur métabolisme, des mécanismes de transport et des systèmes de régulation. Les principales différences sont liées aux fonctions mises en œuvres lors de l'interaction, souvent codées par des plasmides et orientant soit vers la symbiose (*Rhizobium*), soit vers la pathogénie (*Agrobacterium*).

Dans les conditions environnementales appropriées, les bactéries du genre *Rhizobium* peuvent initialiser des interactions symbiotiques avec leurs plantes hôtes, provoquant le développement de nodules racinaires que les bactéries envahissent en tant qu'endosymbiontes fixant l'azote (Figure 2).

A B

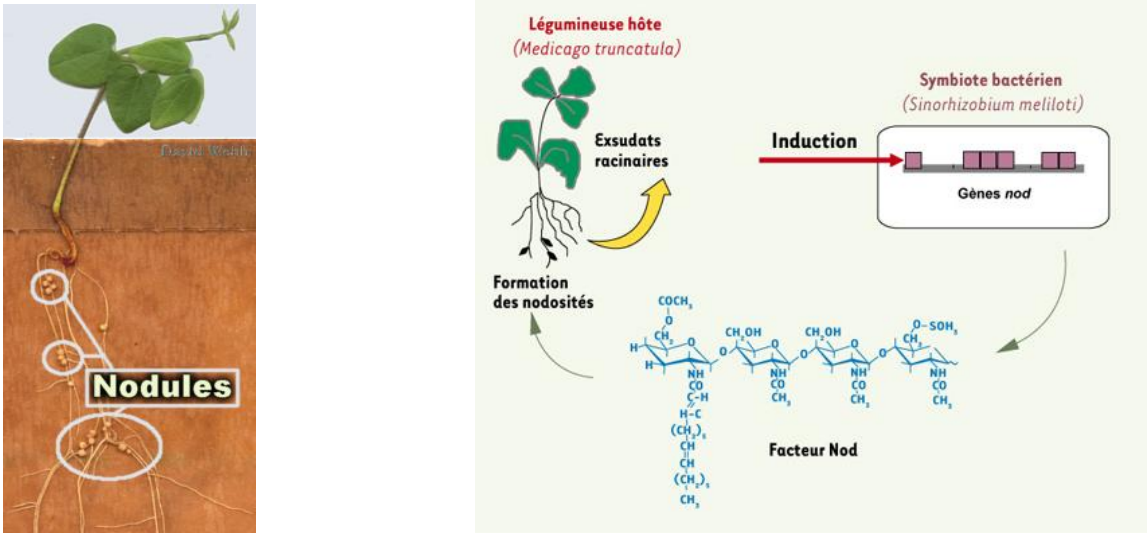
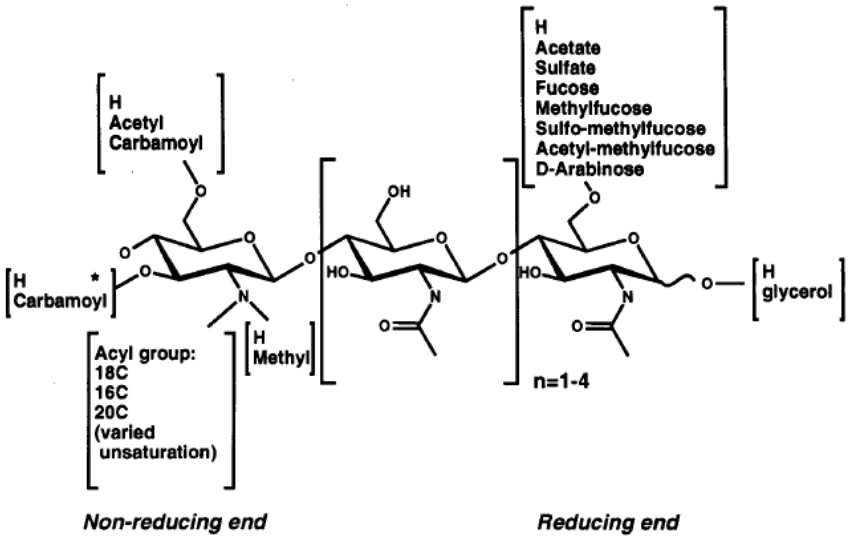


FIGURE 2 : Formation de nodules sur la plante hôte par des bactéries du genre *Rhizobium*
(B, d'après Debellé *et al.*, 2007)

Le développement de la symbiose *Rhizobium*-plante est un processus complexe. Il implique un échange coordonné de signaux entre la plante et les bactéries. Ces signaux permettent un ajustement graduel de la physiologie et du métabolisme des deux partenaires (Perret *et al.*, 2000 ; Spaink, 2000). La première étape clé dans la formation d'un nodule est

la détection par la plante de petites molécules synthétisées et libérées par les bactéries (Cullimore *et al.*, 2001 ; Geurts et Bisseling, 2002). Ces molécules qui déclenchent la nodulation sont appelées les facteurs Nod, ce sont des lipo-chito-oligosaccharides (Figure 3).

A



B

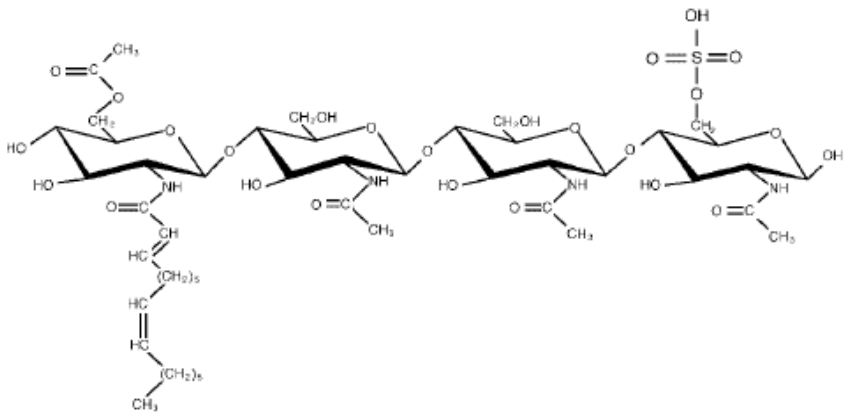


FIGURE 3 : Structure des facteurs Nod
(A) Structure générale (d'après Dénarie *et al.*, 1992)
La chaîne oligomérique de N-acétylglucosamine (GlcNAc) varie en longueur de 3 à 6 résidus. Les substitutions ont été définies par spectroscopie de masse, chromatographie en phase gazeuse et RMN. Seule la substitution 3-O carbamoyl de l'extrémité non réductrice est indiquée (*), mais les 3 ou 4 autres positions peuvent aussi porter une substitution carbamoyl.
(Methylfucose : 2-0-methylfucose; acetyl-methylfucose : 4-O-acety1, 2-O-methylfucose; sulfo-methylfucose : 3-0-sulfo-2-0-methylfucose).
(B) Facteur Nod majeur produit par *Sinorhizobium meliloti*. (d'après Lerouge *et al.*, 1990)
Le facteur Nod majeur produit par *S. meliloti* contient 4 unités glucosamine, une chaine acyl de 16 carbones avec deux insaturations (déterminées par NodE et NodF), un groupe acétyl à l'extrémité non réductrice (déterminé par NodL), et un groupe sulfate à l'extrémité réductrice (determiné par NodH, NodP et NodQ). Les facteurs Nod sont désignés par convention en indiquant les initiales de l'espèce, le nombre de résidus du squelette GLcNac, la longueur et le nombre d'insaturations de la chaîne acyl, et les autres substitutions (Dénarié *et al.*, 1992). Ce facteur Nod est ainsi désigné par NodSmIV (C16:2, S).

La détection des facteurs Nod par la plante hôte provoque des changements majeurs dans le développement de la plante qui sont nécessaires à l'entrée du *Rhizobium* dans le tissu

végétal. Les extrémités des racines servent d'attachement pour la bactérie. En se repliant, elles prennent au piège les bactéries dans une poche intracellulaire avant l'infection. Les facteurs Nod agissent par un mécanisme mal connu. Ils provoquent la division des cellules végétales et l'expression de gènes dans le cortex racinaire où ils initient le développement du nodule.

Aucune corrélation stricte n'existe entre le type de molécules produites par un *Rhizobium* et les plantes nodulées. Par exemple, les facteurs Nod produits par *R. etli* et *R. loti* sont identiques, mais les deux espèces ont des gammes d'hôtes distinctes : *Phaseolus* spp. et *Lotus* spp., respectivement (Cardenas *et al.,* 1995). Deux souches de *Rhizobium* nodulant la même plante peuvent sécréter des facteurs Nod différents : *R. tropici* et *R. etli* produisent des facteurs Nod sulfatés et acetylfucosylés, respectivement, mais les deux sont capables d'infecter *Phaseolus vulgaris*. La quantité de facteurs Nod relâchée semble également importante pour déterminer la gamme d'hôtes. L'augmentation de production du facteur Nod dans la souche NGR234 de *R. meliloti* permet la nodulation d'une plante non-hôte, *V. unguiculata* (Perret *et al.,* 2000).

I-2 Les inducteurs flavonoïdes

La détection et la réponse aux signaux végétaux par les membres de la famille *Rhizobiaceae* ont été étudiées de façon intensive dans de nombreux laboratoires. Les gènes *nod* sont responsables de la biosynthèse du facteur Nod. Ils sont exprimés en réponse à des flavonoïdes, composés aromatiques polycycliques, qui sont sécrétés dans la rhizosphère par la plante. L'identification des inducteurs des gènes *nod* a commencé par la construction de fusions avec un gène rapporteur, *nod-lacZ*, et la découverte que ces fusions étaient induites par des facteurs sécrétés par la plante hôte (Okker *et al.,* 1984 ; Mulligan et Long, 1985 ; Peters *et al.,* 1986). Ces facteurs ont été identifiés comme des dérivés de 2-phényl-1,4-benzopyrone, les flavonoïdes. Leur structure est basée sur deux cycles aromatiques et un noyau hétérocyclique (Figure 1A, B). Des modifications spécifiques de la structure de base produisent différentes classes de flavonoïdes (Dey et Harborne, 1997). Parmi ces classes, de nombreuses variations génèrent plusieurs milliers de flavonoïdes identifiés chez les plantes. Ces molécules issues du métabolisme secondaire des plantes sont fréquemment des signaux de réponse à un stress provenant de l'environnement. Par contre, ils ne sont pas tous actifs en tant qu'inducteurs des gènes de nodulation. Ainsi, les légumineuses hôtes peuvent être différenciées des non-hôtes sur la base des flavonoïdes spécifiques qu'elles produisent. La

comparaison de différentes structures de flavonoïdes qui induisent les gènes *nod* a montré l'importance de substituants dans l'activité inductrice des gènes *nod*.

I-3 Les inducteurs non flavonoïdes des gènes *nod*

En plus des flavonoïdes, certains inducteurs non-flavonoïdes des gènes *nod* ont été identifiés (Figure 1C, D). La stachydrine (N-methylproline methylbetaine) et la trigonelline ont été identifiées à partir d'exudats de semis de luzerne comme inducteurs des gènes *nod* de *S. meliloti* (Phillips *et al.,* 1992). Ces molécules sont des ammoniums quaternaires connus sous le nom de bétaines. Les bétaines se trouvent dans de nombreux tissus végétaux exposés au stress osmotique, où elles servent d'osmoprotecteurs (Chen et Murata, 2002). Pour induire les gènes *nod,* il faut des concentrations de bétaines supérieures (de l'ordre de quelques mM) à celles efficaces avec les flavonoïdes (de l'ordre de quelques µM). Mais leur abondance compense cette faible efficacité (Phillips *et al.,* 1994).

Deux acides aldoniques (acide tétronique et acide érytronique) (Figure 1E, F) ont aussi été identifiés comme inducteurs naturels des gènes *nod* chez certaines espèces de *Rhizobium* (Gagnon et Ibrahim, 1998). Des composes phénoliques simples (alcool conifférylique, acide chlorogénique et acide férulique) agissent comme de forts chimioattractants tout en étant de faibles inducteurs d'une fusion *nodC-lacZ* (Kape *et al.,* 1991).

I-4 Les régulateurs transcriptionnels des gènes *nod*

A l'intérieur des cellules bactériennes, les flavonoïdes relâchés par les plantes sont détectés par les protéines NodD qui sont des membres de la famille LysR de régulateurs transcriptionnels (Schell, 1993). Les protéines NodD sont supposées être les récepteurs directs de ces signaux végétaux. Ils sont des activateurs transcriptionnels dépendants des flavonoïdes, agissant sur les promoteurs des gènes *nod* (Schlaman *et al.,* 1998). Cependant, les analyses biochimiques de protéines NodD sont restées limitées à cause de problèmes de solubilité et de la difficulté de purification de ces protéines.

Des études génétiques ont montré que le domaine C-terminal de NodD est impliqué dans la fixation des flavonoïdes (Spaink *et al.,* 1989). Les protéines NodD se fixent sur des motifs d'ADN bien conservés, les « boîtes *nod* » localisées directement en amont des promoteurs des opérons *nod* (Rostas *et al.,* 1986 ; Schlaman *et al.,* 1998). La longueur des boîtes *nod* (approximativement 50 nucléotides) est compatible avec la fixation de NodD sous

forme de tétramère. Ceci a été démontré pour d'autres protéines de la famille LysR (Schell, 1993). Dans au moins un cas, la fixation de NodD sur l'ADN crée une courbure de la séquence de la boîte *nod* (Fisher *et al.,* 1988 ; Fisher et Long, 1993). Cette fixation n'exige pas la présence de flavonoïdes car les protéines NodD fixent l'ADN en présence ou en absence de flavonoïdes. Par contre l'activation des promoteurs ne se produit qu'en présence de flavonoïdes. Il est probable que ces signaux provoquent un changement de conformation des protéines fixées, qui serait nécessaire à l'activation du promoteur (Burn *et al.,* 1987 ; McIver *et al.,* 1989).

De nombreuses espèces de *Rhizobiaceae* possèdent plus d'une copie du gène *nodD,* jusqu'à cinq copies ont été trouvées dans certaines souches. *B. japonicum, Rhizobium* sp. NGR234, *R. meliloti*, et *R. tropici* possèdent 2 à 5 copies de *nodD* (Göttfert *et al.,* 1992; Van Rhijn *et al.,* 1993). Les différentes protéines NodD peuvent varier dans leur affinité pour diverses boîtes *nod*. Elles peuvent également avoir différentes spécificités de flavonoïdes (Perret *et al.,* 2000). Le transfert du gène *nodD* d'une espèce de *Rhizobium* à une autre peut dans certains cas modifier la gamme d'hôte de la souche receveuse en celle de la souche donneuse du gène *nodD.*

I-5 Métabolisme des signaux moléculaires induisant les gènes *nod*

Les souches de *Rhizobium* sont capables de cataboliser les inducteurs des gènes *nod*. Le catabolisme des flavonoïdes est initialisé par le clivage du cycle carboné de la molécule, ce qui donne des intermédiaires qui sont eux-mêmes des inducteurs potentiels des gènes *nod* (Rao et Cooper, 1994). Ce type d'intermédiaires est représenté par les chalcones qui sont des inducteurs puissants des gènes *nod* (Rao et Cooper, 1994). Cette aptitude est attribuée à l'ouverture du cycle carboné qui offre une flexibilité spatiale plus large durant les interactions avec le récepteur des flavonoïdes NodD (Figure 4). Les gènes bactériens impliqués dans le catabolisme des flavonoïdes n'ont pas encore été identifiés. Par contre, des chitinases de la plante peuvent cliver les facteurs Nod (Perret *et al.,* 2000). Les produits de dégradation formés sont faiblement actifs. Les chitinases végétales sont produites lors d'interactions symbiotiques ou pathogènes. Les décorations des facteurs Nod influencent leur résistance à la dégradation par ces chitinases. Par exemple, un groupe sulfate à l'extrémité réductrice et un groupe *O*-acétyl à l'extrémité non-réductrice du facteur Nod de *R. meliloti* augmentent fortement sa stabilité.

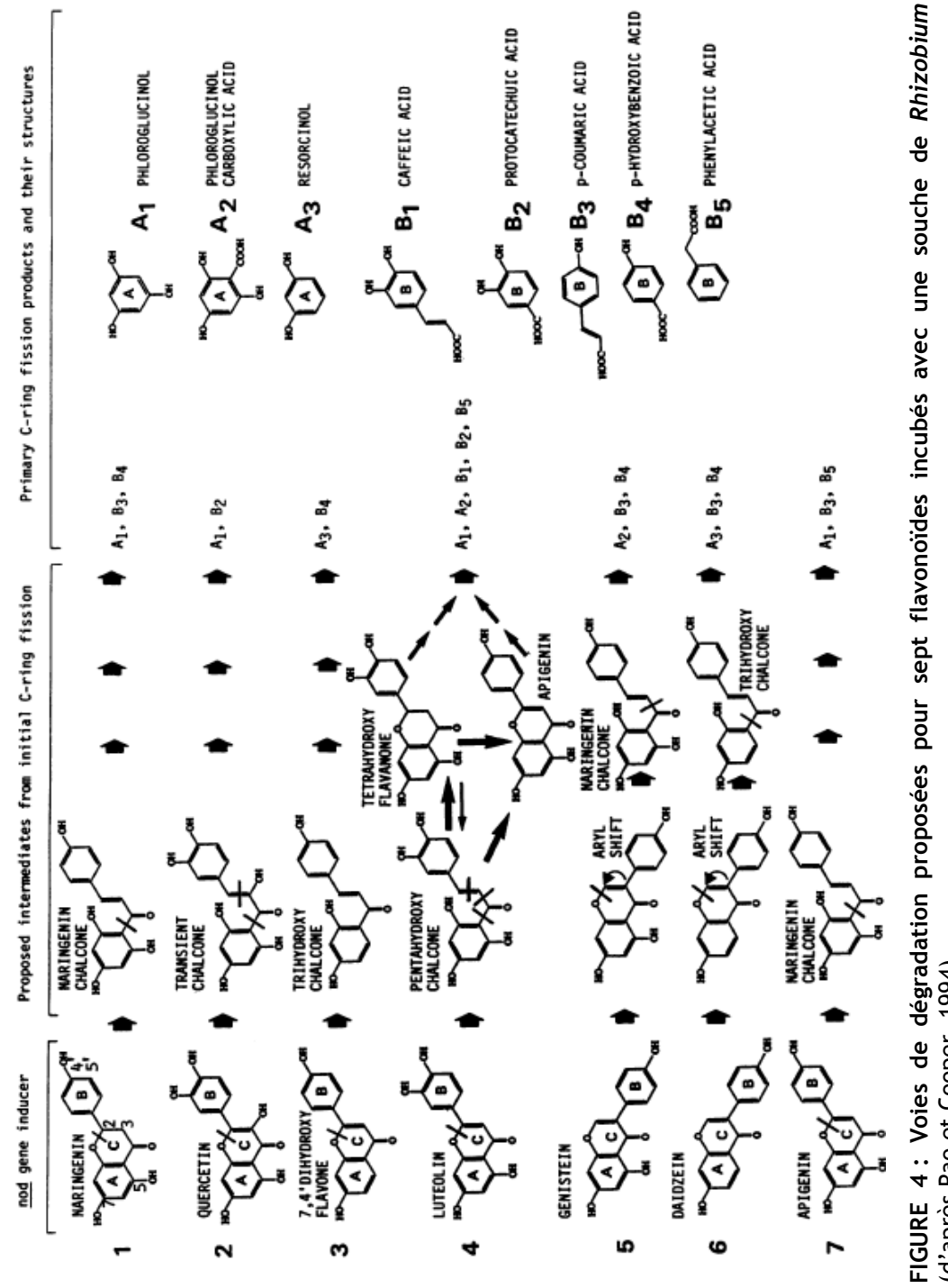


FIGURE 4 : Voies de dégradation proposées pour sept flavonoïdes incubés avec une souche de *Rhizobium* (d'après Rao et Cooper, 1994)

Composé 1, *R. leguminosarum* bv. viciae;
Composé 2, *R. leguminosarum* bv. phaseoli;
Composé 3, *R. leguminosarum* bv. trifolii;
Composé 4, *R. meliloti*;
Composé 5, *R. fredii*;
Composés 6 et 7, *Rhizobium* sp. strain NGR234.

Les inducteurs non flavonoides, la trigonelline et la stachydrine, sont catabolisés par les produits des gènes *trc* et *stc*, respectivement, et ils agissent également comme inducteurs de ces gènes (Goldmann, 1991). Les gènes *trc* et *stc* sont voisins des gènes de nodulation et de fixation d'azote. Les gènes *trc* sont induits pendant toutes les étapes de la symbiose (Goldmann, 1991). Ceci suggère que le catabolisme de ces composés joue un rôle à certaines étapes de la symbiose. Alors que les mutants *trc* ne semblent pas altérés pour la symbiose, les mutants *stc* montrent une nodulation retardée (Goldmann, 1991).

II. Induction des gènes *vir* pendant les interactions *Agrobacterium*-plante

II-1 Les bactéries du genre *Agrobacterium* et les maladies provoquées

L'agent responsable de la maladie de la galle du collet (« crown gall » selon la dénomination anglo-saxonne) a été identifié en 1907 (Smith et Townsend, 1907); il s'agit d'*A. tumefaciens*, une alpha-proteobactérie de la famille des *Rhizobiaceae*. Comme son nom l'indique, la maladie se traduit par le développement de galles, excroissances tissulaires aussi appelées tumeurs (Figure 5). Celles-ci se forment le plus souvent au niveau du collet (zone de jonction entre la tige et le système racinaire souvent localisée au niveau de la surface du sol) mais parfois aussi sur des racines ou des tiges souterraines. Cette maladie provoque d'importantes pertes, et notamment lors de culture ornementales, fruitières et forestières. La famille des *Rosaceae* (rosier, pommier, pêcher, …) y est particulièrement sensible mais ces bactéries infectent de nombreuses plantes ligneuses (Figure 5) et certains groupes de plantes herbacées (140 genres dans plus de 90 familles). Le genre *Agrobacterium* désigne des bacilles à Gram négatif, de taille variable (0,6-1,0 µm sur 1,5-3,0 µm), mobiles, non sporulant et aérobies stricts pour la plupart. Ces bactéries présentent une capacité d'utilisation des glucides très étendue. Leur température optimale de croissance s'étage de 24 à 28°C. Les bactéries du genre *Agrobacterium* occupent différents habitats ; elles peuvent vivre librement dans le sol, dans l'environnement racinaire (rhizosphère) ou comme pathogène des plantes.



FIGURE 5 : Développement de galles dues à *Agrobacterium* sur rosier et érable

Les premières classifications du genre *Agrobacterium* étaient fondées sur la pathogénie. Ainsi, plusieurs espèces ont été définies sur la base des symptômes qu'elles causent sur plantes : *A. tumefaciens*, induisant la formation de tumeurs, *A. vitis* (Binns et Constantino, 1998), responsable d'une galle spécifique de la vigne, *A. rhizogenes* (Riker *et al.,* 1930), responsable du « hairy root », maladie caractérisée par l'apparition d'un chevelu racinaire au point d'infection ou encore *A. rubi* causant la galle sur tige chez les *Rubus* (framboisier, ronce sauvage…) (Binns et Constantino, 1998). Les souches non pathogènes ont été rassemblées au sein de l'espèce *A. radiobacter*. Plus récemment, une souche isolée d'une tumeur de *Ficus benjamina* a permis de définir une nouvelle espèce, *A. larrymoorei* (Bouzar et Jones, 2001) différenciée sur la base de sa séquence d'ADNr 16S. Ces données sur la taxonomie ont en effet beaucoup évolué avec les méthodes moléculaires de classification.

Les bactéries du genre *Agrobacterium* étaient également réparties dans différents biovars, en fonction de leurs caractéristiques métaboliques et de croissance. Dans cette classification, *A. tumefaciens* correspond à un ensemble de trois biovars dont le biovar 1 qui est le plus représenté. Des hybridations ADN-ADN ont permis d'identifier 9 espèces génomiques distinctes au sein du biovar 1 (Popoff *et al.,* 1984). La classification classique en espèces reste donc à être clarifiée au sein du genre *Agrobacterium*.

Le génome de la souche C58 appartenant au biovar 1 d'*A. tumefaciens* (Wood *et al.,* 2001 ; Goodner *et al.,* 2001) se compose de quatre molécules d'ADN : un chromosome circulaire (2,84 Mb), un chromosome linéaire (2,07 Mb) et deux plasmides ; le plasmide At (543 Kb) et le plasmide Ti (214 Kb). Les deux premiers réplicons portent les gènes de ménage, essentiels à la survie et à la croissance des bactéries. Le plasmide Ti (tumor-inducing) porte l'ensemble des gènes *vir*, principaux responsables de la virulence d'*A. tumefaciens* sur les plantes.

Les *A. tumefaciens* pathogènes, c'est-à-dire portant le plasmide Ti, infectent la plante à la faveur d'une blessure. Le cycle de pathogénie d'*A. tumefaciens* peut se décomposer en trois étapes. Dans un premier temps, la bactérie vivant en saprophyte perçoit certains composés phénoliques relâchés par la plante blessée dans la rhizosphère. En réponse à ces signaux, les bactéries se déplacent vers le site de la blessure et s'attachent aux cellules végétales. Dans un deuxième temps, lorsqu'un contact direct est établi avec la plante hôte, les bactéries déclenchent le transfert d'un fragment d'ADN dans le noyau des cellules végétales. L'ADN bactérien transféré (ADN-T) va s'intégrer dans le génome de la plante et être exprimé par celle-ci. La troisième étape correspond au maintien de l'interaction. L'information génétique portée par l'ADN-T conduit d'une part, à la synthèse d'hormones

végétales de croissance (phytohormones) entraînant la formation de tumeurs et d'autre part, à la production de composés carbonés (les opines) utilisés spécifiquement par les bactéries comme nutriments et source d'énergie (McCullen et Binns, 2006 ; Gelvin, 2003 ; Zhu *et al.*, 2000).

La blessure de la plante hôte est une condition indispensable pour l'établissement de l'infection par *A. tumefaciens.* C'est à travers les signaux de stress liés à la blessure de la plante que la bactérie reconnaît son hôte. La plante blessée libère dans la rhizosphère divers composés, notamment des sucres et des composés phénoliques auxquels *A. tumefaciens* est particulièrement sensible. Attirée par ces composés, la bactérie progresse jusqu'à la source, en suivant un gradient de concentration croissant par un mécanisme connu sous le nom de chimiotactisme.

L'interaction *A. tumefaciens*-plante résulte donc d'une manipulation génétique naturelle au cours de laquelle la bactérie détourne à son profit l'activité métabolique de la plante. Les tumeurs provoquées par *A. tumefaciens* résultent de l'expression de l'ADN-T transféré depuis le plasmide Ti vers les cellules individuelles de la plante (Kado, 1998 ; Zupan *et al.*, 2000). Les gènes localisés sur l'ADN-T seront exprimés à l'intérieur des cellules végétales infectées, la surproduction d'hormones végétales stimulant la croissance et provocant la prolifération rapide des cellules végétales infectées et la formation de la galle (Binns et Constantino, 1998 ; Costacurta et Vanderleyden, 1995). Les protéines responsables de la maturation et du transfert de l'ADN-T sont codées par la région *vir* du plasmide Ti (de la Cruz et Lanka, 1998 ; Johnson et Das, 1998 ; Rossi *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2000). Les gènes *vir* ne sont pas transférés mais ils sont essentiels à la virulence.

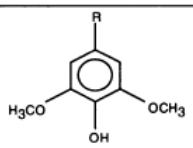
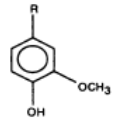
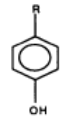
II-2 Inducteurs des gènes *vir*

Les gènes *vir* ne sont pas exprimés chez les bactéries vivant en mode saprophyte. Un processus clé de l'interaction entre la plante et *Agrobacterium* implique l'induction de ces gènes par des signaux végétaux. Diverses études ont montré que les gènes *vir* sont induits par des composés phénoliques spécifiques en combinaison avec des monosaccharides, un pH acide et des températures en dessous de 30°C. Une coculture entre des cellules de plantes ou de racines et une souche portant la fusion *vir-lacZ* montre une expression élevée de la β–galactosidase (Stachel *et al.*, 1985a ; Stachel *et al.*, 1986). Deux composés isolés de cultures de racines du tabac, l'acétosyringone (Figure 1G) et l'α-hydroxyacetosyringone, ont été les

premiers composés phénoliques identifiés comme inducteurs spécifiques des gènes *vir* (Stachel *et al.*, 1985b).

Les inducteurs phénoliques sont des dérivés du syringol, le plus actif étant l'acétosyringone (Tableau 2). Les analyses complémentaires de nombreux dérivés chimiques de l'acétosyringone ont montré que *A. tumefaciens* est capable de détecter divers composés apparentés dont beaucoup sont ubiquitaires ou, au moins, largement répandus chez les plantes (Melchers *et al.,* 1989 ; Spencer et Towers, 1988). Des concentrations relativement fortes de composés phénoliques inducteurs (de 5 à 500 µM, selon le composé) sont nécessaires à l'activation complète. Ceci peut aider à comprendre la spécificité de signal assez faible chez ce pathogène (Melchers *et al.,* 1989 ; Spencer et Towers, 1988 ; Stachel *et al.,* 1985b).

TABLEAU 2 : Induction de la fusion *virB::lacZ* chez *A. tumefaciens* par des composés phénoliques (d'après Lee *et al.*, 1995)
Les souches étaient cultivées 18 h en présence de glucose 10 mM, de composés phénoliques 100 µM et à pH 5,5. L'activité β-galactosidase reflète l'expression de la fusion *virB::lacZ*. En absence de composé phénolique, cette activité est inférieure à 5 unités.

Group	Basic structure	Substituents (R)	Name	β-Galactosidase activity,* units			
				KU12	C58	A6	Bo542
A		$COCH_3$	Acetosyringone	3.2	259	910	1864
		CHO	Syringaldehyde	3.3	9.9	722	1373
		COOH	Syringic acid	3.9	5.4	190	823
		CH=CHCOOH	Sinapinic acid	5.6	142	657	1707
		H	2,6-Dimethoxyphenol	4.2	20.0	410	1208
B		$COCH_3$	Acetovanillone	157	8.1	359	1043
		CHO	Vanillin	9.1	3.4	7.0	186
		COOH	Vanillic acid	6.5	3.2	4.5	4.7
		CH=CHCOOH	Ferulic acid	167	10.9	78.5	830
		H	Guaiacol	55.7	4.5	7.4	232
C		$COCH_3$	4-Hydroxyacetophenone	238	4.8	6.5	7.5
		CHO	4-Hydroxybenzaldehyde	14.1	2.2	3.4	4.7
		COOH	4-Hydroxybenzoic acid	3.5	3.1	2.5	3.3
		CH=CHCOOH	*p*-Coumaric acid	295	2.0	1.7	3.9
		H	Phenol	188	2.8	2.7	3.1

L'induction des gènes *vir* par les composés phénoliques est fortement améliorée par des monosaccharides spécifiques comme l'arabinose, le galactose, l'acide galacturonique, le mannose, le fucose, le cellobiose et le xylose (Figure 6) (Ankenbauer et Nester, 1990). La plupart de ces sucres sont les monomères de polysaccharides présents dans la paroi végétale. Leur effet sur l'induction des gènes *vir* est prononcé surtout aux basses concentrations en inducteurs phénoliques. Les acides galacturonique et glucuronique montrent la plus forte activité, ayant un effet à des concentrations aussi faible que 100 µM (Ankenbauer et Nester, 1990).

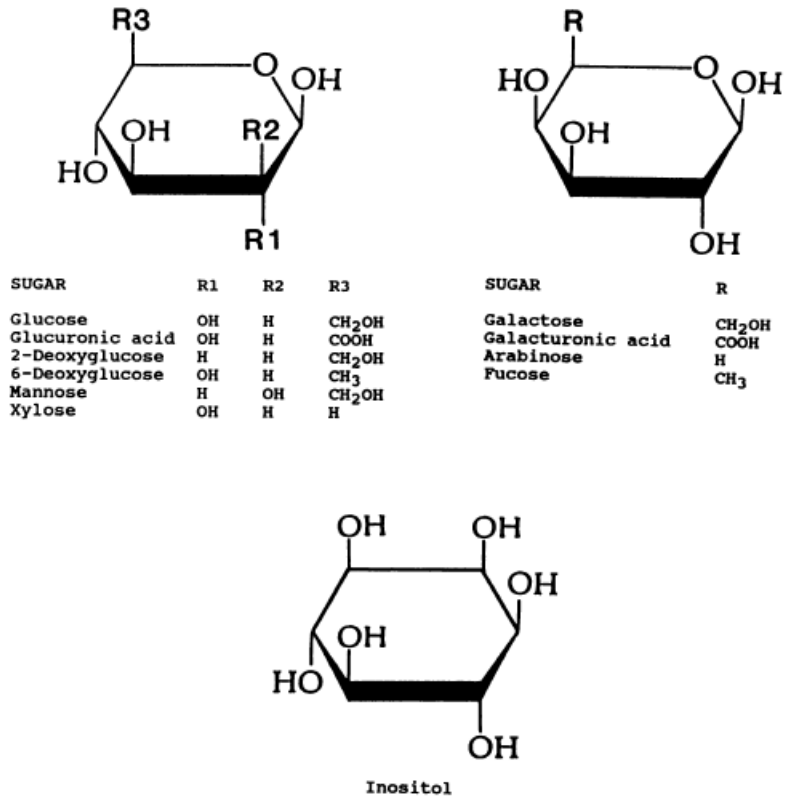


FIGURE 6 : Structure des monosaccharides inducteurs des gènes *vir* d'*A. tumefaciens*
Ces composés provoquent une plus forte induction de la fusion *virB::lacZ* en présence d'acétosyringone 2,5 µM (d'après Ankenbauer et Nester, 1990).

La combinaison des composés phénoliques, des monosaccharides et d'une certaine acidité, est nécessaire à l'induction du régulon *vir*. Ces conditions reflètent la composition chimique de la sève au site de la blessure. Les composés phénoliques libérés jouent un rôle de protection contre les pathogènes potentiels (Dixon et Paiva, 1995). Ces métabolites sont produits en grande quantité sur les sites de blessures, surtout par les cellules responsables de la synthèse de lignine ou de la réparation de la paroi végétale. Les sucres inducteurs sont présents aux sites de blessures car ils résultent de la dégradation des polysaccharides de la paroi végétale. Ils peuvent être produits par l'activité enzymatique de glycosidases végétales. La sève des blessures a également tendance à être acide, suite à la libération de composés acides à partir des vacuoles des cellules végétales (acides phénoliques, acides uroniques) (Douglas, 1996). Ces blessures peuvent être causées par des agents extérieurs, comme des herbivores ou une gelée. Elles peuvent aussi résulter de la déstructuration du tissue durant la croissance normale de la plante, par exemple de fissures produites au site d'émergence des racines secondaires.

II-3 Les régulateurs des gènes *vir* : VirA-VirG

L'activation des gènes *vir* a lieu au stade le plus précoce du cycle infectieux d'*A. tumefaciens* (reconnaissance de la plante hôte). L'expression de ces gènes est contrôlée par un système faisant intervenir trois protéines situées dans différents compartiments : la protéine transmembranaire VirA, la protéine cytoplasmique VirG et la protéine périplasmique ChvE. L'activation par ces protéines correspond aux trois types de signaux chimiques identifiés: composés phénoliques, monosaccharides et pH.

Les protéines VirA et VirG correspondent à un système à deux composantes nécessaire à l'induction des gènes *vir* (Figure 7) (Stachel et Zambryski, 1986). La protéine VirA est une histidine kinase traversant la membrane interne (Leroux *et al.*, 1987). En présence du signal, la kinase VirA phosphoryle le régulateur de réponse VirG qui pourra activer la transcription des gènes *vir* (Heath *et al.*, 1995 ; Stock *et al.*, 2000 ; Winans, 1990 ; Winans *et al.*, 1986). La kinase VirA est un dimère, en présence ou en absence de l'inducteur (Pan *et al.*, 1993). Chaque sous-unité est composée de 4 domaines : le domaine périplasmique et trois domaines cytoplasmiques incluant un « linker », une kinase et un récepteur (Figure 7) (Chang et Winans, 1992 ; Leroux *et al.*, 1987). L'activité kinase de VirA est influencée par les stimuli inducteurs détectés par les domaines périplasmique et linker. Les protéines VirA tronquées dont les régions périplasmiques et transmembranaires ont été supprimées ne sont pas capables de détecter la présence de monosaccharides mais peuvent encore détecter les signaux phénoliques et acide (Chang et Winans, 1992). Le domaine périplasmique de VirA est nécessaire à la détection des monosaccharides mais cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de ChvE (voir ci-dessous).

Les composés phénoliques et l'acidité sont perçus au niveau du domaine linker de VirA. Une protéine VirA tronquée, contenant seulement le linker et la kinase, est capable de détecter les composés phénoliques et l'acidité *in vivo* (Chang et Winans, 1992). Au contact de l'acétosyringone, la protéine VirA s'autophosphoryle. La détection de ce signal par le linker d'une sous-unité du dimère VirA va activer la kinase de l'autre sous-unité. C'est ainsi phosphorylée que VirA pourra activer par phosphorylation le régulateur VirG.

Il reste une polémique sur la façon dont VirA détecte le signal phénolique, directement ou par l'intermédiaire d'une autre protéine qui fixerait les composés phénoliques et communiquerait ce signal à VirA. En effet, une étude a montré qu'un composé phénolique marqué radioactif ne se fixe pas sur VirA mais peut se fixer à deux petites protéines (Lee *et al.*, 1992).

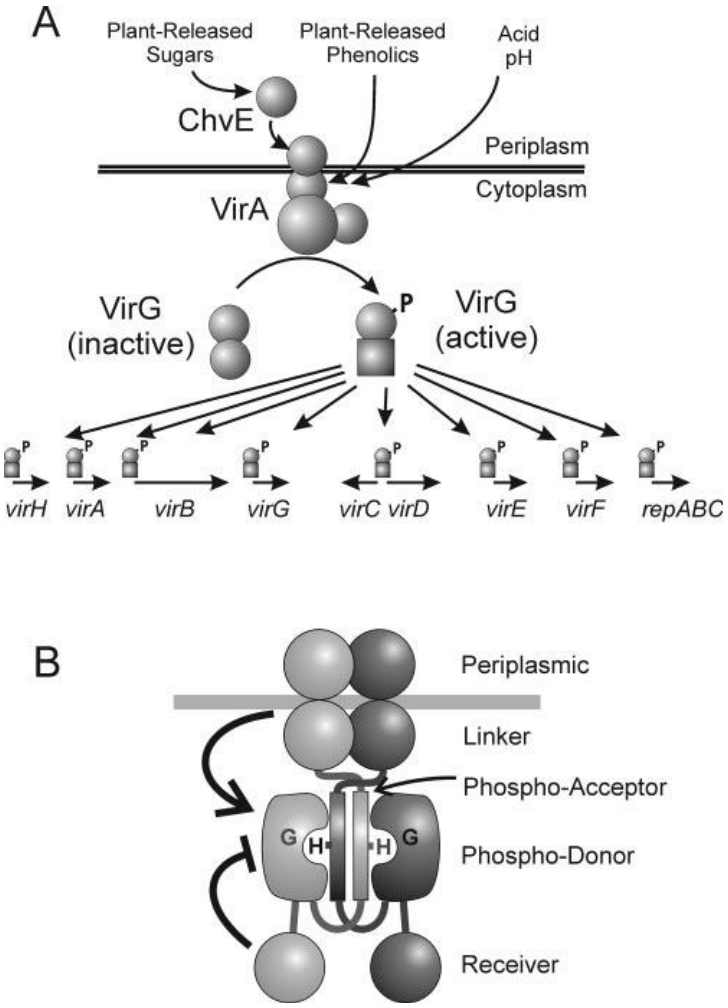


FIGURE 7 : Régulation des gènes de virulence d'*A. tumefaciens* par des signaux de la plante hôte (d'après Brencic et Winans, 2005)
(A) Cascade régulatrice des gènes *vir* impliquant le système à deux composantes VirA VirG et la protéine ChvE. VirA est une histidine kinase transmembranaire qui détecte des composés phénoliques, des sucres, et un pH acide, puis phosphoryle le régulateur de réponse VirG. Le pH acide et les composés phénoliques sont détectés par le domaine linker de VirA, alors que les sucres sont détectés par la protéine périplasmique ChvE. En entrant en contact avec le domaine périplasmique de VirA, ChvE augmente l'activité inductrice des composés phénoliques. Le régulateur VirG phosphorylé se fixe sur l'ADN pour activer la transcription des gènes *vir* et de l'opéron *repABC* nécessaire à la réplication du plasmide pTi.
(B) Modèle de régulation de l'activité kinase du dimère VirA. VirA est une protéine dimérique. Chaque sous unité comporte les domaines périplasmique, linker, kinase et récepteur. Chaque domaine kinase est divisé en sous domaines « donneur », qui contient le site de liaison de l'ATP, et « accepteur », qui contient le résidu His site de l'autophosphorylation. Dans le dimère VirA, le sous domaine donneur de chaque sous unité interagit avec le sous domaine accepteur de la sous unité opposée. Les signaux environnementaux sont transmis depuis les domaines périplasmique et linker d'une sous unité à un complexe contenant le sous domaine donneur de la même sous unité et le domaine accepteur de la sous unité opposée. De la même façon, le domaine récepteur de chaque sous unité inhibe le complexe formé du sous domaine donneur de la même sous unité et du domaine accepteur de la sous unité opposée.

Cependant, les preuves génétiques suggèrent que VirA est le récepteur direct (Lee *et al.*, 1996). Dans la souche d'*A. tumefaciens* KU12, les gènes *vir* ne sont pas induits par des composés phénoliques contenant les groupes 4'-hydroxy, 3'-methoxy et 5'-methoxy, comme l'acétosyringone. Par contre, ils sont induits par des composés phénoliques contenant un seul groupe 4'-hydroxy, comme la 4-hydroxyacétophénone, qui n'agit pas sur les gènes *vir* d'autres souches. En transférant les différents plasmides Ti de ces souches à une même

réceptrice, la spécificité de reconnaissance a pu être attribuée au plasmide Ti et, plus précisément, au gène *virA* (Lee *et al.,* 1995). Les protéines VirA de différentes souches d'*A. tumefaciens* sont donc un élément essentiel de la reconnaissance spécifique des composés phénoliques.

La phosphorylation du régulateur VirG sur le résidu conservé Asp52 modifie cette protéine en une forme capable d'activer la transcription des gènes *vir* (Heath *et al.,* 1995 ; Jin *et al.,* 1990). Le régulateur VirG phosphorylé se fixe sur l'ADN, en reconnaissant les boîtes *vir* qui se trouvent en amont des promoteurs des gènes cibles. Les boites *vir* sont généralement centrées de 40 à 80 nucléotides en amont du site de démarrage de la transcription (Jin *et al.,* 1990). Le motif hélice-tour-hélice fixant l'ADN est localisé dans le domaine C-terminal de VirG. Ce domaine peut se fixer sur la boîte *vir* en absence du domaine receveur N-terminal (Powell et Kado, 1990).

II-4 Implication de ChvE dans la détection des sucres

Le mécanisme de reconnaissance des sucres est pris en charge par la protéine ChvE, homologue aux protéines liant le galactose d'*Escherichia coli* (Doty *et al.,* 1993). Ces protéines périplasmiques liant les sucres sont en général impliquées dans leur transport (Peng *et al.,* 1998). ChvE est une protéine périplasmique nécessaire à la fois pour le chimiotactisme envers les monosaccharides et leur transport (Heath *et al.,* 1995 ; Huang *et al.,* 1990).

Un mécanisme essentiel dans la plupart des interactions plantes-bactéries implique le chimiotactisme bactérien vers des exsudats ou des blessures de plantes. La plante contient de nombreux nutriments dont beaucoup agissent comme attractants pour les bactéries. Diverses bactéries montrent une forte attraction envers des sucres, des aminoacides, des acides dicarboxyliques, ou des composés aromatiques (Ashby *et al.,* 1988 ; Bergman *et al.,* 1988 ; Caetano-Anolles *et al.,* 1988 ; Hawes et Smith, 1989 ; Parke *et al.,* 1987 ; Robinson et Bauer, 1993). Chez *Azospirillum brasilense*, une protéine homologue de ChvE est nécessaire au chimiotactisme envers les sucres. Cette protéine, nommée SbpA, a été découverte lors de la recherche de gènes induits par les plantes (Van Bastelaere *et al.,* 1999). Les sucres libérés par la plante vont induire l'expression des gènes impliqués dans leur acquisition et leur catabolisme. La protéine ChvE d'*A. tumefaciens*, en plus de son rôle dans le chimiotactisme, est impliquée dans l'entrée du glucose et du galactose. Le gène *chvE* fait partie d'un opéron codant pour un système de transport de type ABC dont la transcription est induite par ces monosaccharides (Kenmer *et al.,* 1997). L'induction de cet opéron dépend du produit du

gène *gbpR* transcrit de façon divergente et qui code un régulateur de la famille LysR (Doty *et al.,* 1993).

Les mutants *chvE* deviennent incapables de détecter la présence de monosaccharides mais l'expression des gènes *vir* reste sensible aux composés phénoliques. En présence de sucres, l'interaction avec ChvE augmente la sensibilité de VirA à l'acétosyringone. Une analyse génétique utilisant des mutations suppresseur a montré que ChvE interagit directement avec le domaine périplasmique de VirA (Shimoda *et al.,* 1993). Ceci suggère que les sucres sont détectés à travers la protéine ChvE qui transmet ce signal à VirA. Des mutants *chvE* ou du domaine périplasmique de VirA sont affectés pour l'induction des gènes *vir,* ils ont une gamme d'hôtes limitée par rapport à celle de la souche sauvage (Doty *et al.,* 1996). Par contre, lorsque ChvE est fortement exprimée chez *A. tumefaciens*, la sélectivité de VirA va s'étendre à d'autre composés phénoliques n'ayant normalement qu'un faible pouvoir inducteur (Peng *et al.,* 1998). La formation du complexe ChvE/VirA va permettre de répondre, en présence de sucres, à de faibles concentrations en composés phénoliques moins spécifiques. Si ChvE n'est pas activée, VirA ne sera sensible qu'aux fortes concentrations en composés phénoliques spécifiques.

Lorsque la présence de sucres est détectée par ChvE, l'information est transmise au domaine périplasmique de VirA par une interaction directe. Par la suite, ce signal doit atteindre le domaine kinase cytoplasmique de VirA. La région transmembranaire entre le domaine périplasmique et le domaine linker (TM2) de VirA est impliquée dans la transmission du signal sucre à travers la membrane interne, du périplasme vers le cytoplasme (Wang *et al.,* 2002).

II-5 Détection de l'acidité

L'acidité du milieu externe est le troisième élément intervenant dans l'activation des gènes *vir* d'*A. tumefaciens* (Gao *et al.,* 2005). C'est un signal important dans la détection de la plante hôte. Les plantes sécrètent dans le sol une grande diversité des composés participant à l'acidification de la rhizosphère. De même, le liquide apoplastique du tissu végétal est acide, avec un pH variant entre 5 et 6,5 (Grignon et Sentenac, 1991 ; Marschner, 1995).

Le système de deux composés ChvG-ChvI d'*A. tumefaciens* régule l'expression de divers gènes induits par un pH acide. ChvG semble être le senseur global qui va détecter, directement ou indirectement, l'acidité extracellulaire (Li *et al.,* 2002). Un pH compris entre 4,8 et 5,5 est optimum pour induire l'expression du système à deux composantes ChvG-ChvI

(Yuan *et al.*, 2008) Ce système a été découvert lors de la recherche de gènes de virulence localisés sur le chromosome d'*A. tumefaciens* (Charles et Nester, 1993). Les mutations dans les gènes *chvG* et *chvI* suppriment la tumorigénèse et sensibilisent les bactéries au pH acide (Charles et Nester, 1993 ; Mantis et Winans, 1993). Parmi les gènes dont l'expression induite par un pH acide est contrôlé par le système ChvG-ChvI, se trouve le gène *virG* dont le produit active le régulon *vir* (Mantis et Winans, 1993), le gène *aopA* codant une protéine de la membrane externe exposée en surface, et le gène *katA* codant une catalase importante pour la détoxification de H_2O_2 libéré pendant l'infection de la plante hôte (Li *et al.*, 2002).

La synthèse du régulateur VirG est donc favorisée à pH acide. Cet effet s'ajoute à l'effet direct de l'acidité au niveau de VirA. Les deux mécanismes vont conduire à une augmentation de l'expression des gènes *vir*.

II-6 Métabolisme des composés phénoliques

Les composés phénoliques, le signal majeur de l'induction des gènes de virulence, sont métabolisés par VirH2, produit d'un des gènes *vir* d'*A. tumefaciens* (Brencic *et al.*, 2004; Kalogeraki *et al.*, 1999). Le gène *virH2* n'est pas nécessaire à la formation de tumeurs. La protéine VirH2 appartient à la famille des cytochromes de type P-450, elle catalyse la O-déméthylation de groupements méthoxyl des inducteurs phénoliques. Les produits déméthylés par VirH2 sont beaucoup moins toxiques pour les bactéries que les substrats. VirH2 jouerait donc un rôle dans la détoxification de ces composés. Peu de ces composés phénoliques inducteurs sont totalement catabolisés par les bactéries (Figure 8), seule la vanilline et ses dérivés sont utilisés comme source de carbone et d'énergie par *A. tumefaciens.* VirH2 est alors la première étape de ce catabolisme. Les produits de réactions sont complètement inactifs comme inducteurs. Par exemple VirH2, convertit l'acide férulique, un bon inducteur, en acide caféique non-inducteur. Le role de VirH2 serait alors de limiter la durée de l'induction, en effet la synthèse de plus de 30 protéines Vir est un processus très coûteux pour la cellule. Par contre, l'acétosyringone qui est le meilleur inducteur connu des gènes *vir* est aussi le plus mauvais substrat de VirH2, montrant un taux de déméthylation très lent. L'acétosyringone semble être un métabolite rare, décrit seulement chez le tabac. Au contraire, les acides férulique et sinapinique et les alcools coniféryl et sinapyl sont trouvés dans toutes les plantes examinées et leur synthèse est induite par des blessures (Dixon et Paiva, 1995). Le fait que ces inducteurs des gènes *vir* les plus abondants soient de bons substrats de VirH2 suggère que cette enzyme peut jouer un rôle important

pour éteindre l'induction. VirH2 serait donc impliquée dans l'inactivation des signaux inducteurs des gènes *vir*, dans la détoxification des sites infectés et dans l'utilisation des composés phénoliques comme nutriments pour la croissance. Tous ces rôles semblent être importants pour la survie et la multiplication d'*A. tumefaciens* au site d'infection.

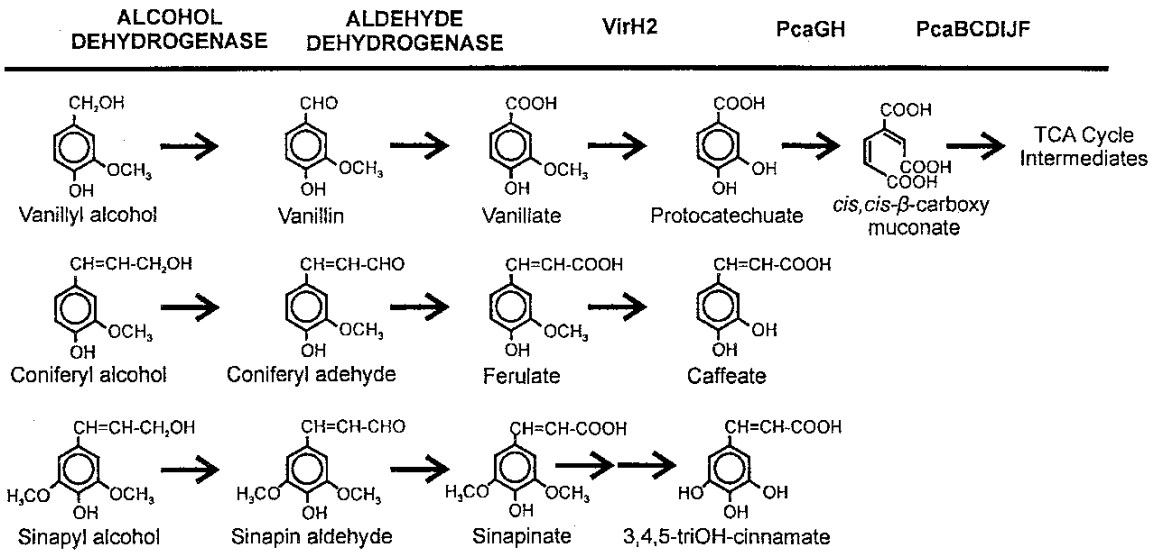


Figure 8 : Métabolisme des inducteurs phénoliques des gènes *vir* (d'après Brencic *et al.*, 2004)
Première ligne : voie de dégradation de l'alcool vanillique, de la vanilline et du vanillate. L'opéron *pca*, nécessaire au catabolisme du protocatéchuate, est localisé sur le chromosome d'*A. tumefaciens* (Parke, 1995). L'oxydation en deux étapes de l'alcool vanillique a été décrite chez d'autres bactéries (Priefert *et al.*, 2001).
Seconde ligne : conversion en trois étapes de l'alcool conifférylique en caféate.
Troisième ligne : conversion en quatre étapes de l'alcool sinapylique en 3,4,5-triOH-cinnamate.
Les deux déshydrogénases permettant l'oxydation de ces composés phénoliques ne sont pas identifiées chez *A. tumefaciens*, mais elles sont exprimées dans les souches sans plasmide Ti. Le caféate et le 3,4,5-triOH-cinnamate ne sont pas métabolisés chez *A. tumefaciens*. Les réactions de déméthylation (deux réactions séquencielles dans le cas du sinapinate) sont catalysées par VirH2 (Brencic *et al.*, 2004).

II-7 Autres composés affectant l'interaction plante-*Agrobacterium*

De nombreuses hormones végétales sont impliquées dans le maintien des tumeurs dues à *A. tumefaciens*. L'acide indol-acétique (AIA) et la cytokinine jouent un rôle dans la différenciation du réseau vasculaire de la tumeur (Scarpella *et al.*, 2006). La surproduction de ces deux phytohormones dans la tumeur induit la synthèse de précurseurs de l'éthylène ayant un rôle fondamental dans la vascularisation de la tumeur (Deeken *et al.*, 2006). De plus, l'éthylène déclenche la biosynthèse d'acide abscissique, composé important pour la protection des tumeurs contre la sècheresse, éventuellement aux dépens de la plante hôte. D'une part, il limite les pertes d'eau dans la tumeur en renforçant leur surface et d'autre part, il contribue à la réorientation du flux d'eau des racines vers la tumeur en régulant les gènes

de stress pour augmenter le potentiel osmotique dans la tumeur, notamment via l'accumulation de proline (Efetova *et al.,* 2007). Le développement de la tumeur s'accompagne d'une élévation du niveau de divers métabolites de stress comme la proline ou l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Deeken *et al.,* 2006). L'accumulation de proline est une réponse physiologique commune à de nombreux stress biotiques et abiotiques, cet acide aminé est en particulier impliqué dans la réponse au stress osmotique. La proline est présente dans la tumeur selon un gradient de concentration allant en croissant du centre vers la périphérie de la tumeur (Wächter *et al.,* 2003). L'accumulation de GABA chez les plantes est fortement stimulée en condition de stress. Dans la tumeur, son accumulation pourrait provenir du glutamate, précurseur de la proline.

II-8 Interférences entre molécules végétales et régulation de type quorum sensing

Chez les bactéries associées aux plantes, de nombreux facteurs de virulence induits en réponse à des composés végétaux sont aussi contrôlés par le quorum sensing (chapitre III-4). Les systèmes de quorum sensing sont basés sur la production de molécules signal diffusibles qui s'accumulent dans l'environnement jusqu'à atteindre un niveau seuil qui déclenche la réponse des bactéries. Les molécules de la famille des N-acyl-homosérine lactones (AHL) sont les signaux du quorum sensing les plus répandus chez les bactéries à Gram négatif. *A. tumefaciens* est l'une des rares bactéries produisant à la fois des enzymes de synthèse et de dégradation des AHL. En effet, la bactérie produit deux lactonases, AiiB (Carlier *et al.,* 2003) et AttM (Zhang *et al.,* 2002) capables d'inactiver ces signaux par hydrolyse du noyau lactone (Figure 9). AiiB et AttM appartiennent à la superfamille des métallohydrolases nécessitant du zinc comme co-facteur.

Le gène *attM* est localisé sur le plasmide At, c'est le dernier gène de l'opéron *attKLM* (Carlier *et al.,* 2003 ; Zhang *et al.,* 2002) dont l'expression est contrôlée par un régulateur transcriptionnel de la famille IclR, AttJ (Zhang *et al.,* 2004). Le gène *attJ* est situé en amont de l'opéron *attKLM* et transcrit de façon divergente. La protéine AttJ se lie spécifiquement au promoteur de l'opéron *attKLM* (Chai *et al.,* 2007). Outre l'activité de dégradation des AHL via AttM, les protéines codées par l'opéron *attKLM* sont impliquées dans la voie d'assimilation de la γ-butyrolactone et du γ-hydroxybutyrate (Carlier *et al.,* 2004). Dans cette voie, AttM ouvre le noyau γ-butyrolactone pour produire du γ-hydroxybutyrate, qui lui-même est hydrolysé via AttL en semi-aldéhyde succinique (toxique chez la plante), puis transformé en acide succinique par AttK.

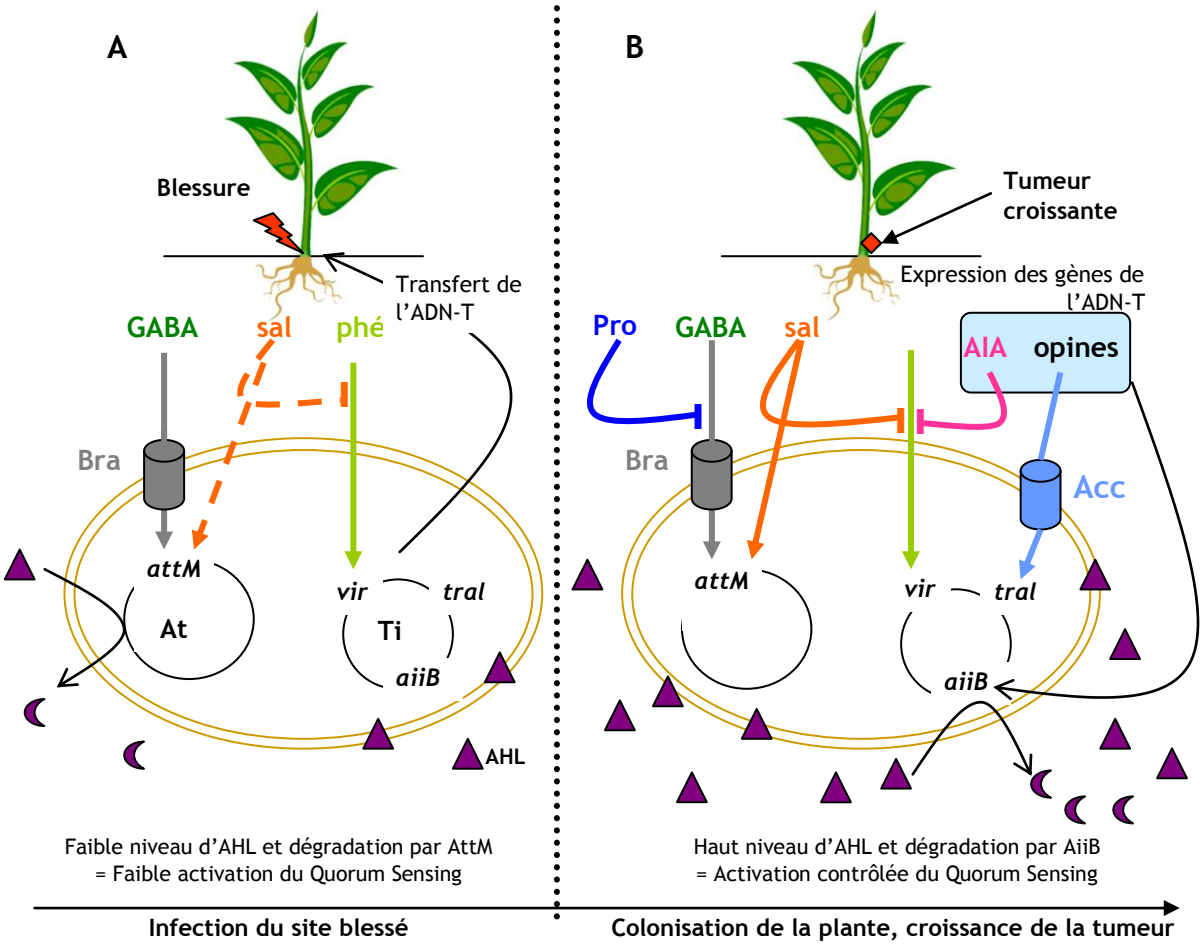


Figure 9 : Effet de molécules végétales sur la modulation de la régulation de type quorum sensing chez *A. tumefaciens* (d'après les travaux de Haudecoeur *et al.*, 2009)
(A) Lors d'une blessure, les composés phénoliques (phé) libérés par la plante activent l'expression des gènes *vir* d'*A. tumefaciens* provocant le transfert de son ADN-T aux cellules végétales. La bactérie perçoit, via le transporteur ABC Bra, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) accumulé au site de la blessure par la plante. Le GABA stimule l'expression de la lactonase AttM dont l'action perturbe la signalisation quorum-sensing, en dégradant les signaux acylhomoserine lactones (AHL). L'acide salicylique (sal), accumulé plus tardivement par la plante, active l'expression de l'opéron *attKLM* mais entre aussi en compétition avec les composés phénoliques pour inhiber l'expression des gènes *vir*.
(B) Dans la tumeur émergente, les opines sont synthétisées par la plante à partir de gènes transférés de l'ADN-T. Ces composés entrent dans les bactéries via le transporteur ABC Acc et activent la cascade de signalisation quorum-sensing en induisant la synthèse des AHL par TraI. L'effet de l'acide indole-3-acétique (AIA), auxine synthétisée par des gènes de l'ADN-T, s'ajoute à celui de l'acide salicylique pour inhiber l'expression des gènes *vir*. De plus, dans la tumeur vieillissante, la proline produite entre en compétition avec l'entrée du GABA pour empêcher l'induction de la lactonase AttM.

Chacun des intermédiaires de cette voie d'assimilation, excepté le produit final, l'acide succinique, sont des inducteurs de l'opéron *attKLM*. Une étude récente (Chai *et al.*, 2007) suggère que le semi-aldéhyde succinique est le véritable inducteur de l'expression de cet opéron. Il agirait en bloquant l'activité du répresseur AttJ (Wang *et al.*, 2006a). De plus, un rôle de la plante hôte dans l'expression de l'opéron *attKLM* a été mis en évidence : le GABA et l'acide salicylique, accumulés au site de blessures de la plante, induisent également l'expression de l'opéron *attKLM* (Figure 9) (Chevrot *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2007). Dans

ces conditions d'induction, *A. tumefaciens* n'accumule plus l'AHL qu'elle synthétise naturellement car elle devient capable d'inactiver ces signaux.

AiiB est codé par un gène du plasmide Ti (Carlier *et al.,* 2003) portant également les gènes *traI* et *traR*, respectivement liés à la synthèse et à la perception du signal AHL. Cette lactonase est active dans les tumeurs. Lorsque la tumeur se forme, des opines (octopine, nopaline, agrocinopines A et B) sont synthétisées par la plante grâce aux gènes bactériens présents sur l'ADN-T transféré, ces composés sont impliquées dans la nutrition des bactéries mais peuvent aussi jouer un rôle de signal. En particulier, les opines activent l'expression de *traI* et donc la synthèse d'AHL (Figure 9). En parallèle les agrocinopines A et B induisent l'expression du gène *aiiB* qui limite l'accumulation d'AHL dans le milieu. Cette induction nécessite un transport Acc fonctionnel permettant l'entrée des agrocinopines. La lactonase AiiB joue donc un rôle de modulateur de la signalisation quorum sensing lors de la colonisation de la plante. L'implication d'AttM est plutôt liée à l'infection du site blessé. Les lactonases AttM et AiiB sont donc régulées par différents signaux végétaux et impliqués à différentes étapes de l'interaction *A. tumefaciens* – plante (Haudecoeur *et al.,* 2009).

III. Induction des phytotoxines de *Pseudomonas syringae*

Les modèles d'interactions avec les plantes impliquant les bactéries des genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* ont pendant longtemps été les plus étudiés. Ces dernières années, les mécanismes d'interactions impliquant un système de sécrétion de type III (T3SS) ont beaucoup intéressés les phytopathologistes car ces bactéries sécrètent des protéines directement dans les cellules végétales, modifiant ainsi leur physiologie. *Pseudomonas syringae* présente une virulence multifactorielle et est un bon exemple de ces nouveaux modèles d'étude.

III-1 Les symptômes et les facteurs de virulence de *P. syringae*

Les symptômes de maladies dues à *P. syringae* sont nombreux et semblent parfois atypiques (Figure 10). Les symptômes dépendent de l'espèce de plante infectée, de la partie de plante infectée, de la souche de *P. syringae* et de l'environnement. Une variété de symptômes est associée aux plantes ligneuses infectées par *P. syringae* pv. syringae. Plus d'un symptôme peut apparaître simultanément sur une plante. Des taches ou des nécroses se forment sur les feuilles, elles sont d'apparences très diverses selon la souche et l'hôte. Un

seul rameau peut être touché ou plusieurs branches ou tout l'arbre (y compris les racines). Les bourgeons floraux deviennent noirs. Les fruits sont aussi infectés. Les veines des feuilles et les pétioles noircissent en conséquence d'une invasion systémique. Les chancres produisant un exsudat foncé sont un des symptômes les plus caractéristiques. Ils sécrètent une substance collante, la gomme, accompagnée parfois de fentes verticales ou d'un décollement de l'écorce. Des coulées importantes d'exsudat peuvent être visibles le long du tronc. Si les chancres continuent à s'élargir, ils peuvent causer la mort d'une branche ou de l'arbre entier. Quand les tissus autour d'une zone du chancre sont ôtés, le tissu en dessous apparaît rouge-brun. Les plantes affectées les plus communément et les plus grièvement par *P. syringae* sont des arbres : érables, cornouillers, noisetiers, magnolias, lilas, trembles, tilleuls, myrtilles, abricotier, pommier, poiriers, et citronnier. Ces bactéries causent des pertes économiques importantes en attaquant des arbres fruitiers mais aussi des plantes potagères (tomate, tabac, concombre, haricot, pois, soja). Diverses études montrent la nature très répandue de cette maladie. Ses effets ont aussi été étudiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Dans le cas des plantes annuelles cultivées, les bactéries sont probablement présentes dans le sol ou sur les graines, car elles colonisent d'abord l'extérieur de la plante. Elles peuvent infecter les cellules végétales de surface ou simplement coloniser la partie externe de la plante sans endommager le végétal qui n'est alors qu'un support.

Les bactéries peuvent ensuite pénétrer par des blessures et entamer une seconde phase de croissance dans l'apoplaste (ensemble des espaces intercellulaires), ou dans les tissus sous-corticaux (sous l'écorce) quand il s'agit d'un arbre. De très nombreux variants de *P. syringae* existent : plus de 40 pathovars sont connus. Les populations de cette bactérie co-évoluent depuis très longtemps avec les plantes. La mise en contact de bactéries et de plantes qui ont connu une évolution divergente dans des régions éloignées peut favoriser des souches qui apparaissent hautement virulentes faute de protection génétiquement programmée chez leurs hôtes.

Les principaux facteurs de virulence et d'interaction avec la plante de *P. syringae* sont sécrétés par un système T3SS (Hrp). Diverses souches possèdent également des déterminants de la virulence ne dépendant pas du système de sécrétion T3SS. Par exemple, les phytotoxines ne sont pas indispensables pour la pathogénie mais elles augmentent l'agressivité des souches (Bender *et al.,* 1999). Pour deux phytotoxines, la coronatine et la syringomycine, des signaux végétaux spécifiques sont détectés par les bactéries productrices de toxines. Ces signaux sont responsables de l'expression des gènes de biosynthèse des toxines.

A



B

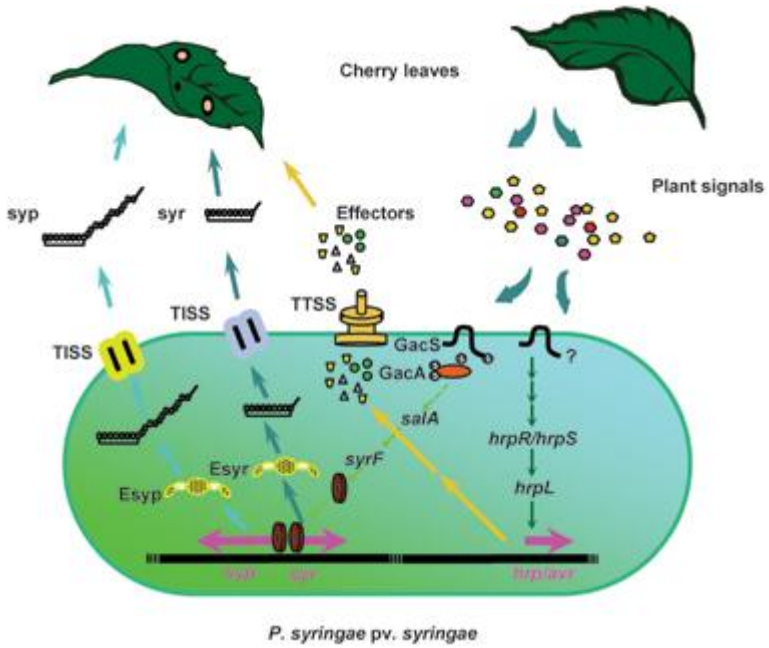


FIGURE 10 : Interaction entre *Pseudomonas syringae* et plantes hôtes
(A) Symptômes causés par *P. syringae* : nécrose brune sous-corticale, écoulement de gomme, décollement de l'écorce, taches nécrotiques.
(B) Induction de la production de phytotoxines par des signaux végétaux chez *Pseudomonas syringae* pv. syringae (d'après Wang *et al.*, 2006b). L'expression des gènes de biosynthèse de syringomycine (*syr*) et syringopeptine (*syp*) est induite par des molécules végétales, et les toxines sont sécrétées par un système de sécrétion de Type I (TISS). Les enzymes «nonribosomal peptide synthetases» impliquées dans la synthèse de *syr* et *syp* sont représentées par Esyr et Esyp, respectivement.

III-2 Induction de la synthèse de la syringomycine

La syringomycine est une toxine formant des pores qui s'insère dans la membrane plasmique de la plante et induit un flux d'ions, provoquant la lyse des cellules et la nécrose des tissues végétaux (Hutchison et Gross, 1997 ; Hutchison *et al.,* 1995). La biosynthèse de cette phytotoxine est codée par le cluster de gènes *syr* localisé sur le chromosome (Bender *et al.,* 1999 ; Guenzi *et al.,* 1998). L'induction des gènes de biosynthèse de la syringomycine a été détectée pendant l'infection de cerises immatures (Mo et Gross, 1991). Les premiers signaux responsables de l'induction sont des β-glycosides phénoliques spécifiques, dont l'arbutine (Figure 11). Ces composés sont abondants dans les feuilles, l'écorce et les fleurs de nombreuses espèces de plantes parasitées par *P. syringae* pv. syringae (Mo *et al.,* 1995 ; Mo et Gross, 1991). Les dérivés aglycone de ces composés sont inactifs comme inducteurs, suggérant que la liaison beta-glycosidique est nécessaire à l'activité du signal.

Les sucres spécifiques communs dans les tissus de plantes, y compris le fructose, le mannose et le saccharose, augmentent jusqu'à 5 fois l'expression des gènes *syr* (Mo *et al.,* 1995 ; Mo et Gross, 1991). L'effet de ces sucres est plus important à basses concentrations de glycosides phénoliques (de 1 à 10 µM). Ceci suggère que les sucres augmentent la sensibilité de *P. syringae* pv. syringae au signal phénolique. Ceci rappelle fortement la détection de composés phénoliques par *A. tumefaciens,* bien que la spécificité de sucre soit différente. Un facteur prédisposant à l'infection par *P. syringae* pv. syringae est la blessure par le froid (Gross *et al.,* 1984). Ceci peut provoquer une brusque libération des sucres associés aux tissus végétaux, aussi bien que des signaux glycosidiques, leur réserve étant compartimenté dans les vacuoles (Mo *et al.,* 1995). Les mécanismes permettant la détection des composés phénoliques et des sucres et l'activation de l'expression de l'opéron *syr* restent mal connus.

La production de syringomycine par *P. syringae* pv. syringae est contrôlée par les deux gènes régulateurs *salA* et *syrF*. Les protéines SalA et SyrF appartiennent à la famille LuxR et ressemblent aux protéines de cette famille quant à leurs propriétés de dimérisation et d'interaction avec l'ADN au niveau des régions promoteurs des gènes cibles (Wang *et al.,* 2006a). SyrF active directement les gènes *syr-syp* par liaison avec leur promoteur. L'effet de SalA sur l'expression de ces gènes se fait de façon indirecte, par une fixation sur le promoteur du gène régulateur *syrF*. Un système de régulation à deux composants GacS-GacA joue aussi un rôle important dans la régulation de la biosynthèse de la syringomycine, en contrôlant l'expression du gène régulateur *salA*. C'est donc une cascade de régulation impliquant GacA-GacS puis SalS puis SyrF qui permet l'activation des gènes de biosynthèse de la syringomycine chez *P. syringae.*

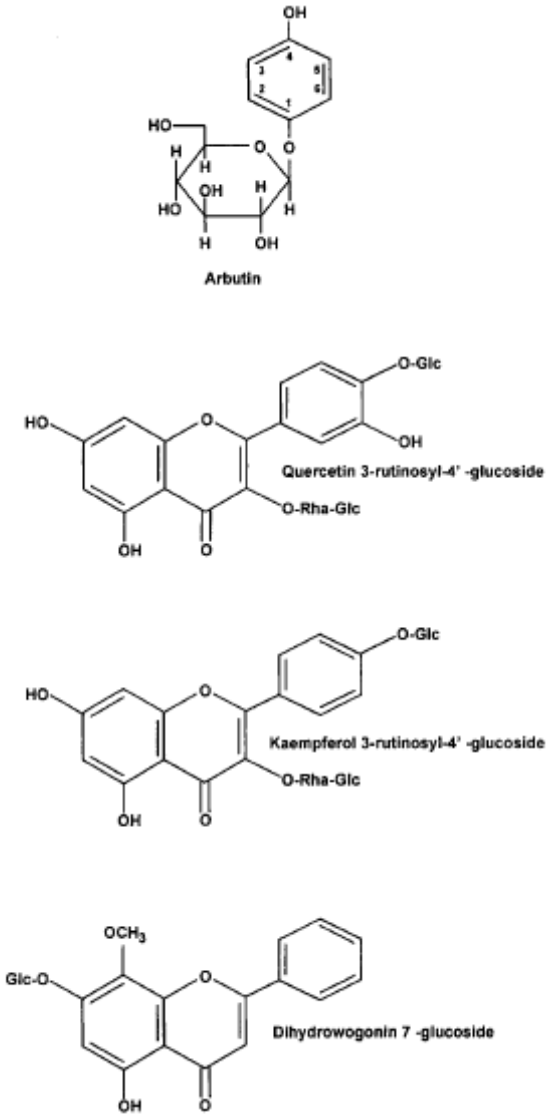


FIGURE 11 : Structure de composés phénoliques activant le gène *syrB* de *P. syringae* pv. syringae (d'après Bender *et al.*, 1999)
L'arbutine est trouvée dans de nombreuses plantes, dont le poirier.
Les glycosides flavonol (quercétine 3-rutinosyl-49-glucoside et kaempférol 3-rutinosyl-49-glucoside) et les glucosides flavanone (dihydrowogonine 7-glucoside) sont abondants dans les feuilles de cerisiers.

III-3 Induction de la synthèse de la coronatine

La coronatine est une phytotoxine non spécifique de l'hôte, induisant une chlorose. Elle est produite par diverses souches de *P. syringae* (Figure 12) (Gnanamanickam *et al.*, 1982 ; Mitchell *et al.*, 1983). Les gènes *cor* permettant la biosynthèse de la coronatine sont fortement induits par des extraits bruts ou du fluide intercellulaire de feuilles de tomates. Les composés actifs de cette induction ont été identifiés comme étant l'acide malique et l'acide citrique, avec une contribution mineure des acides shikimique et quinique (Li *et al.*, 1998). Ces deux derniers composés sont des intermédiaires de la voie de l'acide shikimique, qui est

la voie primaire de synthèse de la phénylalanine et des composés phénoliques chez les plantes. Plusieurs autres composés, y compris le glucose et l'inositol activent aussi les gènes de coronatine quand ils sont ajoutés à forte concentration (de 3 à 5 mM). Toutefois, l'acide shikimique et l'acide quinique (Fig. 1I et J) sont les seuls intermédiaires à montrer de l'activité à une concentration inférieure à 0,1 mM. Aucun de ces acides ne peut être utilisé comme source de carbone par *P. syringae*. L'activité signal de l'acide shikimique est augmentée 10 fois en présence de bas niveaux de glucose. Toutes ces données suggèrent que les deux acides sont les vrais signaux inducteurs des gènes *cor*. Les mécanismes permettant l'induction de la transcription des gènes de toxine par ces composés ne sont pas connus.

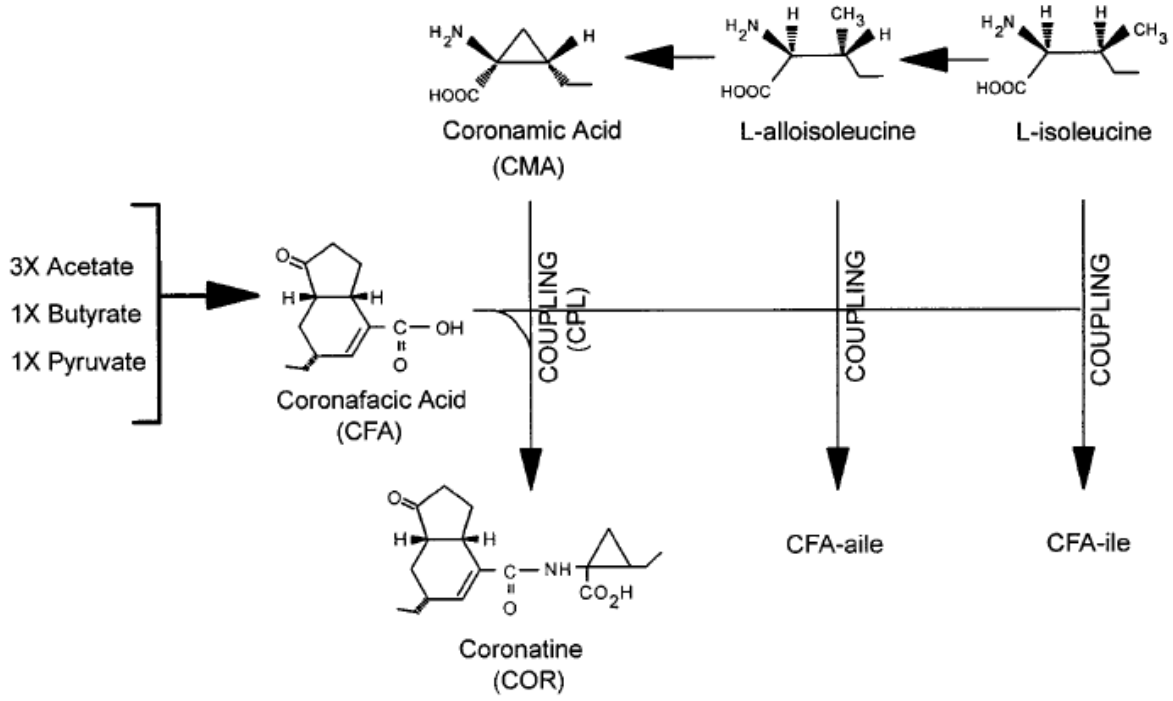


FIGURE 12 : Voie de biosynthèse de la coronatine chez *P. syringae* pv. glycinea (d'après Bender *et al.*, 1999)
La coronatine (COR) est formée d'un polykétide, l'acide coronafique (CFA), couplé par une liaison amide à un dérivé d'acide aminé, l'acide coronamique (CMA). L'acide coronafique est synthétisé sous forme de polykétide branché à partir de 3 unités acétate, une unité pyruvate, et une unité butyrate. L'acide coronamique est un dérivé cyclisé de la L-isoleucine, synthétisé via la L-alloisoleucine. Les analogues CFA-ile et CFA-aile résultent de la formation d'une liaison amide entre l'acide coronamique et un précurseur de l'acide coronamique, l'isoleucine ou l'alloisoleucine.

La synthèse de la coronatine est aussi très dépendante de la température, avec une expression optimale à 18°C. Cette thermorégulation est contrôlée par un système de régulation à deux composants atypique composé d'une histidine kinase CorS, d'un activateur de la transcription CorR et d'un modulateur CorP (Smirnova *et al.*, 2002). CorS jouerait le rôle d'un thermomètre membranaire permettant l'activation du gène de biosynthèse de la

coronatine au moment où la plante y est le plus vulnérable, par temps froid. Le facteur Sigma alternatif HrpL, nécessaire à l'expression des gènes du T3SS, participe aussi à la régulation de la biosynthèse de coronatine en agissant sur le gène *corR*. Inversement, CorR est impliqué dans l'expression du gène *hrpL* indiquant un rôle majeur de ces deux systèmes de régulation de la virulence chez *P. syringae* (Sreedharan *et al.,* 2006).

III-4 Régulation globale des phénotypes associés aux plantes

L'expression des gènes bactériens impliqués dans l'interaction plante-microbe est contrôlée par différents signaux moléculaires végétaux, mais aussi par des facteurs environnementaux typiques de l'habitat plante. Les voies de régulation permettant la réponse à des signaux spécifiques sont donc généralement intégrées dans des réseaux de régulation plus généraux. La capacité des bactéries à répondre à ces signaux dépend de régulateurs globaux dont les mécanismes de quorum sensing et le système GacA-GacS.

Chez plusieurs bactéries associées aux plantes, des phénotypes induits en réponse à de signaux spécifiques végétaux sont également contrôlés par le quorum sensing. Cette régulation est basée sur la production par les bactéries de signaux moléculaires diffusibles souvent nommés autoinducteurs. Ces molécules s'accumulent dans l'environnement et déclenchent une réponse bactérienne quand elles dépassent une concentration critique (Fuqua *et al.,* 1994). Le mécanisme de quorum sensing permet aux bactéries d'exprimer certains gènes uniquement lorsque la population atteint une forte densité cellulaire (Fuqua *et al.,* 1994). Les signaux les plus communs chez les bactéries Gram-négatives sont des molécules de la famille des N-acylhomosérine lactones (AHL). Le contrôle des gènes de virulence par la densité cellulaire permet le déclenchement de l'infection lorsqu'il y a un nombre suffisant de bactéries pour éviter ou dépasser les systèmes de défense de la plante hôte (Whitehead *et al.,* 2001). Plus récemment, il a été proposé que le rôle primaire des autoinducteurs sécrétés serait d'estimer le taux de diffusion local, caractéristique qui varie dans le microenvironnement des cellules (Redfield, 2002).

Le système à deux composantes GacS-GacA existe chez de nombreuses bactéries associées aux plantes et joue un rôle important chez les genres *Pseudomonas* (chapitre III) ou *Erwinia* (chapitre IV). Le système GacS-GacA contrôle une grande variété de phénotypes comme la synthèse d'enzymes extracellulaires et de métabolites secondaires nécessaires à l'interaction. GacS est une histidine kinase transmembranaire, contenant un domaine périplasmique, un domaine kinase cytoplasmique, et un domaine récepteur (Heeb et Haas,

2001). En réponse à des signaux environnementaux, GacS s'autophosphoryle puis transfére la phosphorylation vers le régulateur GacA (Zuber *et al.,* 2003). La nature du signal perçu par GacS est inconnue. Quand les bactéries sont en culture, les phénotypes dépendant de GacS-GacA sont exprimés surtout durant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Heeb et Haas, 2001). L'activation du système GacS-GacA impliquerait donc un mécanisme de type quorum sensing et ne dépendrait pas de la présence de signaux végétaux. Une souche de *P. fluorescens* synthétise un signal extracellulaire activant des phénotypes dépendant de GacS-GacA (Zuber *et al.,* 2003). Cet activateur est extrait à l'aide de solvants organiques, sa masse moléculaire est basse, mais ce n'est pas une AHL (Zuber *et al.,* 2003). Chez *P. syringae*, l'expression de *gacA* est élevée pour une haute densité bactérienne ou dans un milieu minimum induisant le système *hrp* codant le T3SS et ses effecteurs (Chatterjee *et al.,* 2003). L'inactivation de *gacA* de *P. syringae* réduit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation: *rpoN* codant un facteur sigma alternatif, *hrpRS* codant un régulateur de *hrpL* qui contrôle lui-même l'expression du T3SS, *rpoS* codant un facteur sigma alternatif de réponse au stress, *ahlR* et *ahlIl* codant le système de régulation du quorum sensing , *salA* codant un régulateur de la virulence, *corS* et *corR* codant les régulateurs de la biosynthèse de la coronatine. Ces résultats montrent que, chez *P. syringae*, le système GacA-GacS est situé au sommet de la hiérarchie des régulateurs contrôlant la virulence.

IV. Induction des enzymes pectinolytiques par les *Erwiniae*

IV-1 Les pectate lyases et la macération

Le genre *Erwinia*, nommé en 1920 en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, réunissait les entérobactéries pathogènes des plantes. Plus récemment, la comparaison des séquences d'ADN 16S et les structures secondaires des ARN correspondants a conduit à dissocier ces bactéries en quatre genres (Hauben *et al.,* 1998): *Erwinia, Pectobacterium, Brenneria* et *Pantoea*. De nouvelles analyses ont suggéré une classification incluant en plus le genre *Dickeya* (Samson *et al.,* 2005). Bien qu'incorrect pour certaines souche, le terme *Erwinia* reste très utilisé par la communauté de chercheurs qui attendent une classification définitive.

Erwinia chrysanthemi (ou *Dickeya dadantii*) et *Erwinia carotovora* (ou *Pectobacterium carotovorum*) provoquent une maladie appelée pourriture molle (« soft-rot ») sur de

nombreuses plantes (Figure 13) (Collmer et Keen, 1986 ; Perombelon, 2002). *E. chrysanthemi* est surtout présente dans des climats tropicaux ou subtropicaux. Dans les zones tempérées, elle infecte principalement des plantes cultivées en serre telle que le saint paulia (*Sainpaulia ionantha*), hôte naturel de la souche 3937 largement utilisée pour les études génétiques. Le processus de macération implique une dépolymérisation de la paroi végétale, qui est réalisée par une combinaison d'enzymes extracellulaires : pectate lyases (Pel), pectine méthylesterases (Pem), pectine lyases (Pnl), polygalacturonases (Peh), cellulases (Cel) et protéases (Prt).



FIGURE 13 : Symptômes provoqués par *E. chrysanthemi*
A. Pourriture de feuilles de *Saintpaulia ionantha,*
B. Pourriture de tiges de pomme de terre (*Solanum tuberosum*),
C. Pourriture de tubercules de pomme de terre.

Toutes ces enzymes, à l'exception des protéases, sont sécrétées dans le milieu externe par un système de sécrétion de type II. Celui-ci est essentiel pour le pouvoir pathogène des *Erwinia*, il est codé par l'opéron *out* (Salmond, 1994). Les protéases sont sécrétées par un mécanisme de type I, nommé *prt* (Létoffé *et al.,* 1990). Les pectate lyases jouent un rôle majeur dans le catabolisme de la pectine chez les bactéries et dans les symptômes de macération du tissu végétal (Figure 14). La souche 3937 d'*E. chrysanthemi* produit cinq isoenzymes de pectate lyase dits majeurs car ayant une forte activité *in vitro,* elles sont codées par les gènes *pelA, pelB, pelC, pelD* et *pelE*. Ces gènes sont organisés en deux

clusters, *pelADE* et *pelBC*. Les protéines PelA, PelD et PelE sont homologues, de même que PelB et PelC, ce qui suggère que des duplications de gènes récentes sont à l'origine de ces isoenzymes (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Ces pectate lyases appartiennent à la famille 1 des polysaccharides lyases (PSL). Chaque gène *pel* est transcrit sous le contrôle de son propre promoteur. Aucun gène *pel* n'est indispensable à la virulence (Beaulieu *et al.*, 1993). De plus, par la délétion des cinq gènes *pel* majeurs n'élimine pas totalement la capacité de macération (Beaulieu *et al.*, 1993) suggérant qu'*E. chrysanthemi* produit d'autres pectate lyases capables de dégrader les tissus végétaux, en plus de PelA, PelB, PelC, PelD et PelE. Trois de ces gènes, *pelL*, *pelI* et *pelZ* ont pu être identifiés grâce à des tests de détection très sensibles de l'activité pectate lyases ou l'identification de gènes induits en présence de pectine, ils codent des protéines de différentes familles : PSL9, PSL3 et PSL1 respectivement (Lojkowska *et al.*, 1995 ; Pissavin *et al.*, 1997, Shevchik *et al.*, 1997).

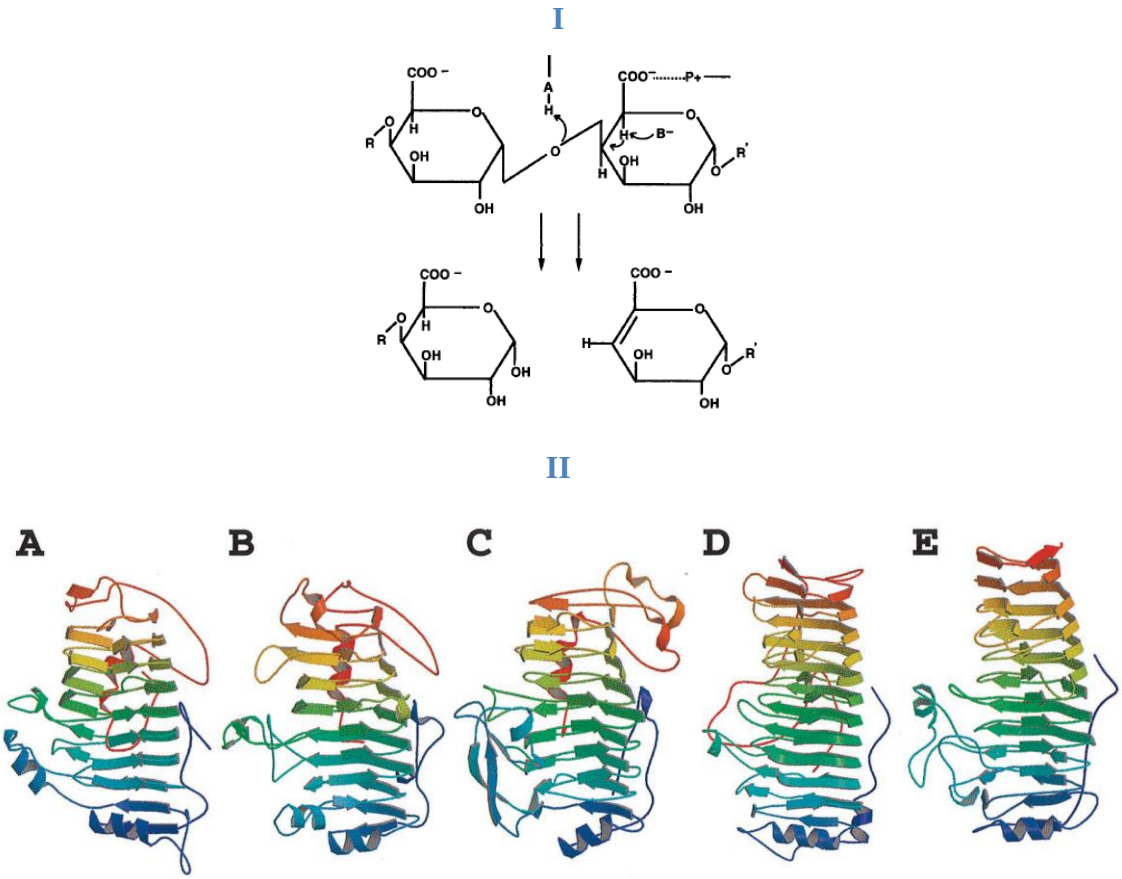


FIGURE 14 : Les pectate-lyases: activité enzymatique et structure
(I) Clivage de l'acide α-1,4-polygalacturonique (PGA) par le mécanisme de β-élimination.
Trois groupements de l'enzyme contribuent au mécanisme catalytique: **P+** neutralise la charge de l'acide carboxylique; **B** est une base générale qui retire le proton de C-5; **A** est impliqué dans le transfert du proton vers l'oxygène de la liaison glycosidique, laissant une double liaison entre C-4 et C-5.
(II) Structure de pectinases en hélice de feuillets β parallèles (d'après Herron *et al.*, 2000). La structure secondaire prédominante de ces enzymes est une série de feuillets β. (*A*) pectate lyase C d'*E. chrysanthemi*. (*B*) pectate lyase E d'*E. chrysanthemi*. (*C*) pectin lyase B d'*A. niger*. (*D*) polygalacturonase d'*E. carotovora*. (*E*) rhamnogalacturonase A d'*A. aculeatus*.

IV-2 Détection des produits de dégradation de la pectine

La pectine, par intermédiaire de ces produits de dégradation, est le principal signal provoquant l'induction des gènes impliqués dans la voie de dégradation de la pectine (ou pectinolyse). L'expression de ces gènes est induite en présence du polysaccharide de base de la pectine, le polygalacturonate (PGA) ou, moins efficacement, en présence du monomère, le galacturonate (Figure 15). L'analyse de mutants déficients pour chacune des étapes de la pectinolyse a permis l'identification des inducteurs vrais intracellulaires, principalement le KDG (2-céto-3-désoxygluconate), mais aussi le DKI (5-céto-4-désoxyuronate) et le DKII (2,5-dicéto-3-désoxygluconate) (Condemine *et al.,* 1986 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1987 ; Reverchon et Robert-Baudouy, 1987). Ces composés sont produits par le clivage des longues chaines de polymères pectiques grâce à un faible niveau de base des pectate lyases, complété par l'action d'enzymes intracellulaires (Figure 15).

Le régulateur KdgR est responsable de l'induction des gènes de pectinases en présence de pectine ou de ses métabolites (Condemine et Robert-Baudouy, 1987 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.,* 1996 ; Nasser *et al.,* 1994 ; Nasser *et al.,* 1992). KdgR est un régulateur de tous les gènes impliqués dans le catabolisme de la pectine, du système de sécrétion *out* et d'autres étapes associées à la pectinolyse (Condemine *et al.,* 1992 ; Rodionov *et al.,* 2004). KdgR appartient à la famille IclR de protéines régulatrices, contrôlant souvent des voies cataboliques, comme IclR chez les entérobactéries, GlyR chez *Streptomyces coelicolor*, et PobR chez *Acinetobacter calcoaceticus* (Reverchon *et al.,* 1991). En absence du signal inducteur, KdgR agit comme répresseur de l'expression des gènes cibles. Cette protéine se fixe sous forme de dimère sur des régions de 25-bp de l'ADN, les boites KdgR. Celles-ci chevauchent ou sont au voisinage des sites -35 et -10 des promoteurs des gènes contrôlés. En se fixant sur ces boîtes, KdgR entre en compétition avec l'ARN polymérase. Les complexes KdgR-ADN peuvent être dissociés *in vitro* par addition de KDG (Nasser *et al.,* 1992). Un certain nombre d'analogues du KDG ont été testés en tant qu'inducteurs. Toutes les molécules inductrices contiennent le motif COOH-CO-CH2-CHOH-C-C dans un cycle pyranique (Nasser *et al.,* 1991). Ce motif est également retrouvé dans le DKI et le DKII, mais l'interaction directe entre ces deux composés et KdgR n'a pas été vérifiée (Figure 16).

Le catabolisme du galacturonate est distinct de celui du DKI et sa régulation est également indépendante. Les gènes impliqués dans l'utilisation du galacturonate sont sous le contrôle du répresseur de la famille GntR, nommé ExuR. (Figure 16) (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1983, 1987). Cette régulation semble répondre à la présence des

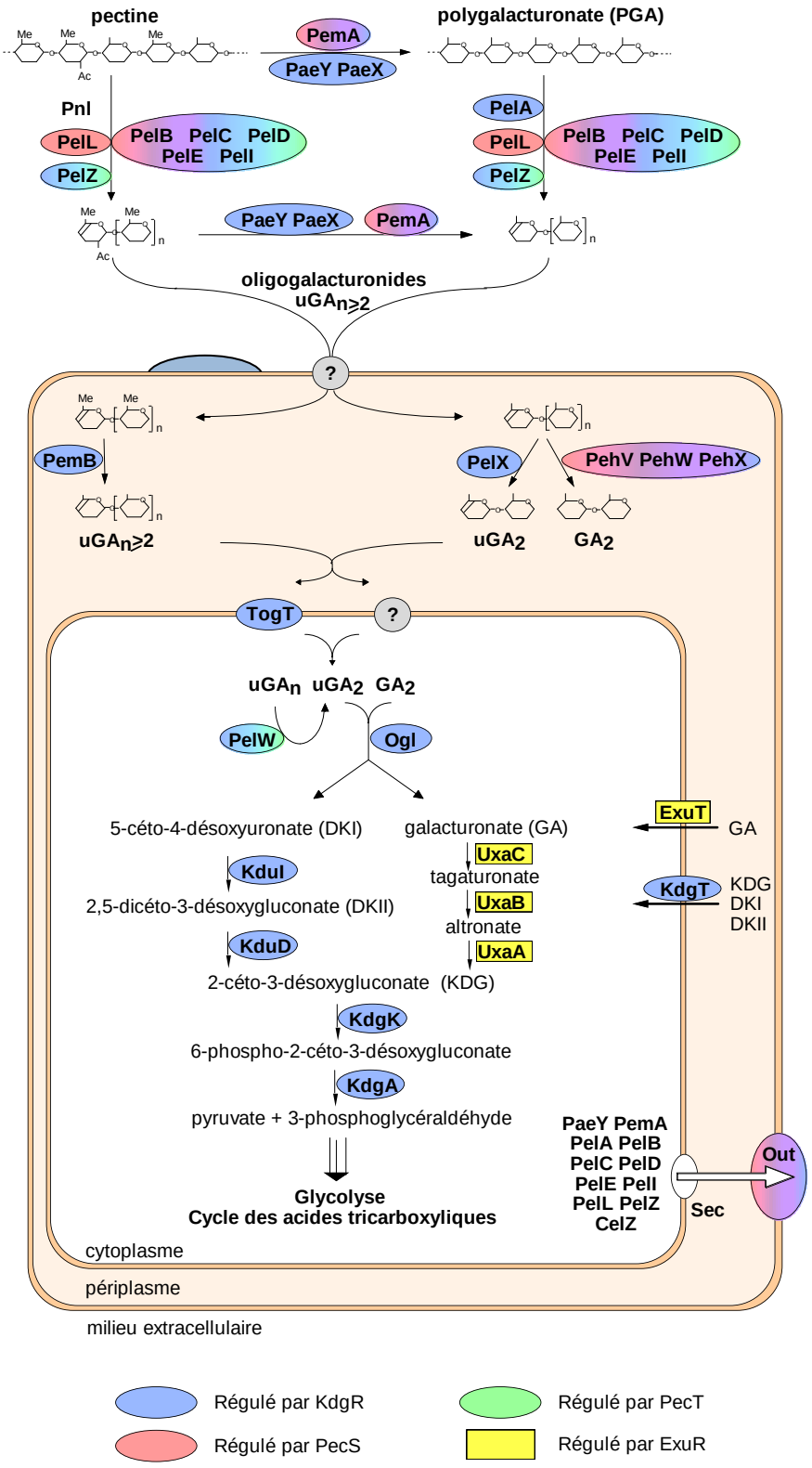


FIGURE 15 : Voie de dégradation de la pectine et sa régulation chez *E. chrysanthemi*
Les pectinases extracellulaires dégradent la pectine en oligogalacturonides, majoritairement insaturés (uGAn). Ces composés entrent dans le périplasme où leur dégradation est poursuivie par l'action des pectinases périplasmiques. Les oligomères plus courts traversent la membrane interne et se retrouvent dans le cytoplasme où ils sont catabolisés.
La couleur du cadre entourant ces étapes indique que leur synthèse est régulée par KdgR (bleu), PecS (rouge), PecT (vert), ExuR (jaune) ou plusieurs de ces régulateurs (gamme de coloration).

intermédiaires de la voie métabolique (galacturonate, tagaturonate, altronate) mais l'interaction entre ces composés et ExuR n'a pas été étudiée.

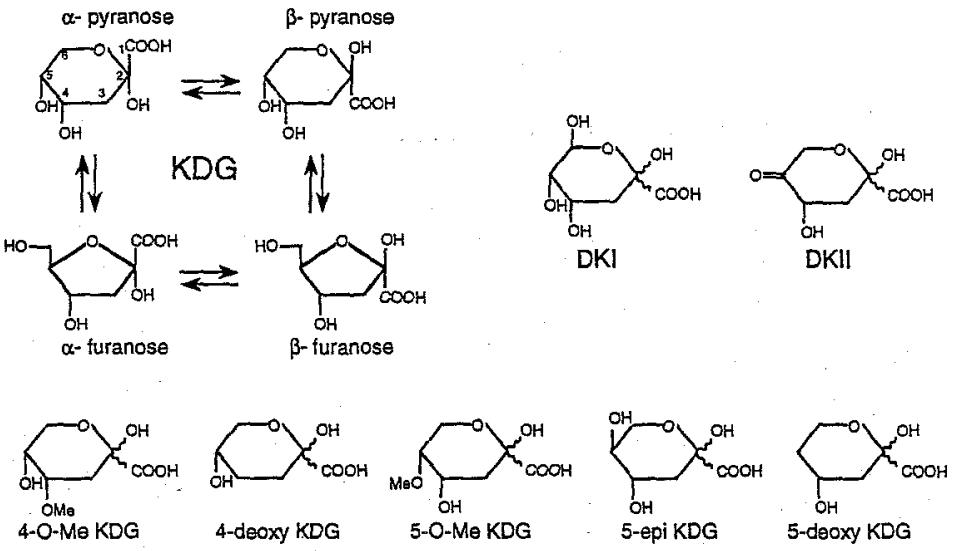


Figure 16 : Structure des inducteurs interagissant avec le répresseur KdgR (Robert-Baudouy *et al.*, 2000)
Les structures des quatre isoformes du KDG (en équilibre), du DKI, du DKII et de quelques analogues synthétiques sont représentées.

IV-3 Le régulateur RhaS et la réponse au rhamnose

Les régions ramifiées des pectines sont constituées d'une chaine de base de rhamnogalacturonate comportant une grande proportion de chaines latérales formées de sucres neutres. Elles sont donc riches en résidus L-rhamnose. Deux gènes adjacents d'*E. chrysanthemi*, *rhiT* et *rhiN*, sont induits par la présence simultanée de PGA et de L-rhamnose (Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004). De plus, les gènes *rhiT* et *rhiN* sont fortement induits pendant l'infection de la plante. Diverses données indiquent que RhiT et RhiN codent des étapes nécessaires au catabolisme du rhamnogalacturonate. RhiN est une enzyme capable de dégrader les oligosaccharides libérés par la rhamnogalacturonate lyase RhiE. RhiT sert probablement au transport de ces oligosaccharides. L'induction de l'opéron *rhiTN* en présence de PGA dépend du répresseur KdgR. Son induction en présence de rhamnose est médiée par l'activateur RhaS. La virulence d'un mutant *rhaS* d'*E. chrysanthemi* est nettement réduite. RhaS contrôle positivement la transcription de l'opéron *rhaBAD*, nécessaire au catabolisme du rhamnose, mais surtout il participe à la dégradation des polysaccharides végétaux contenant ce sucre, en agissant sur les gènes *rhiE*, *rhiT* et *rhiN* (Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004).

IV-4 Induction des enzymes pectinolytiques par des extraits de plante

Les extraits de plantes influencent l'expression des gènes de pectate lyases d'*E. chrysanthemi*. La transcription des gènes *pel* est induite par les métabolites dérivés du PGA. Cette induction est stimulée en présence d'extraits de plante, mais uniquement en synergie avec le PGA. Dans un mutant *ogl* qui n'a plus la capacité de produire des inducteurs (KDG, DKI ou DKII) à partir du PGA, les extraits de plantes ne montrent aucune activité inductrice. Les différents gènes *pel* majeurs montrent des sensibilités variables aux signaux végétaux. L'expression de *pelE* et *pelA* est moyennement affectée, celle de *pelB* et *pelC* est un peu plus induite et celle de *pelD* est très sensible à ces signaux (Bourson *et al.,* 1993 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.,* 1992). La nature chimique des facteurs inducteurs présents dans les extraits végétaux n'est pas connue. Une caractérisation préliminaire du facteur inducteur à partir de racines de carotte a montré que ce composé est thermorésistant, qu'il possède une faible masse moléculaire et qu'il est hydrophile, ce qui est compatible avec une nature oligosaccharidique (Bourson *et al.*, 1993).

Le gène *pir* (« Plant-Inducible Regulator ») code un régulateur qui serait en partie responsable de l'induction par les extraits végétaux (Nomura *et al.,* 1998). Chez la souche EC16 d'*E. chrysanthemi,* une mutation *pir* provoque une perte de l'induction du gène *pelE* (= *pelD* de 3937) par les extraits de plantes. Pir est une protéine de 30-kDa capable de se fixer à l'ADN. Elle appartient à la famille IclR, comme KdgR. Pir fonctionne comme dimère et se fixe sur une séquence d'ADN de 35-bp dans la région promoteur de *pelE* (Nomura *et al.,* 1998). Le site de fixation du Pir chevauche celui de KdgR, Pir et KdgR entrant en compétition pour leur fixation sur la région promoteur (Nomura *et al.,* 1998). Cependant, le gène *pir* de la souche 3937 ne semble pas jouer le rôle d'activateur en réponse à un signal végétal décrit chez EC16 (Reverchon S., résultats non publiés).

Les enzymes pectinolytiques d'*E. carotovora* sont également induites par des facteurs présents dans un extrait végétal. Le niveau extracellulaire des enzymes Pel, Cel, Peh et Prt augmente fortement dans un milieu enrichi en extrait de céleri, dont l'addition provoque une induction considérablement plus forte que celle du PGA seul (Murata *et al.,* 1991). Cette induction implique le gène *aepA* (« Activator of Extracellular protein Production ») (Liu *et al.,* 1993 ; Murata *et al.,* 1991), qui code pour une protéine de 51-kDa. La protéine AepA ne présente pas de domaine typique de fixation à l'ADN mais elle possède plusieurs domaines hydrophobes, suggérant que c'est une protéine localisée dans la membrane. AepA pourrait agir comme détecteur de signaux de l'environnement, transmettant probablement cette

information à une protéine régulatrice non identifiée (Liu *et al.,* 1993). La fusion *aepA-lacZ* est elle-même inductible en présence de PGA et d'extrait de céleri. Cette induction n'exige pas que le gène *aepA* soit fonctionnel, ce qui indique que sa régulation s'effectue par un autre système encore inconnu.

IV-5 Effet du pH sur les gènes de pectate-lyases

Le pH intervient à la fois dans l'expression des gènes de virulence et dans l'activité intrinsèque des pectinases extracellulaires (Tardy *et al.,* 1997). Au moment de l'infection d'une plante, les bactéries colonisent en premier lieu le fluide apoplastique intercellulaire qui possède un pH acide, de 4,5 à 6,5 (Alfano et Collmer, 1996; Expert, 1999). Chez la souche d'*E. chrysanthemi* 3937, l'expression des gènes de pectate lyases est dépendante du pH mais avec des effets variables selon les gènes : *pelA* et *pelD* sont préférentiellement transcrits à pH acide, ce qui n'est pas le cas de *pelE*. Les enzymes PelA et PelD semblent donc plutôt synthétisées au début de l'infection, quand le pH intercellulaire est acide. La libération par PelA d'oligogalacturonides de hauts poids moléculaires activerait les réactions de défenses de la plante, se traduisant par l'influx d'ions H^+ dans les cellules végétales et par l'augmentation du pH du milieu intercellulaire. Cette augmentation de pH permettrait l'induction de la synthèse de nouvelles enzymes comme PelE et serait plus favorable à l'activité enzymatique de toutes les pectate lyases (Nachin et Barras, 2000). Ainsi une production séquentielle des pectate-lyases aurait lieu au cours de l'infection. Le mécanisme de régulation de l'expression des gènes *pel* en réponse au pH est inconnu.

IV-6 Les protéines PecS et PecT impliquées dans la régulation des gènes *pel*

L'analyse de mutants présentant une activité Pel supérieure a conduit à la caractérisation des régulateurs PecS et PecT. Ces régulateurs ont été très étudiés bien qu'on ne connaisse toujours pas les signaux auxquels ils répondent.

PecS réprime l'expression de la plupart des gènes *pel*, mais aussi des gènes *ind* impliqués dans la biosynthèse de l'indigoïdine (un pigment bleu) et de nombreux gènes dont beaucoup sont impliqués dans la résistance au stress oxydant (Reverchon *et al.,* 1994; Reverchon *et al.,* 2002; Hommais *et al.,* 2008). Par contre, PecS agit comme activateur de l'expression des gènes *peh*, probablement en inhibant la fixation du répresseur KdgR à l'ADN (Nasser *et al.,* 1999). PecS interagit, sous forme de deux dimères, avec des zones

d'ADN d'environ 40 paires de bases situées au niveau des promoteurs des gènes contrôlés (Praillet *et al.,* 1997). L'étude du locus contenant *pecS* a mis en évidence le gène *pecM,* transcrit de façon divergente à PecS. Le fonctionnement de PecS est intimement lié à la présence de PecM qui aurait la propriété de potentialiser l'activité de PecS. L'analyse de PecM suggère que cette protéine est ancrée dans la membrane interne (Reverchon *et al.,* 1994). Le signal inducteur auquel répond PecS reste inconnu. La protéine PecS appartient à la famille MarR de régulateurs transcriptionnels. Certains régulateurs de cette famille ont comme inducteurs des composés phénoliques. Si cette propriété est conservée, PecS pourrait être impliqué dans la reconnaissance de composés phénoliques. Cependant, l'implication de gènes cibles dans la résistance au stress oxydant suggère plutôt une réponse aux composés oxydants produits par la plante infectée.

Le répresseur PecT contrôle la synthèse de la plupart des pectate lyases mais également celle des exopolysaccharides de surface qui constituent un autre facteur de virulence d'*E. chrysanthemi* (Surgey *et al.,* 1996). PecT appartient à la famille LysR de régulateurs. PecT est capable d'interagir, sous forme de deux dimères, avec les régions régulatrices des gènes contrôlés (Castillo *et al.,* 1998). Le signal inducteur auquel répond PecT n'est pas connu. Un homologue de PecT, nommé HexA, existe chez *E. carotovora* où il régule différents déterminants de la virulence (Harris *et al.,* 1998).

Bien que les signaux déclenchant l'activation de ces deux régulateurs restent inconnus, PecS et PecT participent à la coordination de l'expression de nombreuses fonctions impliquées dans le pouvoir pathogène, ce qui permet aux bactéries d'ajuster l'expression des facteurs de virulence lors des différentes phases de l'infection.

IV-7 Analyse des régulateurs de la famille LacI d'*E. chrysanthemi*

La souche 3937 d'*E. chrysanthemi,* isolée de saint paulia, est devenue un modèle d'étude des entérobactéries pectinolytiques. L'obtention récente de son génome complet (4 923 kb) (http://asap.ahabs.wisc.edu/annotation/php/ASAP1.htm) a mis en évidence de nombreux gènes de fonction inconnue existant chez d'autres bactéries pathogènes. Une vingtaine de régulateurs sont déjà connus pour être impliqués dans le contrôle des déterminants de la pathogénie. Le génome *d'E. chrysanthemi* code au moins 400 protéines jouant un rôle dans la régulation de la transcription, dont 331 régulateurs potentiellement capables de se lier à l'ADN et répartis en différentes familles (Figure 17).

En particulier, 18 gènes de la souche 3937 codent un régulateur de la famille LacI (Tableau 3, Figure 18). Les gènes *cytR*, *fruR*, *galR*, *galS*, *gntR*, *lacI*, *purR* et *rbsR* sont retrouvés chez *Escherichia coli* et leur fonction est bien connue. La fonction de trois autres gènes a été récemment déterminée chez *E. chrysanthemi*, une prédiction pouvant être faite sur la base d'homologies de séquences. C'est le cas de *ganR* impliqué dans le catabolisme du galactane (Delangle *et al.*, 2007), de *rafR* qui contrôle l'utilisation du raffinose et du mélibiose et de *scrR* qui régule le catabolisme du saccharose (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Charaoui-Boukerzaza, 2009).

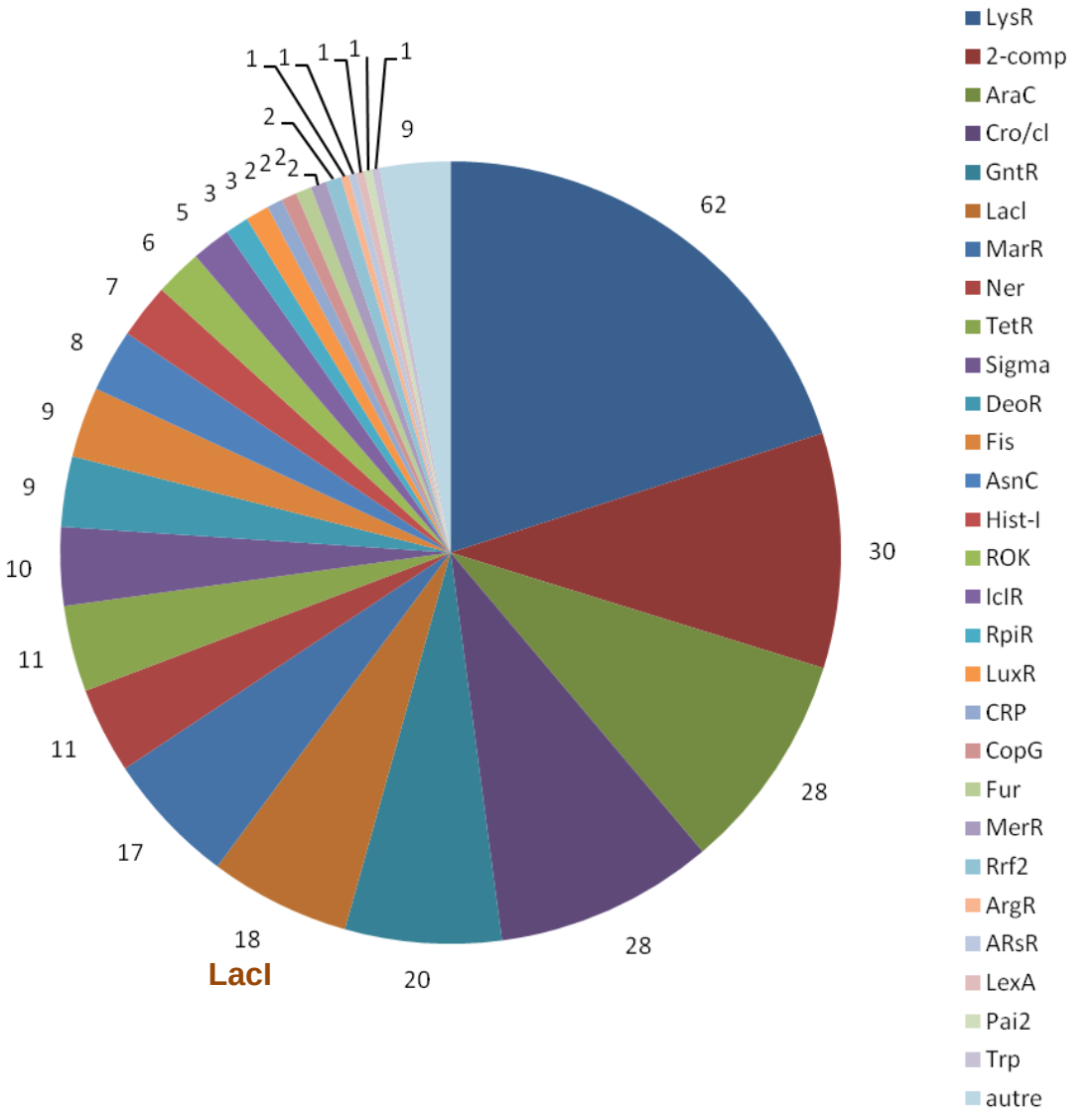


Figure 17 : Les régulateurs transcriptionnels d'*E. chrysanthemi*
Le génome de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* code 331 régulateurs transcriptionnels potentiels, ce qui représente environ 7% des gènes. En se basant sur des homologies de séquence, 18 de ces régulateurs appartiennent à la famille LacI.

TABLEAU 3 : Les 18 régulateurs de la famille LacI codés par le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 (Van Gijsegem *et al.*, 2008)

[a] Le meilleur score est souligné. Le degré d'identité avec un homologue impliqué dans une autre voie est placé entre parenthèse, avec le nom de cet homologue.

[b] *E. coli* K12 ou d'autres souches d'*E. coli* ou de *Shigella*.

[c] Sont indiqués seulement les genres codant un homologue présentant un score d'identité égal ou supérieur à celui trouvé avec des protéines d'*E. coli*.

[d] Chez *E. coli*, RafR et ScrR sont codés par des éléments génétiques mobiles, plasmides ou transposons. Un homologue de LfaR est trouvé dans un îlot génomique d'une souche d'*E. coli* pathogène aviaire.

Numéro Identification	Nom	% d'identité avec [a] *E. coli* [b]	*E. carotovora*	Autres bactéries [c]
18277	FruR	89	89	90 *Yersinia*, 89 *Salmonella*
14676	PurR	80	92	86 *Yersinia*, 86 *Photorhabdus*
18375	GalS	76	(56 GalR)	77 *Salmonella*
18477	GalR	75	71	77 *Yersinia*, 75 *Salmonella*
15046	GntR	72	69	72 *Yersinia*, 72 *Salmonella*
18142	RbsR	69	83	70 *Salmonella*, 69 *Photorhabdus*
20411	CytR	66	74	68 *Yersinia*, 66 *Salmonella*
15766	LacI	55	62	
19140	RafR	55 [d]	59	55 *Yersinia*
16544	ScrR	62 [d]	84	66 *E. amylovora*, 64 *Klebsiella*, 62 *Salmonella*
18202	GanR	(42 LacI)	(47 LacI)	85 *Yersinia*
15303	LfaR	52 [d]	67	57 *Yersinia*
18466	LfdR	(46 AscG)	71	62 *Salmonella*
19202	LfgR	-	78	40 *Rhizobium*, 39 *Agrobacterium*
18801	LffR	-	75	60 *Mannheimia*, 41 *Thermoanaerobacter*, 40 *Oceanobacillus*, 37 *Bacillus*
18558	LfeR	-	67	76 *Salmonella*, 48 *Ralstonia*, 39 *Streptomyces*, 37 *Pseudomonas*, 35 *Agrobacterium*
18397	LfcR	(31 ScrR)	(29 ScrR)	35 *Chromobacterium*, 31 *Vibrio*
16819	LfbR	-	(32 ECA4246)	34 *Rhizobium*

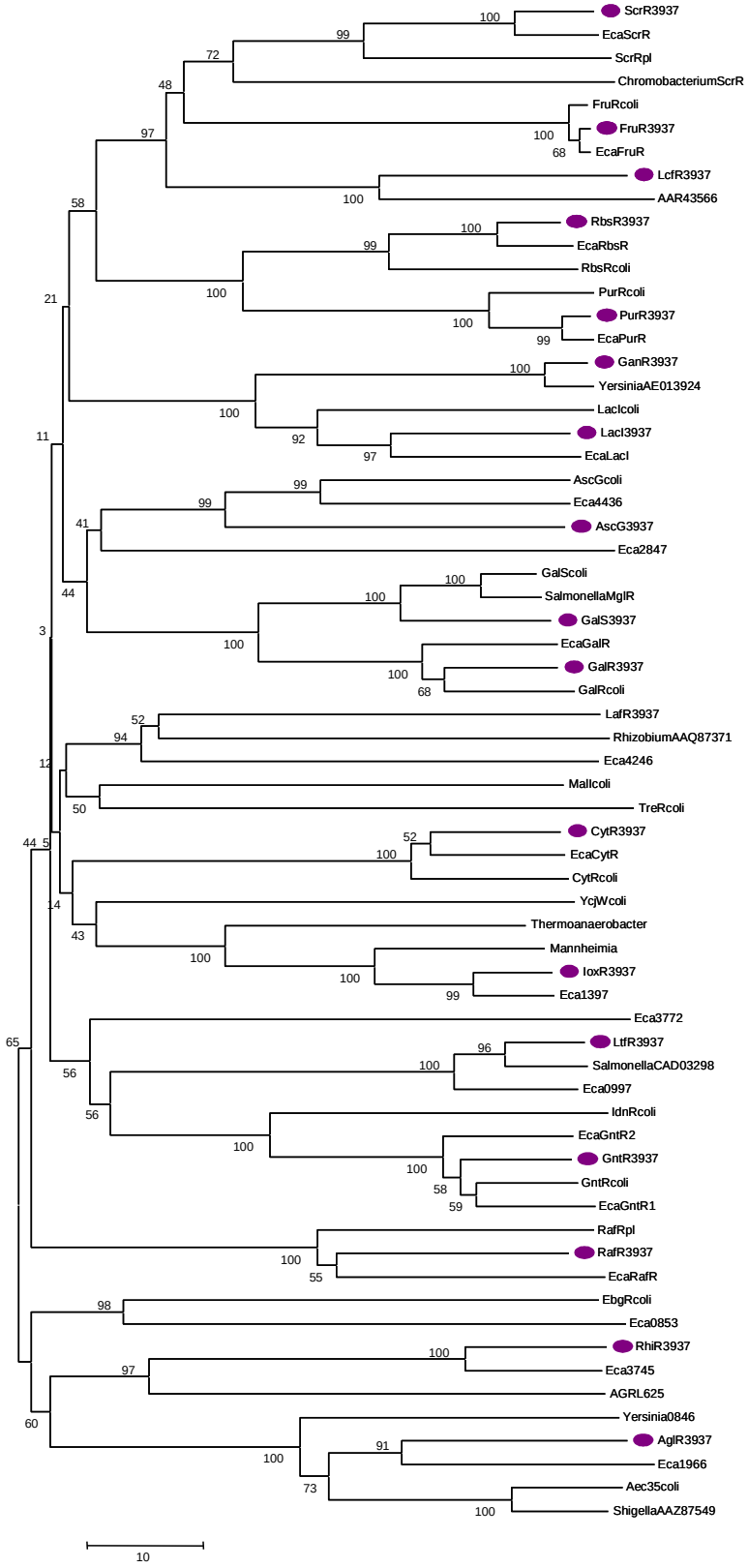


Figure 18 : Arbre phylogénique des régulateurs de la famille LacI (d'après Cornu, 2006)
Cet arbre a été réalisé à partir des séquences de protéines régulatrices appartenant à la famille LacI. Il a été obtenu avec le logiciel de phylogénie MEGA. Les régulateurs proviennent de différentes bactéries (ceux d'*E. chrysanthemi* sont indiqués par un rond de couleur).

Les 7 autres gènes codant un régulateur de la famille LacI ont été nommés *lfaR, lfbR, lfcR, lfdR, lfeR, lffR* et *lfgR*. La fonction de ces gènes est totalement inconnue. Des homologues de *lfdR* et *lfaR* existent chez *Yersinia pestis*. Le gène *lfgR* est présent chez *A. tumefaciens* et *lfcR* a un orthologue chez *Chromobacterium violaceum*. Leur organisation génétique suggère que ces gènes régulent probablement des gènes de structure voisins dont la fonction est à ce jour également inconnue. Les régulateurs de la famille LacI sont en grande majorité impliqués dans la régulation de voies de dégradation de composés qui jouent aussi le rôle d'inducteurs de ces voies (Figure 19) (Lewis, 2005).

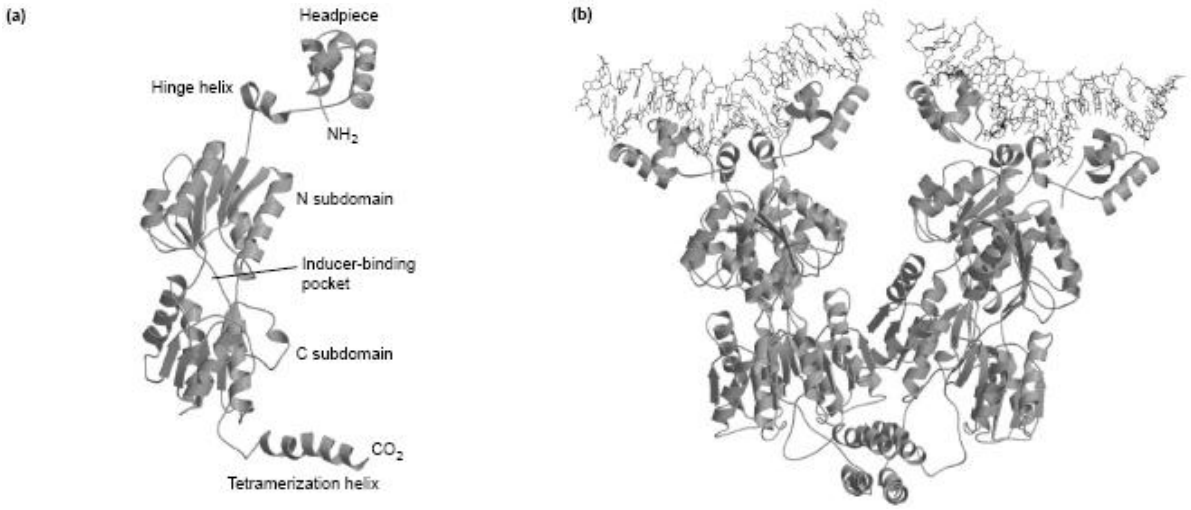


FIGURE 19 : Structure du répresseur LacI lié à l'ADN (PDB code 1LBG ; d'après Bell et Lewis, 2001)
(a) Structure du monomère. La poche liant l'inducteur est localisée à la jonction entre les sous domaines N et C. En absence d'ADN, l'hélice n'est pas repliée et la structure est mobile.
(b) Structure en forme en V du répresseur tétramérique lié à son site opérateur idéal (séquences répétées inversées de 21 paires de bases parfaitement symétriques). Les hélices N-terminales de la protéine se fixent sur le petit sillon de l'ADN.

L'analyse systématique des 7 régulateurs de la famille LacI de fonction inconnue a été réalisée afin d'identifier ceux qui peuvent être impliqués dans la virulence d'*E. chrysanthemi* (Van Gijsegem *et al.,* 2008). Quatre de ces régulateurs jouent effectivement un rôle dans la virulence. L'inactivation de LfdR favorise l'initiation de la maladie car le mutant *lfdR* est plus efficace que la souche sauvage pour provoquer la macération. Au contraire, l'inactivation de LfaR, LfcR et LfeR provoque une diminution des symptômes et un délai dans leur apparition. Les mutants *lfaR* et *lfcR* montrent une virulence réduite sur endive, *Saintpaulia* et *Arabidopsis*. Le mutant *lfeR* montre une virulence réduite sur *Arabidopsis.* Le contexte génétique de chaque régulateur chez différentes bactéries a permis de définir quels sont les gènes voisins qui sont associés à chaque régulateur. L'expression de certains de ces gènes a été suivie lors de l'infection de plantes. Quatre des régions étudiées, *lfa, lfc, lfe* et *lfg,* sont exprimées pendant l'infection de plantes. Une analyse préliminaire a démontré que deux d'entre elles, *lfa* et *lfg*, sont induites spécifiquement par addition d'un extrait brut de plante. Il semblait donc particulièrement important de mieux connaître les régions *lfa* et *lfg* et d'identifier les composés végétaux responsables de leur induction.

Conclusion, présentation du projet de thèse

De nombreuses études montrent que les bactéries associées aux plantes peuvent détecter diverses molécules végétales afin de coloniser plus efficacement la plante hôte. Les signaux moléculaires végétaux sont reconnus par la bactérie soit directement, soit après transformation par une voie métabolique. Il s'agit souvent de composés phénoliques simples ou complexes, seuls ou en association avec des sucres et/ou des molécules à fonction acide (Tableau 1). Les mécanismes de régulation permettant aux bactéries de répondre à ces composés sont variés. La détection et la transduction du signal impliquent très souvent des systèmes de régulation à deux composantes qui permettent de détecter un signal extra-cytoplasmique. Mais on trouve aussi des régulateurs qui répondent à un inducteur intracellulaire, en particulier des familles LysR, IclR, LuxR, MarR ou LacI (Tableau 1). Dans ces cas, il existe un système de transport permettant à l'inducteur (ou à son précurseur) de pénétrer dans le cytoplasme.

L'obtention du génome complet d'*E. chrysanthemi* a permis de mettre en évidence des gènes jamais identifiés chez les entérobactéries. Certains de ces gènes sont des régulateurs transcriptionnels. Une étude a été conduite afin de déterminer si les régulateurs de la famille LacI sont impliqués dans la régulation de voies liées à l'attaque de la plante (Van Gijsegem *et al.,* 2008). Ceci a mis en évidence deux régions importantes pour la pathogénie d'*E. chrysanthemi* : *lfa* et *lfg*. Le gène *lfaA* est exprimé *in planta* et très fortement induit par des extraits végétaux. Son répresseur, LfaR, semble très impliqué dans la virulence puisque la mutation *lfaR* bloque l'infection de plantes entières dès les premières étapes. Le gène *lfgN*, montre une très forte expression *in planta* et est induit par certains extraits de plantes. Ce gène est réprimé par LfgR dont l'implication dans le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* n'est pas confirmée par les infections de plantes, il n'aurait qu'un effet mineur sur la macération.

Les régulateurs jouent souvent un rôle très large en participant à la régulation de multiples facteurs de virulence. La connaissance de la séquence des régions identifiées uniquement par les méthodes globales de séquençage ne suffit pas à déduire leur fonction biologique. Dans les cas des régions *lfa* et *lfg*, l'identification des inducteurs de l'expression de ces gènes pourrait donner une indication primordiale sur les voies régulées par LfaR et LfgR. L'objectif de cette thèse était d'analyser de façon plus approfondie la régulation des régions *lfa* et *lfg*, avec comme principal challenge l'identification des signaux végétaux reconnus par les bactéries pour déclencher l'expression des gènes *lfaA* et *lfgN* lors de l'infection.

PARTIE EXPERIMENTALE

Recherche de signaux moléculaires impliqués dans l'induction chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*

Matériels et Méthodes

I. Souches et conditions de culture

I-1 Souches bactériennes, phages et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont décrits dans les Tableaux 4 et 5, respectivement. Toutes les souches d'*Erwinia chrysanthemi* utilisées dérivent de la souche sauvage 3937 qui a été initialement isolée d'une plante infectée de *Saintpaulia ionantha*.

La souche NM522 d'*Escherichia coli* est classiquement utilisée pour la transformation par des plasmides dans les expériences de biologie moléculaire.

Le phage ϕEC2 utilisé est spécifique d'*E. chrysanthemi*.

I-2 Milieux de culture

Les milieux de culture couramment utilisés sont un milieu complet de Luria Bertani LB (10 g/L tryptone, 5 g/L extrait levure et 10 g/L NaCl), et un milieu synthétique M63 (2 g/L glycérol) (Miller, 1972).

Les milieux solides sont réalisés en ajoutant 15 g/L d'agar. Le milieu synthétique est complémenté avec les composés nécessaires à la croissance des bactéries, ajoutés aux concentrations finales suivantes: 2 g/L pour le glycérol, le glucose, le galacturonate, et la carboxy-méthylcellulose (CMC), 4 g/L pour le polygalacturonate (PGA), 40 mg/L pour les acides aminés. Du $CaCl_2$ 0,1 mM final est ajouté dans les milieux liquides contenant du PGA. Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes: 20 mg/L pour le chloramphénicol (Cm), 50 mg/L pour la kanamycine (Kan) et 100 mg/L pour l'ampicilline (Amp).

Les cultures des souches d'*E. coli* et d'*E. chrysanthemi* sont réalisées à 37°C et 30°C, respectivement. Les milieux de culture sont ensemencés avec environ 10^7 bactéries par mL. Les cultures liquides sont réalisées dans un bain-marie avec agitation. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}). La concentration

en bactéries viables est déterminée par réalisation de dilutions en série puis étalement sur milieu solide et dénombrement des colonies obtenues.

TABLEAU 4 : Souches d'*Erwinia chrysanthemi*

Souches	Génotype	Source et référence
3937 (A470 ou A3952)	Souche sauvage	Collection du laboratoire
A2174	*rafR, ganB, pecT::Cm*	Collection du laboratoire
A2507	*rafR, ganB, crp::Cm*	Collection du laboratoire
A3009	*rafR, ganB, expR::Cm*	Collection du laboratoire
A3953	*pecS::Mu-Cm*	Collection du laboratoire
A4114	*kdgR::Sm*	Collection du laboratoire
A4116	*pecT::Cm*	Collection du laboratoire
A4167	*crp::Cm*	Collection du laboratoire
A4391	*lfaA::uidA*-Kan	Van Gijsegem *et al.*, 2008
A4415	*pelD::uidA*-Kan	Collection du laboratoire
A4420	*lfgN::uidA*-Kan	Ce travail
A4450	*expR::Cm*	Collection du laboratoire
A4532	*expR::Sm*	Collection du laboratoire
A4662	*lfgR::Cm*	Van Gijsegem *et al.*, 2008
A4698	*lfaR::Cm*	Van Gijsegem *et al.*, 2008
A4791	*lfgN::uidA*-Kan, *lfgR::Cm*	Ce travail
A4797	*lfaA::uidA*-Kan, *lfaR::Cm*	Ce travail
A4815	*pelA::uidA*-Kan	Collection du laboratoire
A4959	*lfaT::uidA*-Kan	Ce travail
A4960	*lfgB::uidA*-Kan	Ce travail
A4980	*lfgB::uidA*-Kan, *lfgR::Cm*	Ce travail
A4981	*lfaT::uidA*-Kan, *lfaR::Cm*	Ce travail
A4994	*pelA::uidA*-Kan, *lfaR::Cm*	Ce travail
A4995	*pelA::uidA*-Kan, *lfgR::Cm*	Ce travail
A4996	*pelD: uidA*-Kan, *lfgR::Cm*	Ce travail
A4997	*pelD::uidA*-Kan, *lfaR::Cm*	Ce travail

I-3 Conservation des souches

Pour leur conservation à long terme (plusieurs années), les souches d'*E. chrysanthemi* sont cultivées en milieu LB, puis du glycérol est ajouté à une concentration finale de 40%; ce mélange est conservé à -80°C.

Les souches d'*E. coli* contenant un plasmide sont cultivées en milieu LB avec antibiotique, puis du glycérol à une concentration finale de 20% est ajouté; ce mélange est conservé à -20°C.

TABLEAU 5: Plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Source et référence
pGEM®-T	Vecteur 3000 bp pour clonage de produits de PCR, Amp^R	Promega
I3278	*pGEM®-T, lfaT+*	Ce travail
I3279	*pGEM®-T, lfgB+*	Ce travail
I3284	*pGEM®-T, lfaT::uidA*-Kan	Ce travail
I3285	*pGEM®-T, lfgB::uidA*-Kan	Ce travail

II. Techniques de génétique bactérienne

La transduction généralisée est un mécanisme de transfert de matériel génétique entre deux bactéries, ce matériel étant véhiculé par l'intermédiaire d'un phage dit transducteur. Le phage ϕEC2 est le seul phage transducteur connu chez *E. chrysanthemi* (Resibois *et al.*, 1984). En pratique, la transduction permet de transférer une mutation sélectionnable du génome d'une bactérie (donneuse) à celui d'une autre (réceptrice).

II-1 Préparation du lysat de phage ϕEC2

Le lysat de phage est réalisé sur les bactéries donneuses en phase exponentielle de croissance (DO_{600} d'environ 1). Les bactéries sont infectées par des phages à une multiplicité d'infection inférieure à 1 phage pour 10 bactéries (0,2 mL bactéries + 0,1 mL de phage). Après 20 min d'adsorption à température ambiante, sans bouger, 5 mL d'agar mou (0,4% en milieu LB) maintenus en surfusion sont versés sur la suspension. Le mélange est ensuite

coulé sur boîte de milieu solide GL + glucose + $CaCl_2$ 2 mM. Après une nuit d'incubation à 30°C, les lysats de phages sont récoltés en raclant la surcouche dans 5 mL de milieu LB. Ils sont stérilisés par addition de chloroforme afin de tuer les bactéries non lysées. L'agar et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 min, 8 000 x g) et les lysats sont conservés à 4°C.

II-2 Transduction avec le lysat de phage ϕEC2

La transduction est réalisée par infection avec le lysat de phages des bactéries réceptrices en culture fraîche (DO_{600} d'environ 1) (0,2 mL bactéries + 0,1 mL de phage). Après 20 min d'adsorption à température ambiante, sans bouger, 1 mL de milieu LB est ajouté et le mélange est incubé 1 à 3 h à 30°C pour permettre l'expression des gènes transférés, notamment des gènes de résistance aux antibiotiques. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu sélecteur GL avec antibiotique. Les colonies correspondant aux transductants apparaissent après 48 h d'incubation à 30°C.

III. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques d'extraction d'ADN, de digestion par les enzymes de restriction, de ligation et d'électrophorèse en gel d'agarose sont réalisées selon des protocoles classiques (Sambrook et Russell, 2001) et/ou les indications des fournisseurs.

III-1 Extraction rapide d'ADN plasmidique

La méthode de lyse alcaline (miniprep) permet d'extraire de l'ADN plasmidique en petite quantité. Elle est basée sur la dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique superenroulé. En milieu alcalin, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. Si l'on ajoute alors un l'acide, l'ADN chromosomique s'associe en un réseau insoluble qui peut être éliminé par centrifugation, alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme native soluble. Les membranes cellulaires, la plus grande partie des protéines et une partie de l'ARN sont aussi éliminés lors de la centrifugation.

Pour réaliser une « miniprep », 1,5 mL de culture d'une nuit est mis dans des microtubes. Une centrifugation de 1 min à 12 000 rpm permet d'éliminer le surnageant bien complètement par retournement sur un papier absorbant. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans 100 µL de solution A froide. Après agitation au vortex, le mélange est laissé 5 min à température ambiante. 200 µL de solution B sont ajoutés (à température ambiante) et le mélange est agité au vortex. La solution doit devenir transparente et visqueuse. Cette solution est ensuite placée 5 min à 4°C. 150 µL de solution C froide sont ajoutés et le mélange est agité au vortex. Il se forme un précipité blanc qui est éliminé par centrifugation pendant 5 min à 12 000 rpm. Le surnageant est transvasé dans une autre série de tubes contenant 1 mL d'éthanol 100%. Après mélange par retournements, le tube est centrifugé pendant 10 min à 12 000 rpm. Le surnageant est jeté. Le culot d'ADN est rincé par l'addition de 1 mL d'éthanol 70%, suivie d'une seconde centrifugation pendant 5 min. Il faut éliminer l'alcool au maximum (par retournement sur un papier absorbant). Le culot d'ADN est séché 5 à 10 min sous vide au Speed Vac puis repris par 50 µL d'eau stérile.

III-2 Digestion des plasmides par action des enzymes de restriction

Les plasmides sont analysés par digestion avec une enzyme de restriction. Pour cela, il faut introduire dans un microtube: 5 µL d'eau, 5 µL d'ADN de miniprep, 1 µL de tamponX10, 1 µL d'enzyme. Pour toute digestion, l'enzyme de restriction (coûteuse) doit être ajoutée en dernier. De plus, il ne faut jamais mettre plus de 10% d'enzyme dans le mélange réactionnel car le glycérol présent avec l'enzyme (pour sa conservation) peut altérer la spécificité de la réaction enzymatique.

Pour vérifier la taille des fragments d'ADN obtenus après digestions, des gels d'agarose à 0,7% sont classiquement utilisés. La migration est réalisée pendant environ 2 h à 80 V dans un tampon TBE. Après migration, la taille des fragments obtenus est déduite par comparaison avec un marqueur de taille.

III-3 Inactivation des enzymes et précipitation de l'ADN

L'inactivation des enzymes de restriction se fait par la chaleur, la majorité des enzymes de restriction sont inactivées par incubation de 20 min à 70°C.

Pour éliminer les tampons de digestion ou de ligation, l'ADN est récupéré par précipitation à l'éthanol. L'ADN précipite dans de l'éthanol à une concentration finale

supérieure à 70%, en présence d'une concentration saline élevée. A 100 µL d'ADN en solution, sont ajoutés 1/10ème de volume (10 µL) d'acétate de sodium 3 M pH 5,0 et 2,5 volumes (250 µL) d'éthanol 100%. Apres centrifugation 10 min à 12 000 rpm, le surnageant est éliminé délicatement en prenant garde au culot peu visible si la quantité d'ADN est faible. Le culot est rincé par l'addition de 500 µL d'éthanol 70%, suivie d'une seconde centrifugation 5 min à 12 000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est séché sous vide en plaçant les tubes 5 min dans le Speed Vac.

III-4 Réalisation des PCR et clonage des fragments obtenus

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique. Cette méthode consiste à réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN.

Chaque microtube à PCR contient : 36 µL d'eau distillée stérile, 1 µL de dNTP à 10 mM, 5 µL de tampon 10x, 1 µL d'amorce 3', 1 µL d'amorce 5', 5 µL de cellules (1 colonie dans 50 µL d'eau), 1 µL de Taq polymérase. Le programme d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles comportant la dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1 min, l'hybridation des amorces sur les brins d'ADN à 45°C pendant 1 min et l'élongation (action de la Taq polymérase) à 72°C pendant 3 min, puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min.

Les résultats de la PCR (quantité d'ADN obtenu et taille correcte du fragment) sont vérifiés en gel d'agarose par dépôt de 5 µL du mélange de PCR. Si le produit n'est pas assez pur, la purification du fragment d'ADN peut être réalisée à partir du gel d'agarose avec le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Après vérification sur gel, une ligation du produit de PCR est réalisée dans le vecteur pGEM-T.

La ligation consiste en la formation de nouvelles liaisons phosphodiesters in vitro entre les extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN à relier grâce à la T4 DNA ligase. Le mélange de ligation contient 8,5 µL du produit de PCR, 10 µL de tampon de ligation 2x, 0,5 µL du vecteur pGEM-T, 1 µL de T4 DNA ligase. Il est incubé la nuit à 15°C.

Le plasmide recherché à partir du mélange de ligation va être sélectionné après introduction chez *E. coli* par transformation.

III-5 Transformation d'*E. coli*

Les plasmides sont introduits dans les cellules d'*E. coli* par transformation en présence de $CaCl_2$. Ces bactéries traitées avec du $CaCl_2$ puis soumises à un bref choc thermique sont dans un état de compétence transitoire qui leur permet d'intégrer de l'ADN étranger. Le traitement au $CaCl_2$ froid affecte l'attachement de l'ADN à l'enveloppe. Le choc thermique à 42°C stimule l'entrée de l'ADN dans le cytoplasme en fluidifiant la membrane cytoplasmique.

Une aliquote de 5 µL d'ADN de mélange de ligation est ajoutée à 200 µL de bactéries compétentes fraîchement décongelées (souche d'*E. coli* NM522). Ces bactéries sont incubées 30 min dans la glace avant d'être transférées 2 min à 42°C puis à nouveau refroidies 5 min dans la glace. Ensuite, 800 µL de milieu BL sont ajoutés et la culture est incubée 1 h à 37°C. La suspension est étalée sur une boite GL Amp à laquelle ont été ajoutés 50 µL de X-Gal (20 g/L) et 50 µL d'IPTG (100 mM) (substrat et inducteur de la β-galactosidase). La boite est incubée une nuit à l'étuve à 37°C. Sur ce milieu les colonies apparaissent soit de couleur blanche, soit bleu turquoise. Les clones bleus contiennent le vecteur vide. Les clones blancs ont intégré un plasmide recombinant (mécanisme d'α-complémentation).

III-6 Transformation d'*E. chrysanthemi*

Les cellules d'*E. chrysanthemi* sont transformées par électroporation. L'électroporation est une méthode générale pour introduire de l'ADN dans des cellules. Une suspension de cellules et d'ADN est soumise à une décharge électrique de haut voltage qui perméabilise la membrane, permettant le passage de macromolécules chargées telles que l'ADN. Cette technique est applicable à de nombreux types cellulaires, dont ceux réfractaires aux techniques classiques de transformation, comme *E. chrysanthemi*.

Les cellules sont cultivées à 38-39°C, plusieurs lavages sont réalisés pour bien éliminer le milieu de culture, en concentrant les cellules à chaque étape. Un erlen contenant 50 mL de BL est ensemencé avec 2 mL d'une préculture de la nuit en BL de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi*. La culture est incubée à 38°C avec une bonne agitation jusqu'à obtention d'une DO comprise entre 0,5 et 1. Puis la culture est centrifugée à 6 000 rpm pendant 15 min à température ambiante dans des tubes à centrifuger stériles. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 1 volume d'eau stérile. Une seconde centrifugation est réalisée à 6 000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est repris

par 1/2 volume d'eau stérile. Une troisième centrifugation est réalisée à 6 000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est repris par 1/5 volume d'eau. Après une quatrième centrifugation à 6 000 rpm pendant 15 min à température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot est repris par 1/100 volume de glycérol 10% stérile. Les cellules sont placées en aliquotes de 50 µL conservées à - 80°C (ou utilisées tout de suite).

Pour l'électroporation, 1 µL d'ADN plasmidique est ajouté à une aliquote de 50 µL de cellules. Le mélange est transfèré dans une cuve pour électroporation. L'appareil d'électroporation doit être réglé à 25 µFd, 2,5 Volts, 400 Ohms. Il faut alors appuyer sur les deux boutons « pulse » jusqu'à l'émission de la sonnerie, le temps de pulse doit être compris entre 5 et 20 millisecondes. Ensuite il faut ajouter immédiatement 1 mL de BL et incuber 2 h à 30°C. Le mélange est étalé sur milieu GL Kan et les boites sont incubées à l'étuve à 30°C pendant 48 h.

III-7 Construction des mutants par génétique inverse

Le gène d'intérêt d'*E. chrysanthemi* est cloné dans le plasmide pGEM-T après amplification par PCR. Ensuite, ce gène est inactivé par insertion, au niveau d'un site de restriction situé dans son cadre ouvert de lecture, d'une cassette codant la résistance au chloramphénicol (Cm^R) ou de la cassette *uidA*-Kan^R. Dans cette dernière cassette, le gène rapporteur *uidA* codant la β-glucuronidase (GUS) sert de gène rapporteur et il est couplé à un gène codant la résistance à la kanamycine (Kan^R), servant de marqueur de sélection. Le plasmide portant le gène interrompu par insertion de la cassette est introduit par électroporation dans la souche sauvage d'*E. chrysanthemi*. Les cellules transformées sont ensuite cultivées en milieu Bas Phosphate. En limitant la réplication efficace des plasmides, ce milieu favorise la croissance des bactéries ayant intégré dans leur chromosome, par double recombinaison homologue, le gène interrompu par insertion de la cassette. Des cultures successives sont réalisées dans ce milieu Bas Phosphate additionné de Kan ou de Cm, selon la résistance codée par la cassette. Un étalement de ces cultures est réalisé après dilution (10 µL de la dilution 10^{-4} sur GL Cm ou GL Kan). La réplique sur milieu GL Amp (colonies Amp^S) permet de repérer les colonies ayant perdues le vecteur.

IV Dosage et détection d'activités enzymatiques

IV-1 Préparation des extraits

Les souches à analyser sont ensemencées en tubes contenant 5 mL de milieu M63 glycérol et incubées 24 h dans un bain-marie agité à 30°C. Ces tubes forment la première préculture. Les tubes de la seconde préculture sont ensemencés avec 0,1 mL de la première préculture puis incubés 24 h à 30°C avec agitation. Les cultures qui vont servir aux dosages sont ensemencées avec 0,1 mL de la seconde préculture dans chaque tube contenant 5 mL de milieux correspondants aux différentes conditions à tester, en présence ou non de l'inducteur. Les cultures sont incubées pendant 24 h à 30°C dans un bain-marie avec agitation.

La DO des cultures est lue au spectrophotomètre à 600 nm afin d'estimer la concentration bactérienne. Le spectrophotomètre saturant au-dessus d'une absorbance de 0,6 unité, pour obtenir des valeurs correctes, une dilution des échantillons est effectuée au préalable en microtubes (900 µL de M63 et 100 µL de culture).

Pour doser les enzymes intracellulaires, quelques gouttes de toluène sont ajoutées à 1 mL de culture. Le toluène va provoquer l'arrêt du métabolisme bactérien et perméabiliser les parois bactériennes. Pour cela, le mélange est agité au vortex environ 30 secondes puis laissé reposer au moins 3 heures au réfrigérateur.

Pour doser les enzymes extracellulaires, il est préférable d'éliminer les cellules par centrifugation de 1 mL de culture (traitée ou non au toluène) pendant 2 min à 12 000 rpm.

IV-2 Dosage des pectate lyases

Le dosage de l'activité pectate lyase repose sur la formation, à partir de polygalacturonate (PGA), d'oligomères insaturés qui absorbent à 230 nm (Moran *et al.*, 1968; Tardy *et al.*, 1997). Les dosages sont généralement réalisés sur des cultures bactériennes ayant atteint le début de la phase stationnaire, soit sur les surnageants de culture soit sur les extraits traités au toluène.

La réaction enzymatique se fait à 37°C dans le milieu réactionnel suivant : Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, $CaCl_2$ 0,1 mM, PGA 0,5 g/L. La variation de DO à 230 nm en fonction du temps est proportionnelle à l'activité enzymatique. Le coefficient d'extinction molaire est ε_{uGAn}= 5200. Sachant que 0,28 mg de poids sec bactérien (PSB) correspondent à une DO_{600}

de 0,6, on déduit l'activité spécifique pectate lyase (en µmol d'oligomères insaturés formés par min et par mg de PSB) :

$$AS = \frac{C_{uGAn}}{m_{PBS}} = 0{,}412 \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times dilution \times \frac{1}{DO_{600}}$$

IV-3 Dosage de l'activité β-glucuronidase

Le dosage de l'activité β-glucuronidase (GUS) repose sur le clivage du *para*nitrophényl–β-D-glucuronide (PNPU) en *para*nitrophénol (PNP) qui absorbe à 405 nm (Bardonnet et Blanco, 1992). Les dosages sont réalisés sur des extraits de cultures bactériennes ayant atteint le début de la phase stationnaire après traitement au toluène.

La réaction enzymatique se fait à 37°C dans le milieu réactionnel suivant : tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7 (ou milieu M63), PNPU 1 mM (32 mg pour 10 mL d'eau). Le coefficient d'extinction molaire est ε_{PNP}= 4500. L'activité spécifique β-glucuronidase se calcule par la formule (en nmol de PNP formés par min et par mg de PSB):

$$AS = \frac{C_{PNP}}{m_{PBS}} = 476{,}2 \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times dilution \times \frac{1}{DO_{600}}$$

IV-4 Détection d'activités enzymatiques sur milieux solides

Des tests semi-quantitatifs de détection des pectinases et cellulases sur milieu solide ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment (Ji *et al.,* 1987).

Le test d'activité cellulase est réalisé sur milieu M63 + glycérol + carboxy-méthylcellulose (CMC) + $MgSO_4$ 7 mM. Après 24 h de croissance, les colonies sont recouvertes d'une solution de rouge Congo (2 g/L), qui se fixe sur la CMC. Après lavage avec du NaCl 1 M, les colonies sécrétant des cellulases sont entourées d'un halo translucide sur fond rouge, visualisant la zone où la CMC a été dégradée.

Les tests d'activité pectinase sont réalisés sur milieu M63 + glycérol + polygalacturonate (PGA). Après 24 h de croissance, les colonies sont recouvertes d'une solution saturée d'acétate de cuivre (préparée à chaud à 10%). Les colonies sécrétant les

pectate lyases apparaissent entourées d'un halo blanchâtre sur fond bleu, visualisant la zone où le PGA a été dégradé.

V. Test du pouvoir pathogène sur feuilles d'endives

V-1 Préparation des inoculums

Une culture de la nuit en BL (à 30°C avec agitation) a été préparée pour chaque souche à analyser et, comme témoins, la souche sauvage 3937 et le mutant *pelD* A4415. Les DO à 600 nm sont mesurées sur une dilution 1/10ème en BL. Il faut alors calculer les volumes à reprendre pour avoir une DO=1 à partir de 0,5 mL de culture (formule Vol = DO x 0,5). Puis 0,5 mL de culture sont centrifugés 2 min à 8 000 rpm, le surnageant est jeté et le culot est repris par le volume calculé de M63. Les DO à 600 nm sont vérifiées sur une dilution 1/10ème en M63. Ces DO doivent être voisines de 1 (= 10^9 bactéries/mL).

Des infections simples sont réalisées pour mesurer le degré de virulence. Des infections suivies de dosages β-glucuronidase permettent de mesurer l'expression des fusions *in planta*.

V-2 Infections simples

Une dilution 10^{-1} est préparée stérilement pour chaque suspension bactérienne en M63 (= 10^8 bactéries/mL). Au fond d'un bac plastic, une feuille de papier absorbant est humidifiée avec environ 25 mL d'eau stérile. Les feuilles d'endives sont placées dessus et une piqûre est réalisée au centre de chaque feuille avec un embout jaune. Ensuite 10 µL de la suspension bactérienne sont déposés sur la piqûre (= 10^6 bactéries). Il faut inoculer au moins 10 feuilles par souche. Les bacs sont enfermés de façon bien hermétique dans un sac plastic puis incubés à l'étuve à 30°C pendant 24 h. La longueur de tissu dégradé est mesurée avec une règle (en mm). Pour chaque souche, on calcule la moyenne et l'écart type.

V-3 Infections suivies de dosages β-glucuronidase

Les infections sont réalisées comme décrit ci-dessus en inoculant 5 feuilles par souche. Ces infections sont incubées à l'étuve à 30°C pendant 24 h.

Pour chaque feuille, de 0,1 à 0,5 g de tissu dégradé sont repris dans un microtube et pesés précisément. Après addition du même volume de M63 (dilution ½), le mélange est agité au vortex. Des dilutions en série (10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6}) sont réalisées en M63 puis 50 µL de la dilution 10^{-6} sont étalés sur GL Kan. Les boites sont incubées pendant 48 h à 30°C. Après comptage du nombre de colonies (N), il est possible de calculer la concentration en bactéries par g de tissu dégradé (= N x 4.10^7 bactéries/g).

Sur le reste de la dilution ½, quelques gouttes de toluène sont ajoutées. Après agitation au vortex, l'extrait est placé environ 24 h au réfrigérateur. Ensuite les dosages GUS sont réalisés au spectrophotomètre, en utilisant 10 µL d'extrait et des temps de lecture longs (15 mesures toutes les minutes). Si la pente reste très faible et peu linéaire, il faut relancer la lecture. En premier, il est préférable de réaliser le dosage du témoin *pelD* qui doit donner une activité GUS détectable.

Ensuite l'activité est calculée en nMoles de produit (PNP) formé par minute par 10^9 bactéries.

VI. Préparation des extraits végétaux

Deux types d'extraits ont été préparés : des extraits obtenus par dissolution à chaud des composés solubles présents dans les tissus végétaux, et des extraits obtenus à froid qui correspondent à un jus de plante. Avant préparation, le matériel végétal est soumis à de multiples rinçages à l'eau distillée, puis séché sur papier absorbant.

VI-1 Préparation d'extraits à chaud

Les extraits à chaud de feuilles de chrysanthème et d'endive sont obtenus par autoclavage 20 minutes à 110°C de 100 mL de milieu M63 ou d'eau contenant 10 g de feuilles. Ces extraits dilués (10%) et stériles sont conservés à 4°C.

Les extraits obtenus à chaud sont ajoutés dans les milieux de culture avec une dilution de 10x, amenant à une concentration finale en extrait de 1% (vol/vol).

VI-2 Préparation d'extraits à froid

Les extraits crus de tubercules pomme de terre, de feuilles d'endive, de chrysanthème et de Saintpaulia bruts (100%) sont obtenus par broyage et extraction avec une centrifugeuse à légumes de ménage. Les extraits sont ensuite centrifugés 5 minutes à 12 000 rpm afin d'éliminer les plus gros débris cellulaires. Ils sont ensuite filtrés sur des filtres Millipore RC 0,45 µm pour ôter les microparticules restant et stériliser les extraits qui seront conservés à -20°C. Pour les analyses de phytochimie, ces extraits sont congelés dans l'azote liquide.

Les extraits crus sont ajoutés dans les milieux de culture avec une dilution de 100x, ce qui correspond à une concentration finale de 1% (vol/vol).

VII. Fractionnements et purification

VII-1 Test biologique en microplaque

Des tests d'induction en microplaque ont été adaptés pour analyser l'expression de fusions, afin de diminuer les quantités de réactifs et d'augmenter les capacités en nombre d'échantillons traités. Cela a permis de mettre au point un crible reproductible à moyen débit compatible avec un fractionnement bio-guidé.

Il faut d'abord réaliser une préculture en tube (5 mL de milieu M63 glycérol + 100 µL de culture bactérienne) pendant 24 h à 30°C sous agitation. Ensuite la culture est ensemencée dans chaque puits de la microplaque (CELL STAR, Tissue Culture Plate 96W, stérile). La suspension bactérienne est obtenue par dilution 40x à partir de la préculture dans un milieu minimum glycérol. 100 µL de suspension sont déposées par puits, en ajoutant une quantité donnée de l'extrait de plante, puis les plaques sont mises en culture dans l'étuve à 30°C pendant 24 h sur un agitateur.

Ensuite, la croissance des bactéries peut être analysée en mesurant la densité optique à 600 nm. Mais le but est de détecter l'activité GUS des fusions. Dans chaque puits sont donc ajoutés 100 µL du substrat PNPU (solution mère à 3,2 g/L diluée 10x) pour donner une concentration finale de 0,5 mM. La DO à 405 nm est suivie pendant 30 min à 37°C (7 mesures toutes les 5 min avec une agitation précédant chaque lecture). Ce dosage permet de sélectionner les fractions actives.

Les conditions sont semblables pour les deux fusions *lfaA* et *lfgN*, sauf que la quantité d'extrait de plante doit être supérieure pour *lfgN*. Chaque extrait ou fraction est repris à la

concentration de 1 mg/mL. Par puits contenant déjà 100 µL de bactéries diluées 40x en M63 glycérol, pour *lfaA* il suffit d'ajouter 10 µL d'extrait de plante. Pour la fusion *lfgN*, la quantité d'extrait de plante est augmentée 5x (50 µL par puits) (Tableau 6).

L'analyse d'activité enzymatique est suivie grâce au lecteur SpectraMax 340 PC avec un logiciel SOFTmax PRO.

TABLEAU 6 : Mise au point des conditions en microplaque pour les fusions *lfaA* et *lfgN*
Les conditions en microplaque sont peu différentes selon la fusion. Par puits, la quantité de suspension bactérienne de la souche portant la fusion est de 100 µL (culture de la nuit diluée 40x en M63 glycérol). Après croissance (24 h à 30°C) la solution de substrat PNPU (100 µL/puits) est ajoutée et la réaction enzymatique suivie à 405 nm. Pour la fusion *lfaA* on ajoute 10 µL d'extrait végétal à la concentration de 1 mg/mL. Pour la fusion *lfgN* chaque puits contient 50 µL d'extrait végétal à la concentration de 1 mg/mL.

Fusion	Volume final [µL]	Solution bactérienne [µL]	Extrait végétal [µL]	Solution substrat [µL]
lfaA	210	100	10	100
lfgN	250	100	50	100

VII-2 Préparation des extraits végétaux

Les extraits congelés en azote liquide sont lyophilisés afin d'obtenir la matière sèche, ce qui permet de calculer le poids sec (masse exacte) important à connaître pour réaliser les analyses dans des conditions définies. Les extraits liquides sont soumis à l'évaporation sous vide au Speed Vac ou au refroidissement par Minichiller et Ilvmax (Figure 20).

L'extrait sec de pomme de terre et d'endive est repris dans l'eau distillée à la concentration finale de 1 mg/mL.

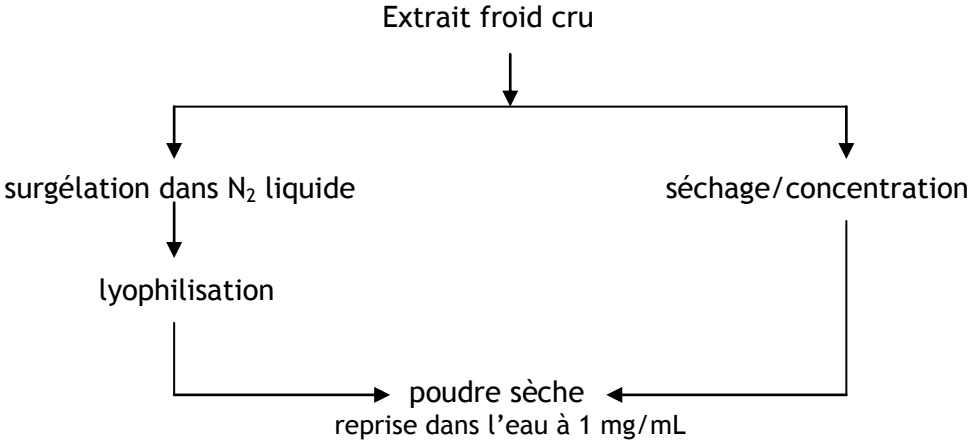


FIGURE 20 : Schéma de préparation des extraits végétaux pour les fractionnements
L'extrait végétal cru est congelé dans l'azote liquide (N_2) puis lyophilisé afin d'obtenir la matière sèche. Le même extrait peut aussi être déshydraté par système de séchage et de concentration grâce à l'évaporation sous vide au Speed Vac ou à l'évaporateur Minichiller/Ilvmax.

VII-3 Extraction en phase solide (SPE)

La colonne SPE a tout d'abord été conditionnée par deux volumes de 3 mL de méthanol 100%, puis trois volumes de 3 mL d'eau distillée. Ensuite l'extrait végétal (2 mL) a été déposé sur la surface de la colonne DSC-18. L'absorption des composés apolaires/hydrophobes s'effectue sur le support. Les composés hydrophiles non retenus sont directement élués et récupérés en tête de chromatographie. La colonne est ensuite rincée par de l'eau distillée pour éluer les composés polaires restant. Enfin l'élution par 2 mL de MeOH permet de décrocher les molécules plus lipophiles (Figure 21).

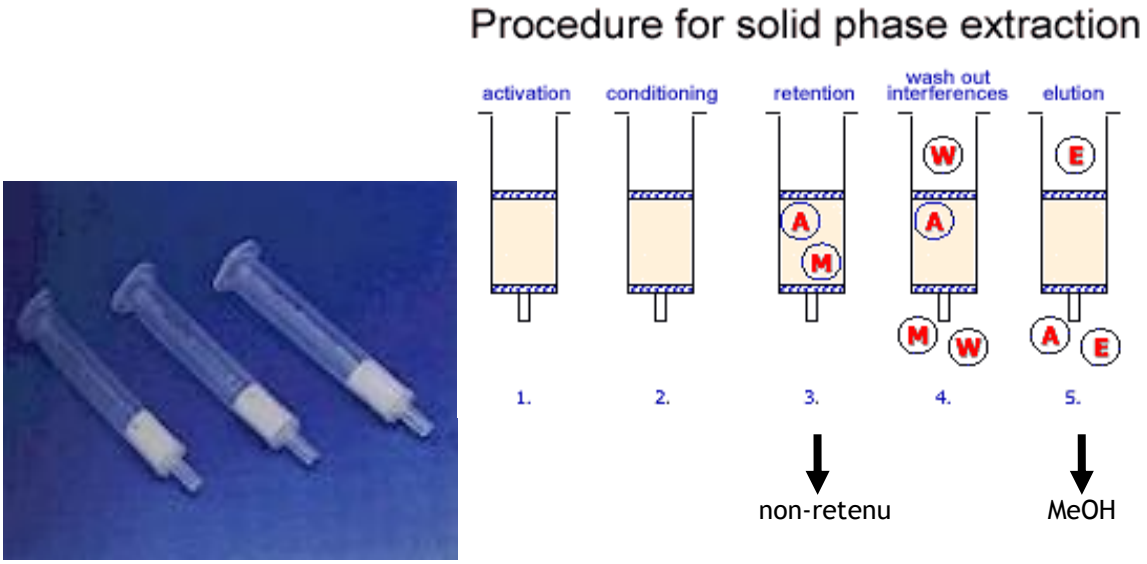


FIGURE 21 : Méthode de fractionnement en phase solide SPE (Solid Phase Extraction)
1) Activation de la colonne DSC-18. 2) Conditionnement avec les quantités données du méthanol 100% et de l'eau distillée. 3) Rétention: les composés apolaires sont absorbés alors que les composés polaires sortent de la colonne (non-retenus). 4) Rinçage avec de l'eau distillée afin de bien éliminer les composés polaires restants. 5) Elution avec méthanol afin de décrocher les composés hydrophobes.

VII-4 Système analytique en HPLC HILIC

Les diverses fractions obtenues à partir de l'extrait végétal sont analysées par chromatographie liquide haute pression (HPLC). Ces analyses HPLC sont réalisées sur un système Agilent Technologies série 1200 composé d'un dégazeur (degasser G132A), de pompes quaternaires (Quat Pump G1311A), d'un passeur d'échantillons (ALS G1329A) et d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD G1315B). La colonne chromatographique utilisée est de la marque INTERCHIM remplie d'une phase stationnaire YMC-Pack Polyamine II. C'est une colonne chromatographique d'interactions hydrophiles (appelée HILIC) de

dimensions 250 x 4,6 mm. La phase mobile est représentée par un solvant d'élution qui est un gradient d'acétonitrile dans l'eau (Tableau 7). Le volume d'échantillon d'extrait de plante (à la concentration de 10 mg/mL en extrait sec) injecté dans la colonne est de 20 µL par fiole (Micro Slow Technology Corporation, USA). Les chromatogrammes sont enregistrés en UV visible par un détecteur à barrettes de diodes entre 200 et 500 nm. Trois longueurs d'ondes de visualisation (260, 280 et 310 nm) sont plus particulièrement utilisées. Le temps d'analyse est de 65 min avec un débit fixé à 1 mL/min.

TABLEAU 7 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse en HPLC avec la colonne HILIC

Temps [min]	H_2O	CH_3CN	Débit [mL/min]	Pression [bars]
0.00	0.0	100.0	1.000	400
5.00	0.0	100.0	1.000	400
35.00	100.0	0.0	1.000	400
45.00	100.0	0.0	1.000	400
55.00	0.0	100.0	1.000	400
65.00	0.0	100.0	1.000	400

Certaines fractions ont été utilisées pour des expériences de co-chromatographie afin de comparer les molécules purifiées à des molécules d'origine commerciale. Pour cette technique, il faut injecter les quantités adéquates de chaque échantillon de molécule afin d'obtenir des pics d'intensités approximativement équivalentes. La similarité des molécules est confirmée par un temps de rétention identique et donc une addition des intensités.

VII-5 Systèmes préparatifs

VII-5-1 Fractionnement en Sephadex

Pour un fractionnement des molécules végétales, la chromatographie par perméation de gel a été appliquée en utilisant deux types de gels Sephadex LH-20 et G10. Le Sephadex LH-20 est développé par hydroxypropylation du dextrane sphérique et poreux. Il permet de trier des molécules de taille inferieure à 1000 Da, à l'aide de solvant d'élution constitué de méthanol 50%. Le gel Sephadex G-10 contient du dextrane « cross-linked », qui tri des molécules de taille inférieure à 700 Da. La phase mobile est l'eau.

VII-5-1-1 Sephadex LH-20

La colonne de séparation Sephadex LH-20 utilisée est de dimensions 280 x 50 mm.

Pomme de terre

9 g d'extrait sec de pomme de terre sont pesés et dilués 4 fois dans un mélange eau/méthanol 50/50, soit 36 mL (1 : 4). L'échantillon est ensuite filtré 2 fois avec un filtre RC-membrane de diamètre 25 mm et de porosité de 0,45 µm, et conservé à 4°C pour le dépôt sur colonne chromatographique le lendemain. Après filtration, les 12 mL d'extrait liquide de pomme de terre récupérés sont déposés sur la colonne Sephadex LH-20. Une aliquote de 500 µL est conservée comme témoin positif (T+). Le solvant adéquat est ajouté sur la surface du gel Sephadex, puis le fractionnement est démarré. Environ 35 à 40 mL de volume mort (V_{mort}) sont récupérés. Des fractions de 4 mL sont récupérées dans des tubes à hémolyse. La séparation des composés présents dans l'extrait est suivie à la lumière du jour ainsi qu'à l'irradiation UV à 365 nm jusqu'au terme de la chromatographie. Après regroupement 10 par 10 des 140 fractions de pomme de terre, elles sont analysées par HPLC HILIC et soumises à l'évaluation en microplaque afin d'identifier les fractions actives (Figure 22).

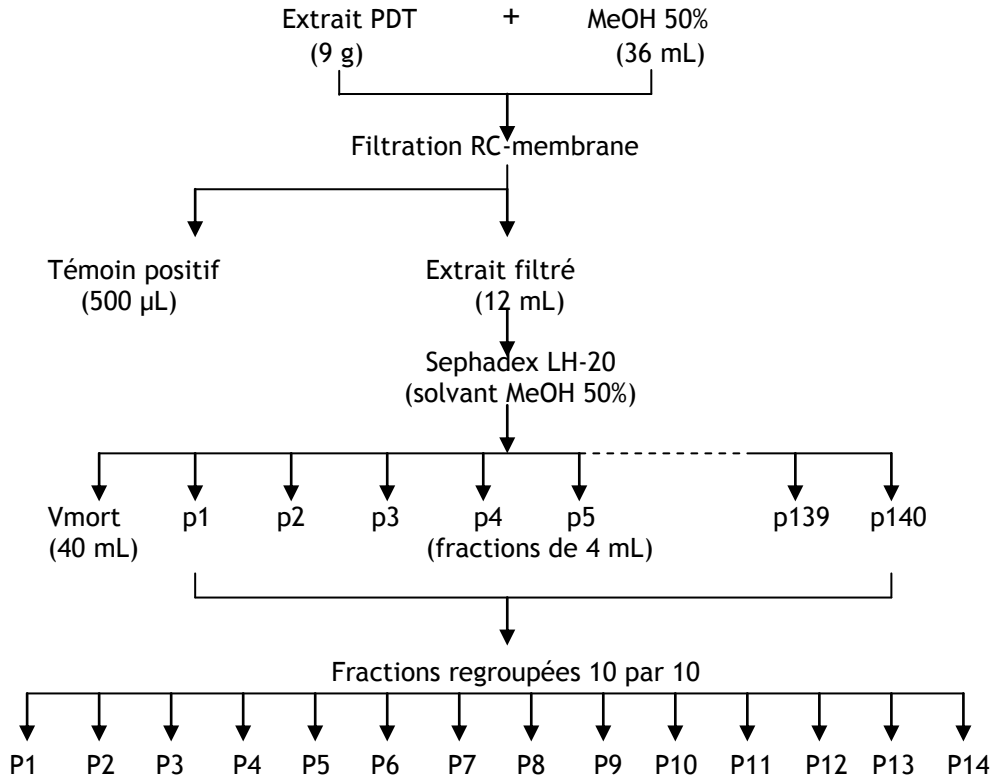


FIGURE 22 : Schéma de fractionnement de l'extrait de pomme de terre

Endive

3 g d'extrait d'endive sont pesés puis dilués 5 fois dans un mélange eau/méthanol 50/50, soit 15 mL (1 : 5). L'échantillon est ensuite filtré 2 fois avec un filtre RC-membrane de diamètre 25 mm et de porosité de 0,45 µm et maintenu à 4°C pour le dépôt sur colonne chromatographique le lendemain. Après filtration, les 11 mL d'extrait liquide d'endive récupérés sont déposés sur la colonne Sephadex LH-20. Une aliquote de 500 µL est conservée comme témoin positif (T+). Le solvant est ajouté sur la surface du gel Sephadex, puis le fractionnement est lancé. Environ 35 à 40 mL de volume mort (V_{mort}) sont récupérés. Des fractions de 4 mL sont récupérées dans des tubes à hémolyse. La séparation est suivie à la lumière du jour ainsi qu'à l'irradiation UV à 365 nm jusqu'au terme de la chromatographie. L'ensemble des 140 fractions d'endive est ensuite analysé par HPLC HILIC et elles sont soumises après regroupement 10 par 10 à l'évaluation en microplaque afin d'identifier les fractions actives (Figure 23).

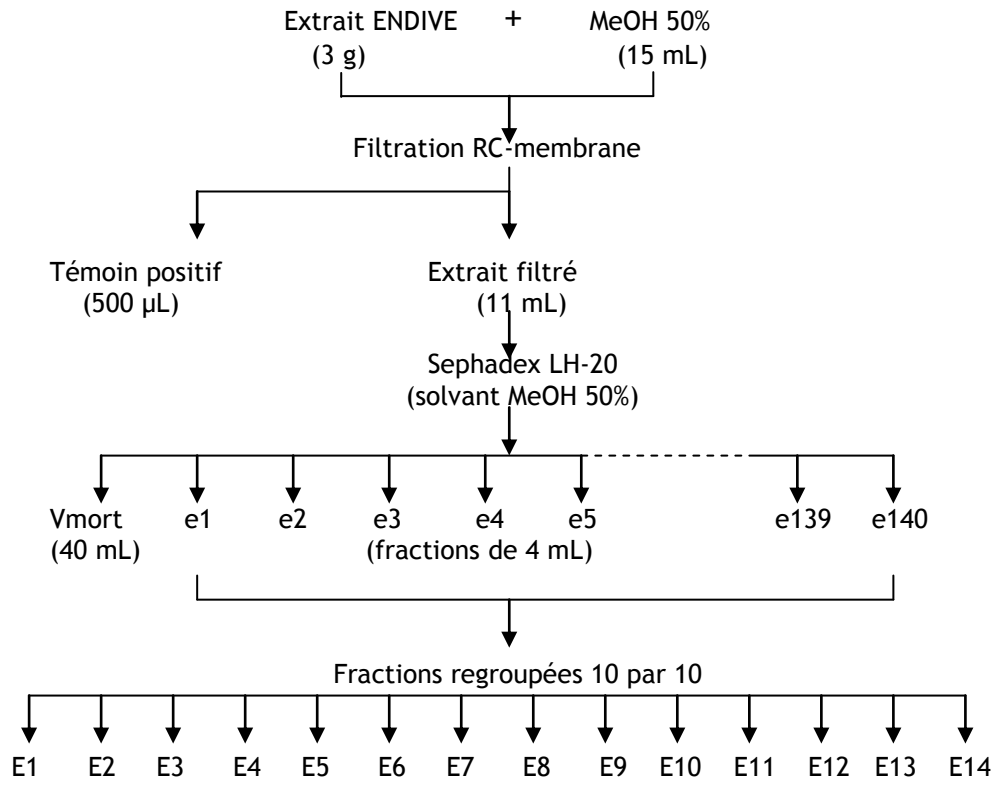


FIGURE 23 : Schéma de fractionnement de l'extrait d'endive

VII-5-1-2 Sephadex G-10

Après un premier fractionnement des extraits bruts par le Sephadex LH-20, une séparation plus fine en Sephadex G-10 a été envisagée. La mise au point a été effectuée pour les extraits de pommes de terre et d'endives avec une colonne de dimensions 270 x 20 mm. Pour le fractionnement effectif des extraits de pommes de terre, la colonne utilisée était de dimensions 270 x 45 mm avec de l'eau comme solvant.

15 g d'extrait total de pomme de terre sont repris dans 80 mL d'eau. La solution obtenue est filtrée à l'aide du filtre RC-membrane de dimension 25 mm et de porosité de 0,45 µm. L'extrait (15 g/ 80 mL) est déposée sur le gel Sephadex G-10. Les fractions sont récoltées par 100 mL dans les ballons de 250 mL de volume maximal, puis séchées sur Rotavap (température du bain-marie 40°C) avec de l'acétone en proportion 1 : 1 afin d'accélérer l'évaporation (mélange azéotrope). Puis elles sont congelées dans de l'azote liquide et lyophilisées. Les 14 fractions sèches obtenues sont stockées à -20°C.

VII-5-2 Séparation par HPLC RP18

Les fractions actives de pomme de terre (P6, P7, P8, P12) et d'endives (E6, E7, E8, E9) ont ensuite été séparées par HPLC semi-préparative (Reverse Phase 18) afin de purifier les composés actifs. La méthode de séparation dure 61 min sous 400 bars maximum avec un débit de 1 mL/min. Le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 8. Les solvants utilisés sont un mélange eau + 0,4% d'acide acétique (CH_3COOH) et acétonitrile (CH_3CN) + 0,4% d'acide acétique. La colonne utilisée est un NUCLEODUR Sphinx RP 5 µm, EC 250/4,6 de la marque MACHEREY-NAGEL. Le volume d'injection est fixé à 10 µL d'extrait à 10 mg/mL.

TABLEAU 8 : Gradient d'élution pour la séparation en HPLC semi-préparative (RP18)

Temps [min]	H_2O + 0,4% CH_3COOH	CH_3CN + 0,4% CH_3COOH	Débit [mL/min]	Pression [bars]
0.00	100.0	0.0	1.000	400
5.00	100.0	0.0	1.000	400
10.00	85.0	15.0	1.000	400
40.00	85.0	15.0	1.000	400
50.00	0.0	100.0	1.000	400
55.00	0.0	100.0	1.000	400
56.00	100.0	0.0	1.000	400
61.00	100.0	0.0	1.000	400

VII-6 Détermination de la structure de molécules purifiées

VII-6-1 Purification des composés P12A et P12B

La fraction active P12 contient deux composés P12B et P12A (par ordre d'intensité). La purification de ces composés a été réalisée en HPLC semi-préparative avec la colonne C18 et un gradient d'élution étalé sur 30 min avec 5% d'acétonitrile (Tableau 9).

TABLEAU 9 : Gradient d'élution pour la purification des molécules de la fraction P12
Les molécules P12A et P12B ont été purifiées à partir de la fraction P12 de pomme de terre, en utilisant la colonne semi-préparative C18.

Temps [min]	H_2O	CH_3CN	Débit [mL/min]	Pression [bars]
0.00	95.0	5.0	1.000	400
30.00	95.0	5.0	1.000	400

Cette purification s'est faite en 4 injections de 100 µL et 1 injection de 90 µL à partir de la fraction P12 à la concentration 10 mg/mL. Les étapes de purification sont consignées dans la Figure 24. Six échantillons ont été récupérés dans les tubes Falcon et dénommés « P12 reste », P12A, « P12B avant », P12B, « P12B après » et « P12 reste fin ». Les nouvelles fractions ont été déshydratées par lyophilisation.

VII-6-2 Caractérisation des composés P12A et P12B

La structure de composés purifiés est déterminée par RMN et Spectrométrie de Masse (SM). La SM est une technique extrêmement sensible qui permet de déterminer la masse moléculaire. Le principe consiste à ioniser les molécules et étudier les fragments formés lors de leur décomposition. Ces ions sont séparés suivant leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique. L'ion obtenu lors de l'ionisation, appelé ion moléculaire (ou pseudo-moléculaire suivant le mode d'ionisation), permet la détermination de la masse molaire du composé. Cet ion moléculaire est susceptible de se décomposer suivant un mode de fragmentation dépendant des fonctions chimiques qu'il contient, générant ainsi des ions fragments. L'ensemble des ions fragments constitue le spectre de masse qui apporte des renseignements d'ordre structuraux (Silverstein *et al.*, 1998).

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus après une chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse (LC-MS), en utilisant une chaine HPLC Agilent HP-1100 couplée à un spectromètre Hewlett-Parkard 1100MSD. Une technique d'ionisation utilisée est API-ES (Atmospheric Pressure Ionization – ElectroSpray) en mode négatif, dont les paramètres sont décrits dans le Tableau 10.

TABLEAU 10 : Paramètres de la technique d'ionisation API-ES dans le mode négatif pour les composés P12A et P12B

Paramètres	**API-ES du P12A**	**API-ES du P12B**
Colonne	YMC HILIC (240 x 4,6 mm)	
Gradient	CH_3CN 100-0% en 65 min débit 0,3 mL/min	
Volume d'injection	10 µL	
Tension capillaire	3500 V	
Température nébuliseur	340°C	
Energie fragmentaire	125 eV	150 eV
Débit des gaz (Azote)	9 L/min	

L'élucidation structurale des composés a aussi été établie par l'interprétation des données de spectroscopie RMN monodimensionnelle ^{1}H et ^{13}C et RMN bidimensionnelle homonucléaire ^{1}H-^{1}H COSY et hétéronucléaire ^{1}H-^{13}C HSQC et ^{1}H-^{13}C HMBC. Les spectres RMN ont été réalisés au Centre Commun de RMN de l'Université Lyon 1 sur un appareil Bruker DRX500 dans le D2O à 500,13 MHz en proton et 125,77 MHz en carbone-13. Les données brutes ont été retraitées au laboratoire grâce à la suite logicielle MNOVA 6.0.4. du Mestre Lab Research.

3,2 mg du composé pratiquement pur P12B ont été récupérés. Celui-ci est le composé majeur dans la fraction active de pomme de terre P12. 1 mg de P12B a été utilisé pour la détermination de la masse moléculaire en LC-MS. Les 2,2 mg restant ont été soumis au séchage à la pompe à palette, qui a permis de récupérer seulement 1 mg du composé P12B ensuite traité par RMN. Ce produit soluble dans l'eau a été dilué en D_2O, puis les indentifications de H^+, de C13, de COSY, de HMBC et de HSQC ont été effectuées. Des résultats obtenus pour l'identification du composé P12B ont été vérifiés par des analyses de co-chromatographie.

Les mêmes protocoles ont été utilisés pour analyser le composé P12A, deuxième composé présent dans la fraction P12. L'analyse LC-MS a permis d'obtenir la masse moléculaire de P12A. Cependant la quantité de matière sèche inférieure à 1 mg n'a pas pu permettre la réalisation de l'analyse RMN de la molécule P12A.

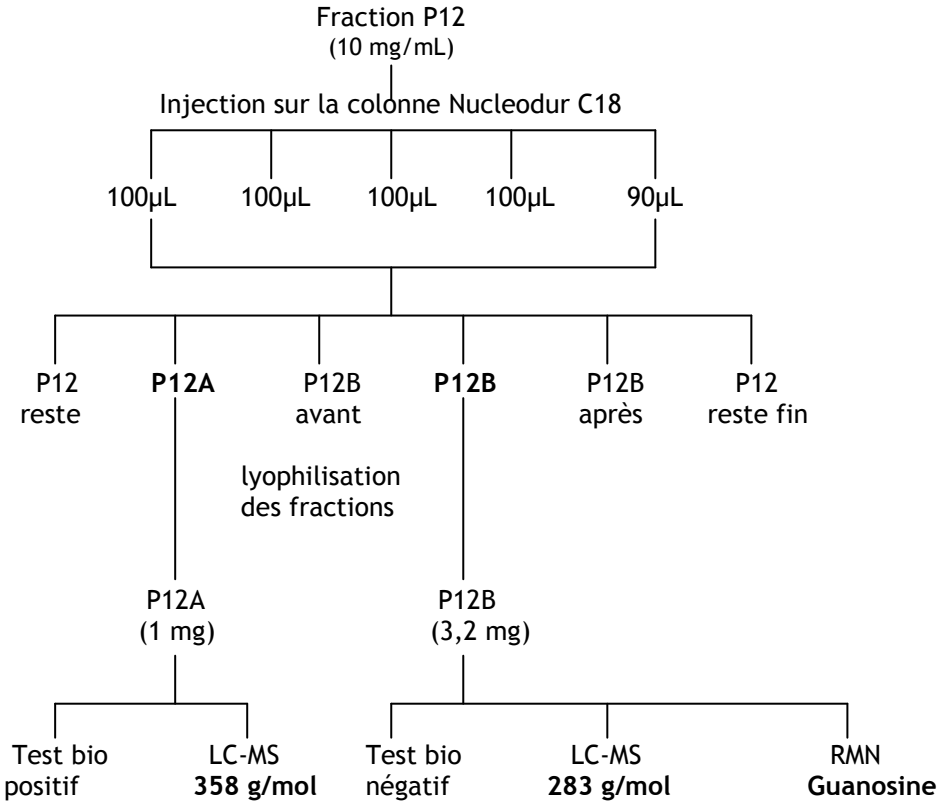


FIGURE 24 : Schéma de purification et d'analyse des composés P12A et P12B

Résultats

I. Analyse de gènes induits par des signaux moléculaires végétaux

I-1 Description des régions *lfa* et *lfg*

Ce travail concerne les deux régions *lfa* et *lfg* du génome de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* (Figure 25). Cette souche possède 18 gènes codant un régulateur de la transcription de la famille LacI.

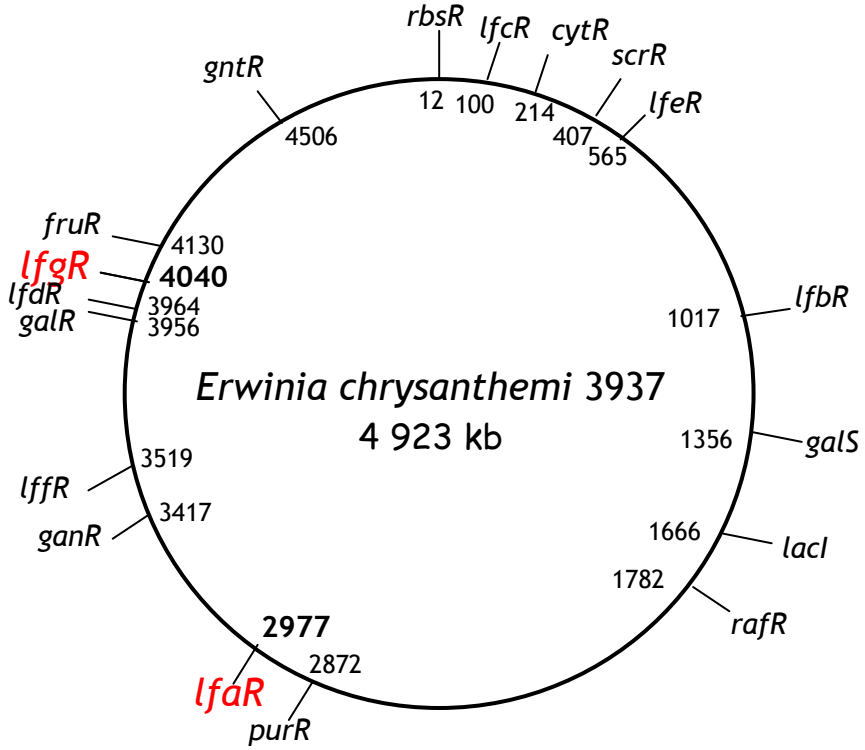


FIGURE 25 : Localisation des gènes codant un régulateur de la famille LacI chez *E. chrysanthemi* (Cornu, 2006)

Une étude systématique de ces régulateurs a relevé l'intérêt dans la perception de signaux végétaux des deux régulateurs LfaR et LfgR. Un mutant du gène régulateur *lfaR* a une virulence très diminuée par rapport à la souche sauvage, dans le test de la pathogénie sur endives (Figure 26).

La région *lfa* contient 3 gènes *lfaR*, *lfaA* et *lfaT* (Figure 27). Une analyse des protéines correspondantes a été faite pour obtenir des indications sur leur fonction. LfaR appartient à la famille LacI de régulateurs transcriptionnels, c'est-à-dire de protéines contrôlant la

transcription de gènes en se fixant directement sur une séquence spécifique de l'ADN (Lewis, 2005). LfaT appartient à la famille dite MFS (Major Facilitator Superfamily) de transporteurs, ce sont des protéines de la membrane interne qui permettent le passage (entrée ou exportation) de petites molécules ou de macromolécules (Law *et al.*, 2008). LfaA appartient à la classe 31 des glycoside-hydrolases (GH31), les protéines de cette famille correspondent pour la plupart à des enzymes à activité α-glucosidase mais elle comporte aussi des α-xylosidases, des glucoside lyases et de nombreuses protéines de fonction inconnue (Cantarel *et al.*, 2009). Cette région est conservée chez d'autres bactéries comme *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli* (souches APEC BEN2908 et UPEC CFT073, locus présent dans un îlot de pathogénie), *Shigella sonnei*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia pestis* (5 souches) et *Yersinia pseudotuberculosis*. On trouve, en plus, un homologue de LfaA chez les organismes eucaryotes, il est impliqué dans la virulence du champignon *Ustilaga maydis* (Schirawski *et al.*, 2005).



FIGURE 26 : Test de la virulence sur endives
Le pouvoir pathogène d'un mutant dont le régulateur *lfaR* est inactivé est diminué par rapport à celui de la souche sauvage (WT). Cela signifie que la présence du régulateur *lfaR* augmente la virulence de cette bactérie. Le témoin négatif (T-) correspond à une blessure sans bactéries.

La région *lfg* contient 7 gènes (Figure 27) codant des protéines sur lesquelles quelques informations ont été obtenues à l'aide de recherche d'homologie de séquence. LfgR est un régulateur de la famille LacI. LfgMEAB forment un transporteur de type ABC (ATP Bindind Cassette) (Davidson *et al.*, 2008) incluant deux protéines membranaires LfgM et LfgE, une ATPase LfgA et une protéine de liaison périplasmique LfgB. LfgN et LfgO correspondant probablement à des enzymes : LfgN présente des homologies avec des lyases et LfgO avec des oxydoréductases. Cette région *lfg* est conservée chez les bactéries associées aux plantes comme *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* et divers *Rhizobium*. De plus, la protéine LfgN est présente chez quelques champignons comme *Neurospora*.

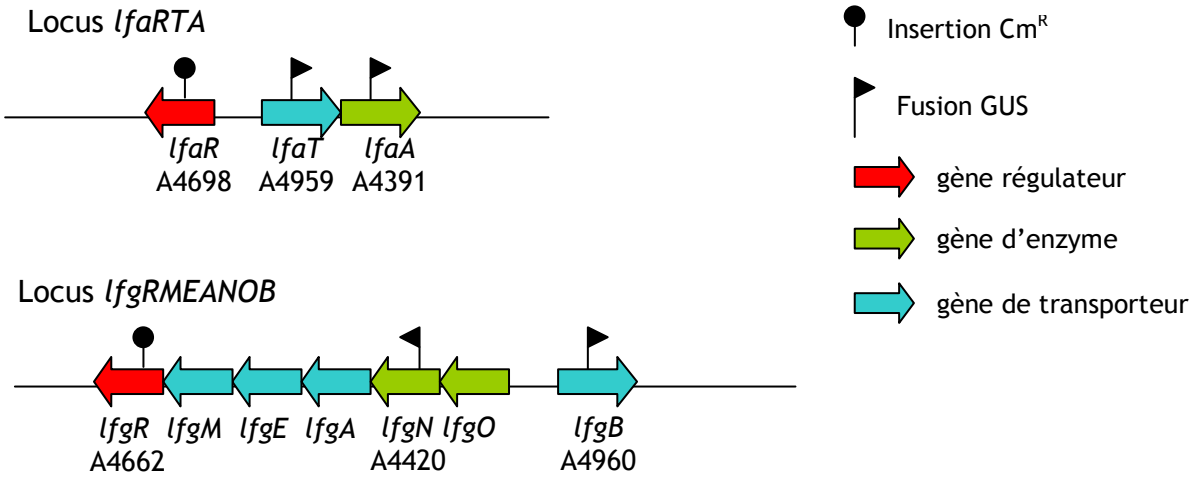


FIGURE 27 : Organisation génétique des loci *lfa* et *lfg*
Les gènes sont représentés par de larges flèches, en rouge s'ils codent un régulateur, en bleu un transporteur et en vert une enzyme. La position des mutations obtenues dans ces gènes est indiquée par un drapeau pour les insertions *uidA*-Kan et par un panneau rond pour les insertions Cm.

I-2 Construction de mutant dans les régions *lfa* et *lfg*

Pour étudier des régions *lfa* et *lfg*, l'approche génétique utilisée impliquait la construction de mutants de régulation, inactivés par insertion d'une cassette portant la résistance au chloramphénicol, et de mutants dans les gènes de structure voisins, obtenus en insérant une cassette portant la résistance à la kanamycine couplée au gène rapporteur *uidA*, codant la β-glucuronidase (Figure 27).

J'ai construit les mutants *lfaT* et *lfgB*, les autres mutants étant disponibles au laboratoire (Van Gijsegem *et al.*, 2008). Après amplification par PCR, j'ai clonés les gènes *lfaT* et *lfgB* chez *E. coli* dans le vecteur pGEM-T. Après extraction par lyse alcaline, la taille du plasmide a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. Les gènes *lfaT* et *lfgB* ont été interrompus par digestion avec les enzymes HindII et SalI, respectivement. Une étape de ligature a permis d'obtenir l'insertion d'une cassette *uidA*-Kan. Les plasmides ont ensuite été sélectionnés après transformation dans *E. coli* grâce à l'acquisition de la résistance Kan^R. Le sens d'insertion de la cassette a été vérifié par digestion enzymatique et électrophorèse en gel d'agarose. Enfin, les plasmides retenus ont été introduits dans *E. chrysanthemi* 3937 par électroporation et sélection des clones ayant acquis la résistance Kan^R. L'intégration des mutations dans le génome d'*E. chrysanthemi* a été réalisée par recombinaison homologue favorisée en milieu bas-phosphate. Les mutants obtenus sont les souches A4959 et A4960.

I-3 Induction par des extraits de plantes des gènes *lfaA* et *lfgN*

En absence d'extrait de plante, les fusions *lfaA* et *lfaT* ne sont presque pas exprimées. En présence d'extrait de plante la fusion *lfaA* montre une forte expression, par contre l'expression de *lfaT* est peu augmentée (Tableau 11). LfaT étant un transporteur membranaire, son inactivation peut provoquer l'absence de transport de l'inducteur et donc une mauvaise induction. Ceci montre que le gène *lfaA* est induit par un composé présent dans l'extrait végétal et suggère que le transporteur LfaT sert à son entrée.

De même, la fusion *lfgN* est faiblement exprimée sauf en présence d'extrait végétal (Tableau 11). Le gène de transporteur *lfgB* est exprimé à un niveau nettement plus élevé mais il est peu induit par l'extrait. Il est probable que LfgB participe au transport de l'inducteur du gène *lfgN*.

TABLEAU 11 : Effet d'extraits de plantes sur les fusions *lfaA* et *lfgN*
Les cultures bactériennes ont été réalisées en milieu M63 avec glycérol par croissance sous agitation à 30°C pendant 24 h. L'extrait testé est celui d'endive crue ajouté à concentration finale de 1%.
Les fusions avec le gène rapporteur *uidA* (GUS) reflètent l'expression des gènes *lfaA, lfaT, lfgN* et *lfgB*.

Fusion	Extrait	AS-GUS
lfaA::uidA	-	7
	+	846
lfaT::uidA	-	1
	+	8
lfgN::uidA	-	8
	+	115
lfgB::uidA	-	159
	+	289

Des gammes de concentrations d'extraits « crus » (obtenus à froid) et « cuits » (obtenus à chaud) ont été testées sur les fusions *lfaA* et *lfgN* (Figure 28). Tous les extraits de plantes testés sont inducteurs mais les extraits crus sont plus efficaces que les extraits cuits car l'induction est observée à plus basse concentration. Une forte activité GUS est obtenue pour la fusion *lfaA* dès 0,25% d'extrait d'endive cru et 2% d'extrait d'endive cuit. La fusion *lfgN* est bien induite pour une concentration supérieure à 1% d'extrait cru et à 8% d'extrait cuit. Cette analyse montre que les inducteurs sont des molécules moyennement sensibles à la chaleur car elles ne sont que partiellement inactivées par chauffage 20 min à 110°C.

D'autre part, la comparaison entre les 2 gènes montre qu'il faut une concentration plus forte d'extrait pour l'induction de *lfgN* que pour celle de *lfaA*.

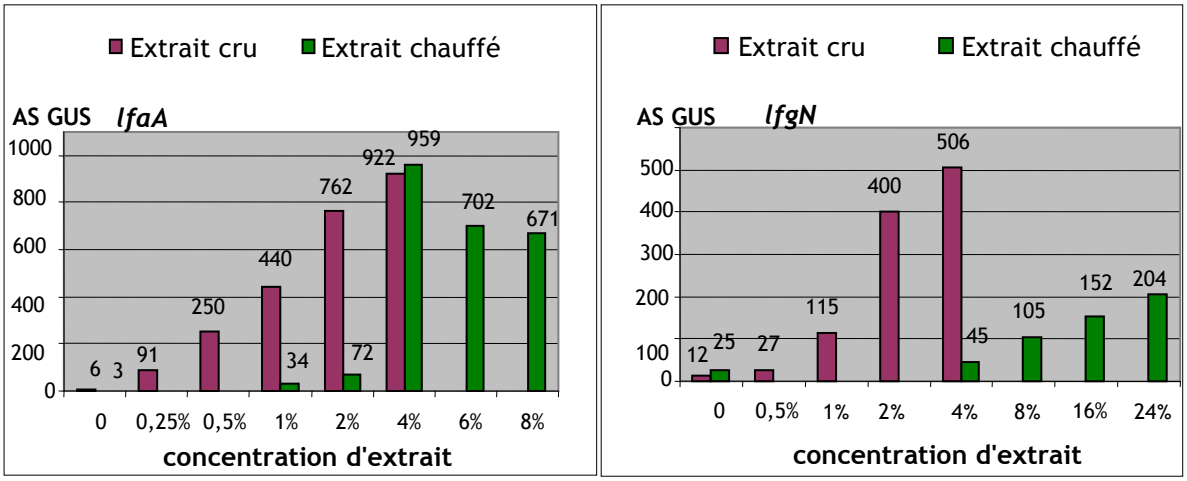


FIGURE 28 : Effet de différentes concentrations d'extraits sur les fusions *lfaA* et *lfgN*
Les souches portant les fusions lfaA et lfgN ont été cultivées pendant 24 h à 30°C en milieu M63 glycérol contenant des concentrations croissantes d'extraits cru ou chauffé. L'activité spécifique (AS) GUS représente l'expression de ces fusions.

I-4 Autres conditions affectant l'expression des gènes *lfa* et *lfg*

L'environnement est un facteur qui module l'expression de la plupart des gènes bactériens. Nous avons testés si diverses conditions environnementales affectent l'expression des fusions *lfaA* et *lfgN*.

L'effet du milieu de culture a été testé en comparant le milieu complet BL et le milieu minimum M63 avec glycérol. Une fusion *lfaA* est mieux exprimée en milieu BL (Figure 29). Parmi les composées entrant dans la composition du BL, c'est l'extrait des levures qui s'est révélé être responsable de cette induction. Cet extrait comprend probablement des molécules voisines de celles présentes dans les extraits végétaux.

L'expression de la fusion *lfgN* n'est pas modifiée en milieu BL (non montré).

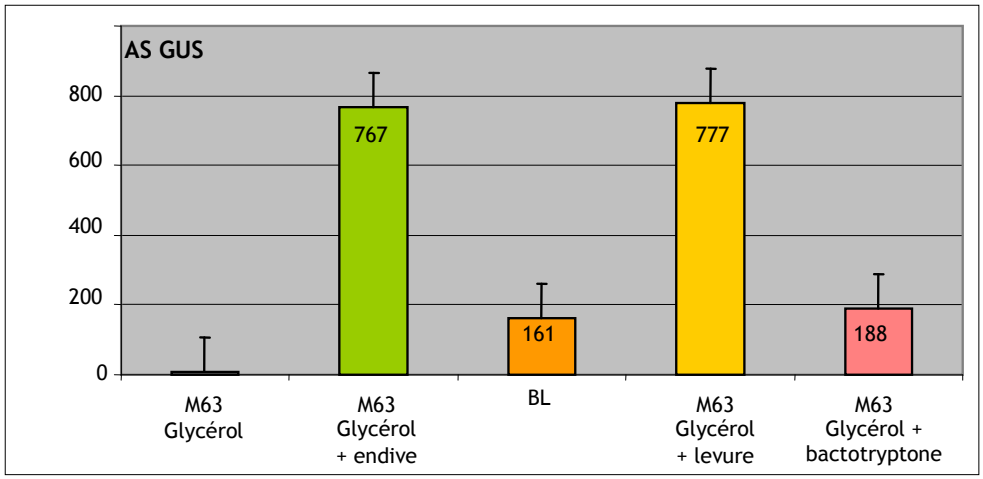


FIGURE 29 : Effet du milieu sur la fusion *lfaA*
L'effet de différents milieux a été testé sur l'expression des fusions. La fusion *lfaA* étant augmentée en BL par rapport au M63 glycérol, les différents constituants du BL ont été ajoutés à la concentration finale de 1% dans du M63 glycérol. Une forte induction est observée dans le cas du milieu M63 enrichi en extrait d'endive ou extrait de levure.

L'expression des fusions *lfaA* et *lfgN* varie en fonction de la croissance bactérienne (Tableau 12). Pour ces deux gènes, l'induction ne se fait pas dès le démarrage de la croissance. Pour *lfaA*, l'induction devient nette après 8 heures de croissance (culture en milieu de phase exponentielle) et elle reste ensuite à un niveau stable et élevée. Pour *lfgN*, l'expression débute à 8 heures mais elle atteint son maximum seulement à 24 heures, en phase stationnaire de croissance.

TABLEAU 12 : Expression de *lfaA* et de *lfgN* en fonction de la croissance
Les souches portant la fusion *lfaA::uidA* ou *lfgN::uidA* ont été cultivées sous agitation en milieu M63 glycérol à 30°C. L'analyse cinétique a été effectuée pendant 24 heures en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm qui permet de suivre la croissance des bactéries. Le dosage de la ß-glucuronidase (GUS) a été réalisé toutes les 2 h afin de déterminer l'activité spécifique (AS) de l'enzyme rapporteur qui reflète l'expression des gènes fusionnés.

Souche (fusion)	Temps [h]	DO 600 nm	AS-GUS
A4391 *(lfaA::uidA)*	2	0,044	0
	4	0,169	0
	6	0,375	11
	8	0,426	473
	10	0,512	555
	24	2,410	595
A4420 *(lfgN::uidA)*	2	0,038	0
	4	0,194	0
	6	0,319	0
	8	0,448	59
	10	0,573	60
	24	2,000	194

D'autres conditions environnementales telles que la température, l'osmolarité et l'effet du glucose ont été testées (Tableau 13). La température optimale pour l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN* semble être de 27°C. Cependant, la température optimale de croissance d'*E. chrysanthemi* étant de 30°C, c'est cette température qui a été utilisée pour les autres dosages. La variation de l'osmolarité ou l'ajout du glucose dans le milieu M63 n'améliorent pas l'expression de la fusion *lfgN*. En effet, il y a une diminution de l'induction à forte osmolarité et en présence de glucose.

TABLEAU 13 : Effet de la température, de l'osmolarité et du glucose
Les températures de 27, 30 et 37°C ont été testées pour vérifier si la température influence l'expression de deux fusions *lfaA* et *lfgN*. Les cultures sont réalisées en tubes de 5 mL pendant 24 h sous agitation en milieu M63+glycérol (-) ou avec l'ajout de 50 µL d'extrait d'endive pur (+). La concentration finale d'extrait est donc de 1%.
L'effet de l'osmolarité a été analysé sur la fusion *lfgN*. Les cultures ont été réalisées pendant 24 h à 30°C sous agitation en milieu M63 dilué 2 fois (M63 ½), M63 et M63+NaCl avec du glycérol et en présence (+) ou absence (-) d'extrait (200 µL pour 5 mL).
Pour tester l'effet du glucose sur la fusion *lfgN*, les cultures ont été réalisées pendant 24 h à 30°C sous agitation en milieu M63 glycérol ou M63+glucose en présence (+) ou absence (-) d'extrait (200 µL pour 5 mL).

Conditions environnementales		Extrait	AS GUS *lfgN::uidA*	AS GUS *lfaA::uidA*
Température	27°C	- +	14 238	10 542
	30°C	- +	13 130	8 297
	37°C	- +	5 87	4 87
Osmolarité	M63 1/2	- +	7 109	
	M63	- +	6 105	
	M63 + NaCl	- +	9 17	
Effet glucose	M63 + glycérol	- +	6 105	
	M63 + glucose	- +	3 38	

I-5 Effet du régulateur LfaR sur l'expression de *lfaA* et *lfaT*

L'effet des gènes régulateurs sur les gènes de structure voisins a été étudié en comparant l'expression des gènes de structure dans un contexte sauvage et dans les doubles mutants comprenant une insertion Cm dans le gène régulateur en plus de la fusion *uidA*-Kan dans le gène de structure. La construction des doubles mutants s'est faite par transduction avec le phage Phi-EC2.

L'activité des fusions *lfaA* et *lfaT* a été mesurée en présence ou non de la mutation du gène régulateur adjacent *lfaR* (Tableau 14). Les activités spécifiques GUS obtenues montrent que lorsque le régulateur *lfaR* est inactivé, *lfaA* et *lfaT* sont beaucoup plus fortement exprimés. En effet, cette expression est plus de cent fois supérieure à l'expression de la fusion non induite dans un contexte sauvage. Cette forte augmentation de leur expression démontre que le régulateur LfaR exerce un effet de répression sur *lfaA* et *lfaT*. Le régulateur LfaR exerce un contrôle négatif sur ces gènes de structure.

On note aussi l'absence d'induction des fusions *lfaA* et *lfaT* lorsque *lfaR* est inactivé, ceci est une forte indication que le régulateur LfaR est responsable de cette induction. Par contre, une diminution de deux fois de l'activité GUS de la fusion *lfaT* est observée dans le double mutant si l'on ajoute de l'extrait de plante. Cette répression pourrait être due à divers composés présents dans l'extrait végétaux, en particulier à des sources de carbone qui provoqueraient une répression catabolique sur le gène du transporteur. Pour la fusion *lfaA*, une diminution de deux fois de son expression dans le mutant *lfaR* par rapport au niveau pleinement induit en contexte sauvage suggère un léger effet activateur, direct ou indirect, de LfaR sur *lfaA*.

TABLEAU 14 : Effet du régulateur LfaR sur les fusions *lfaA* et *lfaT*
Les cultures ont été effectuées en milieu M63 glycérol. Le dosage GUS a été réalisé après 24 h de croissance à 30 °C sous agitation. L'extrait végétal utilisé était le chrysanthème cru à la concentration finale de 1%.

Fusion/mutation	Extrait	AS GUS
lfaA::uidA	-	2
	+	504
lfaA::uidA lfaR	-	245
	+	212
lfaT::uidA	-	1
	+	8
lfaT::uidA lfaR	-	701
	+	310

I-6 Effet du régulateur LfgR sur l'expression de *lfgN* et *lfgB*

Lorsque le gène régulateur *lfgR* est inactivé, une nette augmentation est observée en dosant l'expression des fusions dans les gènes adjacents *lfgN* et *lfgB* (Tableau 15). Cette augmentation est plus de mille fois supérieure pour *lfgN* et d'environ quatre fois supérieure

pour *lfgB* dont le niveau de base est plus élevé. Ces résultats prouvent qu'il y a un contrôle négatif de la part du gène de régulation *lfgR* sur les gènes de structure adjacents. Le régulateur LfgR agit comme répresseur de ces deux fusions.

L'absence d'induction de la fusion *lfgN* lorsque *lfgR* est inactivé suggère fortement que LfgR est responsable de cette induction. Une diminution de deux à trois fois de l'expression des fusions *lfgN* et *lfgB* en présence d'extrait indique la présence de composés inhibiteurs avec probablement un effet de type répression catabolique.

TABLEAU 15 : Effet du régulateur LfgR sur les fusions *lfgN* et *lfgB*
Les cultures ont été effectuées en milieu M63 glycérol. Le dosage GUS a été réalisé après 24 h de croissance à 30°C sous agitation. L'extrait végétal utilisé était le chrysanthème cru à la concentration finale de 1%.

Fusion/mutation	Extrait	AS GUS
lfgN::uidA	-	1
	+	207
lfgN::uidA lfgR	-	1142
	+	786
lfgB::uidA	-	159
	+	289
lfgB::uidA lfgR	-	700
	+	254

I-7 Effet d'autres régulateurs

Lorsque les conditions de culture varient, des différences d'expression des fusions sont observées même quand le régulateur voisin est inactivé (Tableaux 14 et 15). Cela suggère que ces gènes sont contrôlés par d'autres régulateurs secondaires. Le régulateur global du catabolisme carboné, Crp, pourrait être impliqué dans une régulation de type répression catabolique. Ces gènes peuvent aussi être contrôlés par des régulateurs qui jouent un rôle dans la modulation de l'expression des fonctions de virulence d'*E. chrysanthemi*, tels que KdgR, PecS, ExpR ou PecT. Ceci nous a conduit à tester l'expression des fusions *lfaA* et *lfgN* dans différents mutants de régulation (Tableau 16).

L'inactivation des régulateurs PecS et KdgR n'affecte pas le niveau de base des fusions *lfaA* et *lfgN*. Ceci suggère que les régulateurs PecS et KdgR ne sont pas répresseurs de ces fusions. Lorsque les régulateurs PecT et ExpR sont inactivés, approximativement les mêmes

niveaux de base et niveaux induits sont retrouvés dans le cas des fusions *lfaA* ou *lfgN*. Ces régulateurs n'ont donc pas d'effet sur le phénomène d'induction.

TABLEAU 16 : Effet des régulateurs PecS, KdgR, PecT et ExpR sur les fusions *lfaA* et *lfgN*
Les fusions *lfaA::uidA* et *lfgN::uidA* ont été transférées dans les mutants *pecS*, *kdgR*, *pecT* et *expR*. Les différentes souches ont été cultivées en milieu M63 glycérol en présence (+) ou absence (-) d'extrait (50 µL pour *lfaA* et 200 µL pour *lfgN* dans 5 mL). Après croissance 24 h à 30°C l'activité spécifique ß-glucuronidase (AS GUS) a été mesurée.

Fusion *lfaA::uidA* Mutation	Extrait (50 µL)	AS GUS
-	- +	3 1039
pecS$_{(A3953)}$	-	6
kdgR$_{(A4114)}$	-	6
pecT$_{(A2174)}$	- +	6 1073
expR$_{(A4532)}$	- +	3 1182

Fusion *lfgN::uidA* Mutation	Extrait (200 µL)	AS GUS
-	- +	10 576
pecS$_{(A3953)}$	-	11
kdgR$_{(A4114)}$	-	9
pecT$_{(A2174)}$	- +	6 606
expR$_{(A4532)}$	- +	9 853

I-8 Bilan des données sur chaque région

Le gène *lfaA* est fortement induit par les extraits d'endive, de pomme de terre (espèce Benji) et de Saint-Paulia (Tableau 17). La fusion *lfaT* n'est pas induite, ce qui pourrait correspondre à un défaut d'entrée de l'inducteur si LfaT est responsable de son transport. Le régulateur LfaR réprime les deux gènes *lfaA* et *lfaT*.

Le gène *lfgN* est induit par des extraits de plantes en particulier de chrysanthème et d'endive (Tableau 18). La fusion *lfgB* n'est pas induite, un défaut de transport de l'inducteur pourrait résulter de l'inactivation de ces gènes codant un élément du transporteur lfgMEAB. La mutation *lfgR* provoque une augmentation de l'expression de *lfgN* et *lfgB*, donc LfgR agit comme régulateur négatif de ces gènes.

Dans chacun des cas, les gènes de structure *lfaA* et *lfgN* sont induits par des extraits de plantes. Cependant, la présence de deux régulateurs distincts, de deux systèmes de transports spécifiques et des différences de réponse aux extraits testés (Figures 28, 29 et 30, Tableaux 17 et 18) suggèrent que les gènes *lfaA* et *lfgN* ne répondent pas, ou pas exactement, aux mêmes molécules. Il est maintenant nécessaire de clarifier quelles sont les molécules inductrices des ces gènes présentes dans les extraits végétaux.

II. Mise au point d'un test biologique

II-1 Comparaison de l'effet de différentes plantes, choix des végétaux

Pour déterminer quelles plantes possèdent des inducteurs de l'expression des gènes de structure étudiés, les souches ont été cultivées en présence de divers extraits de plantes connues pour leur sensibilité à *E. chrysanthemi*. Ces extraits ont tout d'abord été testés à la concentration finale de 1%. Le dosage de l'activité GUS montre que l'expression de la fusion *lfaA* est très fortement induite par les extraits de tubercules de pomme de terre et de feuilles de Saint-Paulia, puisque son expression est multipliée par environ trois cent et deux cent fois, respectivement (Tableau 17). Cette expression est également très induite par les extraits de feuilles d'endive ou de chrysanthème, avec un facteur d'induction supérieur à cent.

TABLEAU 17 : Effet de différents extraits de plantes sur la fusion *lfaA*
Les cultures ont été réalisées en M63 glycérol par croissance pendant 24 h à 30°C sous agitation. L'extrait végétal cru des différentes plantes était ajouté à la concentration finale de 1%. Les dosages de l'enzyme rapporteur (GUS) reflètent l'expression du gène *lfaA*.

Fusion	Extrait	AS GUS
lfaA::uidA	-	6
	endive	730
	chrysanthème	729
	pomme de terre	1816
	saint paulia	1104

Les extraits végétaux n'ont pas le même effet sur la fusion *lfgN* (Tableau 18). L'extrait de chrysanthème est le plus efficace (taux d'induction supérieur à deux cent), celui d'endives est également actif mais avec un effet inducteur moindre (taux d'induction d'environ vingt). On peut considérer que les extraits de pomme de terre et de Saint-Paulia n'ont pratiquement pas d'effet dans ces conditions.

TABLEAU 18 : Effet de différents extraits de plantes sur la fusion *lfgN*
Les cultures ont été réalisées en M63 glycérol par croissance pendant 24 h à 30°C sous agitation. L'extrait végétal cru des différentes plantes était ajouté à la concentration finale de 1%. Les dosages de l'enzyme rapporteur (GUS) reflètent l'expression du gène *lfgN*.

Fusion	Extrait cru	AS GUS
lfgN::uidA	-	6
	endive	115
	chrysanthème	1455
	pomme de terre	11
	saint paulia	18

Pour les pommes de terre, deux types d'extraits crus ont été analysées sur les fusions *lfaA* et *lfgN* (Figure 30). Il existe en effet des différences importantes de composition entre la peau et la chair des tubercules de pomme de terre. Des extraits de chair et de peau ont donc été préparés séparément. Une gamme de concentration a été utilisée afin d'identifier une éventuelle différence d'efficacité. Les deux types d'extraits « chair » et « peau » induisent de manière semblable. La fusion *lfaA* est induite très fortement en présence d'extrait à 1%. Par contre, la fusion *lfgN* montre une induction seulement pour des concentrations supérieures à 4%. Comme dans la Figure 28 on constate qu'il faut une concentration beaucoup plus forte d'extrait pour l'induction de *lfgN* que pour celle de *lfaA*. L'absence d'induction de *lfgN* observée dans le Tableau 18 avec des extraits totaux de pomme de terre 1% n'est probablement due qu'à une trop faible concentration d'extraits.

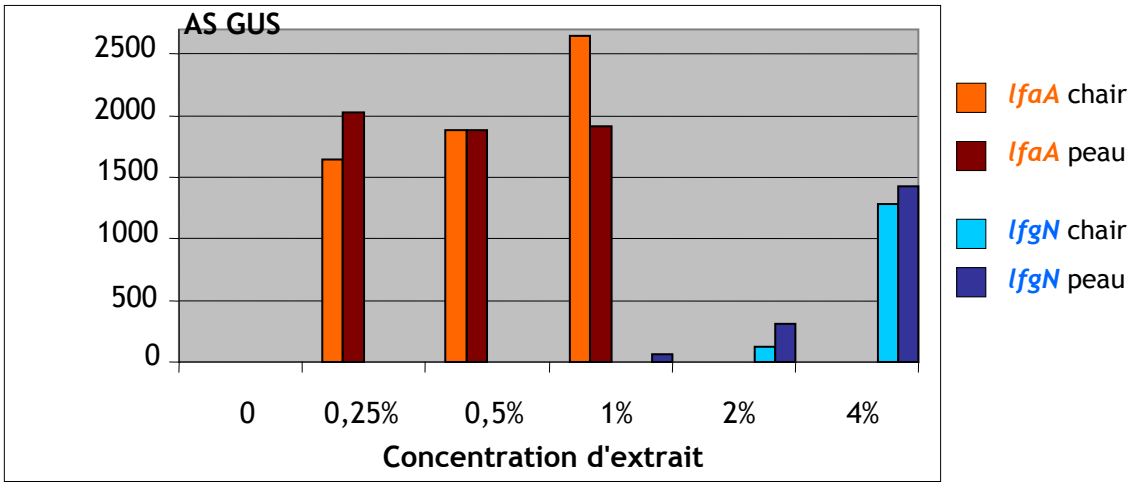


FIGURE 30 : Expression des fusions *lfaA* et *lfgN* en présence d'extraits de chair et peau de tubercules de pommes de terre
Les cultures ont été réalisées en M63 glycérol par croissance pendant 24 h à 30°C sous agitation. L'extrait de chair ou de peau de pomme de terre était ajouté à différentes concentrations finales. Pour la fusion *lfaA*, la concentration d'extrait varie entre 0,25 et 1%, pour la fusion *lfgN* entre 1 et 4%. Les dosages de l'enzyme rapporteur (GUS) reflètent l'expression des gènes *lfaA* et *lfgN*.

Les endives et les pommes de terre sont plus facilement disponibles en toute saison dans le commerce que les chrysanthèmes et les saint paulia. De plus, les plantes comestibles sont exposées à moins des traitements chimiques que les plantes ornementales. Les feuilles d'endives et les tubercules de pommes de terre ont donc été choisis comme tissus végétaux de base pour les analyses suivantes.

II-2 Adaptation en microplaque de la mise en évidence de l'induction

Pour l'objectif de purification des inducteurs, il était nécessaire de mettre au point un crible rapide à moyen débit, compatible avec un fractionnement bio-guidé. Des tests d'induction ont donc été adaptés en microplaques afin d'augmenter les capacités en nombre d'échantillons traités en parallèle. En effet, un processus de séparation des molécules végétales à partir d'un extrait brut impliquera de tester de nombreuses fractions. L'utilisation de microvolumes permet également de diminuer les quantités d'échantillons et de réactifs utilisés pour mettre en évidence l'induction.

Dans le cas les fusions *lfaA* et *lfgN*, une préculture de la nuit des souches correspondantes est diluée 40 fois en M63 glycérol. Cet inoculum est utilisé pour ensemencer la microplaque. Chaque cupule contient 100 µL d'inoculum et la culture se poursuit à 30°C pendant 24 h sous agitation. Après 24 h, la croissance des bactéries est vérifiée en mesurant la densité optique à 600 nm. Le but principal est de réaliser un dosage GUS sur la culture en additionnant le substrat PNPU (100 µL, 0,16 g/L final) puis en suivant l'apparition du produit PNP par mesure de la DO à 405 nm pendant 30 min à 37°C.

Pour tester l'effet d'un composé d'un extrait ou d'une fraction, ceux-ci sont ajoutés dans la cupule avant de démarrer la croissance. La quantité d'extrait de plante ajoutée est 5 fois supérieure dans le cas de la fusion *lfgN*. Par cupule contenant déjà 100 µL de bactéries diluées en M63 glycérol, sont ajoutés 10 µL d'extrait de plante pour *lfaA* et 50 µL pour *lfgN*. Dans chaque microplaque, au moins une cupule est laissée sans ajout de composé (témoin négatif).

Pour les deux gènes d'intérêt, *lfaA* et *lfgN*, ces conditions permettent d'observer une induction par les extraits crus d'endive ou de pomme de terre qui servent de témoins positifs.

II-3 Analyse de l'effet inducteur de différents composés

Suite à la mise au point des conditions d'induction en microplaques, les tests biologiques ont été réalisés avec divers composés disponibles au laboratoire (Tableau 19).

Des sucres simples, oligosaccharides et polysaccharides ont été testés dans une gamme de concentrations finales de 1 à 10 mg/mL. Aucun effet significatif n'a été observé après l'addition des polyaccharides : amidon, arabinogalactane, polygalacturonate ; des oligosaccharides : cellobiose, lactose, mélibiose, saccharose ; des sucres simples : L-arabinose, fructose, L-fucose, D-galactose, D-galacturonate, D-glucose, gluconate, mannitol,

D-mannose, L-rhamnose, D-xylose; ou d'autres sources de carbone comme le fumarate, le lactate et le succinate.

Les aminoacides ont été testés dans une gamme de concentrations finales de 0,1 à 1 mg/mL. Aucun effet n'a été observé après addition de 17 aminoacides indépendamment ou de casaminoacides (mélange d'aminoacides produit par hydrolyse de protéines).

Des bases nucléiques ont également été utilisées aux concentrations finales de 0,015 à 0,15 mg/mL pour l'adénine, 0,02 à 0,2 mg/mL pour la cytosine, 0,0075 à 0,075 mg/mL pour la guanine, 0,05 à 0,5 mg/mL pour la thymine et l'uracile. Aucun effet significatif n'a été noté.

Enfin, divers composés présents dans les plantes ont été ajoutés à une concentration supérieure ou égale à 0,1 mg/mL pour évaluer leur pouvoir inducteur potentiel: $CaCl_2$, acide pantothénique, acide phytique, acide alginique, acide mucique, acide férulique, éthyl férulate, bétaine, gomme arabique, inositol, arbutine, salicine. Aucun de ces composés n'a montré d'effet inducteur significatif.

TABLEAU 19 : Récapitulatif des composés testés pour l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN*

Sucres	Aminoacides	Nucléotides	Divers
Amidon	Arginine	Adénine	$CaCl_2$
Arabinogalactane	Asparagine	Cytosine	Acide pantothénique
L-arabinose	Acide aspartique	Guanine	Acide phytique
Cellobiose	Alanine	Thymine	Acide alginique
Fructose	Cystéine	Uracile	Acide mucique
L-fucose	Glutamine		Acide férulique
Fumarate	Histidine		Ethyl férulate
D-galactose	Isoleucine		Bétaine
D-galacturonate	Leucine		Gomme arabique
D-glucose	L-lysine		Inositol
Gluconate	Méthionine		Arbutine
Lactate	Phénylalanine		Salicine
Lactose	Proline		Extrait de maïs
Mannitol	L-serine		MBOA
D-mannose	Thréonine		
Mélibiose	Tryptophane		
Polygalacturonate	Valine		
L-rhamnose	Casaminoacides		
Saccharose			
Succinate			
D-xylose			

L'extrait total de maïs et un de ces composés le MBOA (6-methoxybenzoxazolin-2-one) ont été également testés mais sans effet ni sur la fusion *lfaA* ni sur la fusion *lfgN* (Tableau 20).

TABLEAU 20 : Effet d'extrait de maïs et de MBOA sur les fusions *lfaA* et *lfgN*
L'extrait de maïs et d'un de ces constituants, le MBOA (6-methoxybenzoxazolin-2-one) ont été préparés au laboratoire (Walker V., communication personnelle). L'extrait de maïs est utilisé à la concentration finale de 4% et la molécule MBOA à la concentration finale de 1%. Leur effet sur les fusions *lfaA* et *lfgN* a été testé en microplaque à partir d'une préculture bactérienne diluée 40x en M63 glycérol. Dans chaque puits, 100 µL de cette suspension bactérienne ont poursuivies leur croissance pendant 24 h à 30°C sous agitation. Ensuite l'activité GUS a été évaluée pendant 30 min (7 mesures) à 405 nm à 37°C. L'activité GUS est exprimée en unités arbitraires (ΔDO à 405 nm).

Fusion	Extrait	activité GUS
lfaA::uidA	-	0,16
	maïs	0,66
	MBOA	0,06
lfgN::uidA	-	0
	maïs	0
	MBOA	0,10

III. Fractionnement d'extraits végétaux

III-1 Poids sec de l'extrait végétal

La concentration en matière sèche par gramme d'extrait brut a tout d'abord été déterminée. L'extrait le plus concentré correspond à la chair de pomme de terre avec 111 mg de matière sèche par g d'extrait brut. Les extraits de peau de pomme de terre et de feuilles d'endive sont environ deux fois moins concentrés avec 49 mg/g et 54 mg/g d'extrait brut, respectivement.

III-2 Extraction en phase solide

Un premier fractionnement de l'extrait végétal a été effectué par la méthode d'extraction en phase solide SPE (Solid Phase Extraction). Après avoir fractionné les deux extraits crus correspondants à l'endive et à la chair de pomme de terre, l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN* a été testée (Tableau 21). Les composés apolaires extraits par le méthanol ne sont pas inducteurs des fusions *lfaA* et *lfgN*. Les composés solubles dans l'eau provoquent l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN*, mais l'induction est toujours moins forte que dans le cas de l'extrait de plantes non-fractionné par SPE, ce qui montre une perte des composés inducteurs par cette méthode. Cela pourrait également s'expliquer par un effet synergique de deux composés séparés en SPE.

Les composés actifs sont donc polaires car solubles dans l'eau. Ils ne sont pas, ou peu, solubles dans le méthanol et ils ne sont pas ou peu retenus sur la colonne utilisée (C18 pour les composés hydrophobes-apolaires).

TABLEAU 21 : Analyse après extraction SPE
Les bactéries ont été cultivées en M63 glycérol pendant 24 h à 30°C sous agitation. Les extraits végétaux crus sont ajoutés à la concentration finale de 1%.
Les extraits crus d'endive et de chair de pommes de terre ont été fractionné par SPE et l'induction de *lfaA* et *lfgN* a été testé sur les fractions non retenues (composés solubles dans l'eau) et méthanol (composés moins polaires).

Fusion	Extrait		AS GUS
lfaA::uidA	-	-	17
	endive	Extrait total	591
		SPE non retenu	285
		SPE méthanol	2
	pomme de terre (chair)	Extrait total	1293
		SPE non retenu	1248
		SPE méthanol	13
lfgN::uidA	-	-	11
	endive	Extrait total	196
		SPE non retenu	154
		SPE méthanol	11
	pomme de terre (chair)	Extrait total	117
		SPE non retenu	84
		SPE méthanol	6

III-3 Fractionnement sur gel de perméation

Les extraits de pomme de terre et d'endives préparés à partir d'un broyat de légumes ont été fractionnés en gel Sephadex LH-20, qui trie des molécules inférieures à 1000 Dalton. Le filtrat est injecté sur la colonne de gel Sephadex LH-20 (Figure 31) et les fractions sont récupérées tout les 4 mL. Pendant la progression de la séparation, on peut observer la séparation des composés visibles à l'œil. Chaque bande colorée correspond à des molécules de taille différente. En premier sortent les composés les plus grands. Quand la séparation n'est plus visible à l'œil, l'irradiation UV à 360 nm permet de suivre encore la progression. Les 140 fractions obtenues par extrait (140 pour la pomme de terre et 140 pour l'endive) sont ensuite regroupées 10 par 10 et séchées. Ces fractions sont désignées par P2 à P15 pour la pomme de terre et E2 à E15 pour l'endive, P1 et E1 correspondent au volume mort. Après pesée, les fractions sont reprises à la concentration de 10 mg/mL puis analysées par HPLC et soumises à l'évaluation en microplaque afin d'identifier les fractions actives.

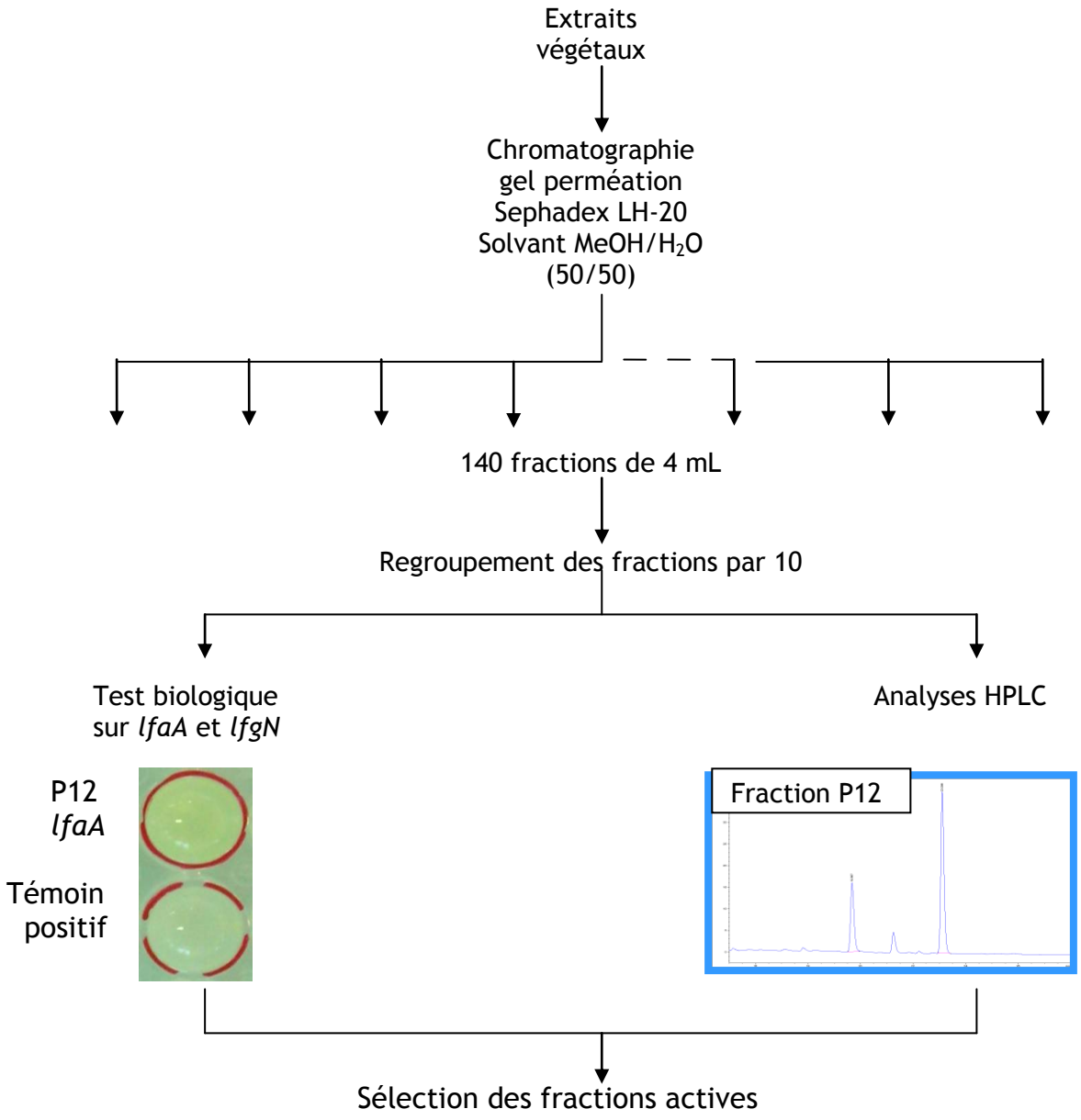


FIGURE 31 : Schéma de fractionnement bio-guidé des extraits végétaux
Les extrais végétaux sont injectés sur gel Sephadex LH-20. Le fractionnement avec du méthanol 50% comme solvant permet de récupérer 140 fractions de 4 mL, qui sont ensuite regroupées 10 par 10. Chaque fraction subit des tests biologiques en microplaque et des tests analytiques en HPLC, afin de sélectionner celles qui sont actives.

III-4 Fractions actives de pomme de terre et d'endive

Suite aux analyses en HPLC et évaluation par les tests biologiques, les fractions actives ont été sélectionnées. L'activité enzymatique varie pour les différents extraits et aussi selon la fusion. Le poids sec final et le niveau d'activité de chaque fraction active obtenue à partir des échantillons de pomme de terre et d'endive sont présentés dans le Tableau 22.

TABLEAU 22 : Activité des fractions obtenues à partir d'extraits de pomme de terre et d'endive
L'activité des fractions a été testée en microplaque à l'aide du test biologique mis au point. Ces analyses ont permis d'identifier les fractions actives à partir du fractionnement des extraits de pommes de terre et d'endives. La quantité de poids sec est présentée (en mg) pour les fractions actives. L'activité de chaque fraction est indiquée par les signes : (-) ΔDO<0,10 ; (+) ΔDO 0,11-0,40 et (++) ΔDO≥0,41.

Extrait de pomme de terre	Poids sec [mg]	Activité sur *lfaA*	Activité sur *lfgN*
$P1_{Vmort}$		-	-
P2		-	-
P3		-	-
P4		-	-
P5		-	-
P6	21,1	+	++
P7	437,8	++	++
P8	938,2	++	-
P9		-	-
P10		-	-
P11		-	-
P12	12,0	++	-
P13		-	-
P14		-	-
P15		-	-
T+		++	++
T-		-	-

Extrait d'endive	Poids sec [mg]	Activité sur *lfaA*	Activité sur *lfgN*
$E1_{Vmort}$		-	-
E2		-	-
E3		-	-
E4		-	-
E5		-	-
E6	8,1	-	+
E7	66,1	-	++
E8	129,3	+	-
E9	1102,5	+	-
E10		-	-
E11		-	-
E12		-	-
E13		-	-
E14		-	-
E15		-	-
T+		++	++
T-		-	-

La plupart des fractions n'induisent aucune des deux fusions. Quelques-unes, comme P6 et P7, contiennent des composés qui induisent à la fois les fusions *lfaA* et *lfgN*. Par contre, d'autres fractions sont principalement actives sur une des deux fusions. Il s'agit des fractions E6 et E7 actives seulement sur *lfgN*, et des fractions P8, P12, E8 et E9 actives sur *lfaA*.

III-5 Analyse HPLC des fractions provenant de l'extrait de pomme de terre

Des fractions actives provenant de pomme de terre, révélées par les tests biologiques en microplaque, ont été analysées par HPLC (interactions hydrophiles HILIC) afin de repérer les composés inducteurs. Les pics de l'extrait total de pomme de terre (extrait cru qui n'a subit aucune purification) ont été visualisés à 260 nm. Celui-ci contient plusieurs composés qui absorbent avec différentes intensités (Figure 32a). Dans la fraction P12 active sur *lfaA* se trouvent deux composés P12A et P12B qui sont majoritaires sur le chromatogramme de

l'extrait total (sur la Figure 32a PT_K et PT_M respectivement). Leur identité aux pics de l'extrait total est confirmée par leurs spectres UV (Figure 32b). Dans la fraction P8 active sur *lfaA*, se retrouvent deux autres composés majeurs P8A (PT_L sur extrait total) et P8B (PT_N) (Figure 32c), mais cette fraction ne contient ni P12A, ni P12B ce qui suggère l'existence d'inducteurs différents dans les fractions P12 et P8.

Les fractions P6 et P7 montrent une activité inductrice pour *lfaA* et *lfgN*. Dans la fraction P7, l'inducteur de *lfgN* pourrait être le composé P7A qui est retrouvé dans l'extrait total (PT_N). Dans la fraction P6, l'induction de *lfgN* serait provoquée par la présence du composé P6A qui est majoritaire et correspond à P7A. L'induction plus basse de *lfaA* serait due à la faible quantité du composé P8A présent dans la fraction P6. *LfaA* serait induit soit par le composé P7A (ou P6A), soit par d'autres composés présents en faible quantité mais identifiés dans d'autres fractions actives pour *lfaA* (comme P8A ou P12A).

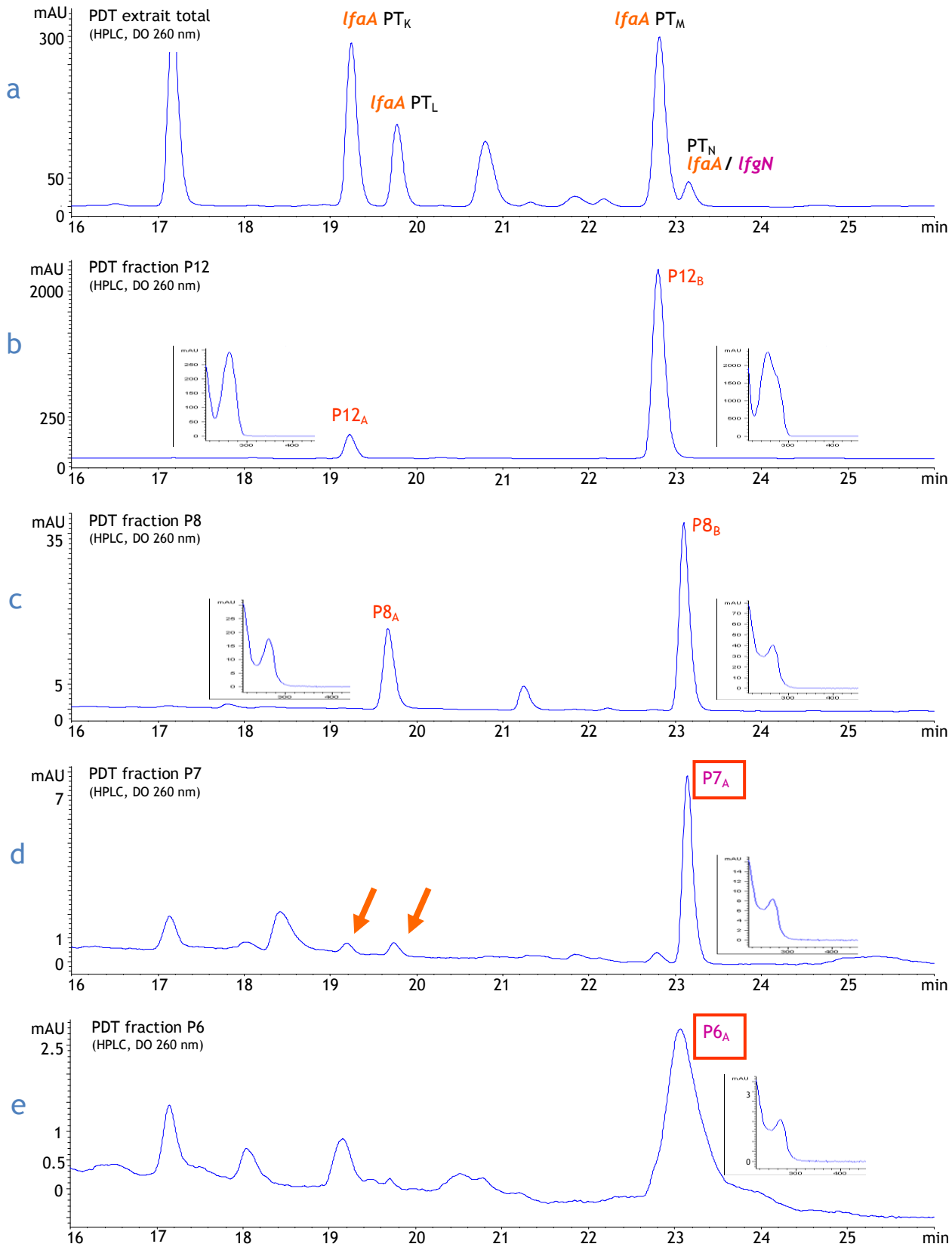


FIGURE 32 : Analyse HPLC de l'extrait total et de fractions actives obtenues à partir de l'extrait de pomme de terre

Les composés sont détectés à 260 nm. Les spectres UV des composés majoritaires des fractions sont présentés. Les pics observés dans les fractions actives P12, P8, P7 et P6 (b, c, d et e) sont retrouvés dans l'extrait total (a) (mêmes temps de rétention et spectres UV). Le composé P7A est majoritaire dans la fraction P7 (d), les deux composés indiqués par les flèches orange sont présents dans les fractions P8 et P12 actives sur *lfaA*.

III-6 Analyse HPLC des fractions provenant de l'extrait d'endive

Une interprétation similaire a été effectuée pour les fractions d'endive. Les fractions E6 et E7 induisent le gène *lfgN* alors que les fractions E8 et E9 activent le gène *lfaA* (Figure 33).

La fraction E6 contient plusieurs composés (E6A=ET_R, E6B=ET_S, E6C=ET_X, E6D=ET_Z) qui peuvent correspondre à l'inducteur de la fusion *lfgN*. Le pic majeur (E8=E9=ET_V) ne peut pas être l'inducteur de *lfgN*, car ce pic (par rapport à son temps rétention et spectre UV) est retrouvé dans les fractions E8 et E9 qui n'induisent pas *lfgN*. Une situation similaire est observée dans le cas de la fraction E7 qui contient les même composés que la fraction E6 sauf un (E7A=E6A=ET_R, E7B=E6B=ET_S, E7C=E6D=ET_Z et E6C est absent). La fraction E7 contient également le composé ET_V (confirmé par leur spectre UV). Celui-ci n'est pas majoritaire dans la fraction E7 à la différence de la fraction E6, il est également présent dans les fractions E8 et E9 actives sur *lfaA*.

La fraction E8, qui est active dans le test biologique avec *lfaA*, contient les deux composés E8A et E8B. De la même façon, la fraction E9 qui induit le gène *lfaA* présente les deux pics majoritaires dans la fraction E8, ainsi les composés E9A et E9B sont identiques à E8A et E8B. Ceci est démontré par les spectres UV et les temps de rétention identiques (Figure 33b, c). La séparation de ces deux composés, puis leur résultat individuel au test biologique pourront indiquer si l'un de ces composés correspond réellement à un inducteur de *lfaA*.

III-7 Comparaison de composés présents dans les deux extraits de plantes

Suite aux analyses des composés présents dans chaque extrait, pomme de terre et endive, il était intéressant de comparer entre eux les extraits des deux plantes utilisées. Au moins trois composés semblent identiques si l'on considère leurs spectres UV. Le spectre UV de la molécule P12B (PT_M) provenant de pomme de terre (Figure 32b) montre un épaulement caractéristique qui est retrouvé dans les spectres UV des composés provenant de l'extrait d'endive E6D et E7C (ET_Z) (Figure 33d et e). Une situation similaire est observée pour le composé de pomme de terre P12A (PT_K) (Figure 32b) qui présente des homologues dans les fractions de l'extrait d'endive E6B et E7B (ET_S) (Figures 33e, d, a). De même, le composé de pomme de terre P8A (PT_L) (Figure 32c) est semblable à E8A (ET_V) de l'extrait d'endive (Figure 33c, a).

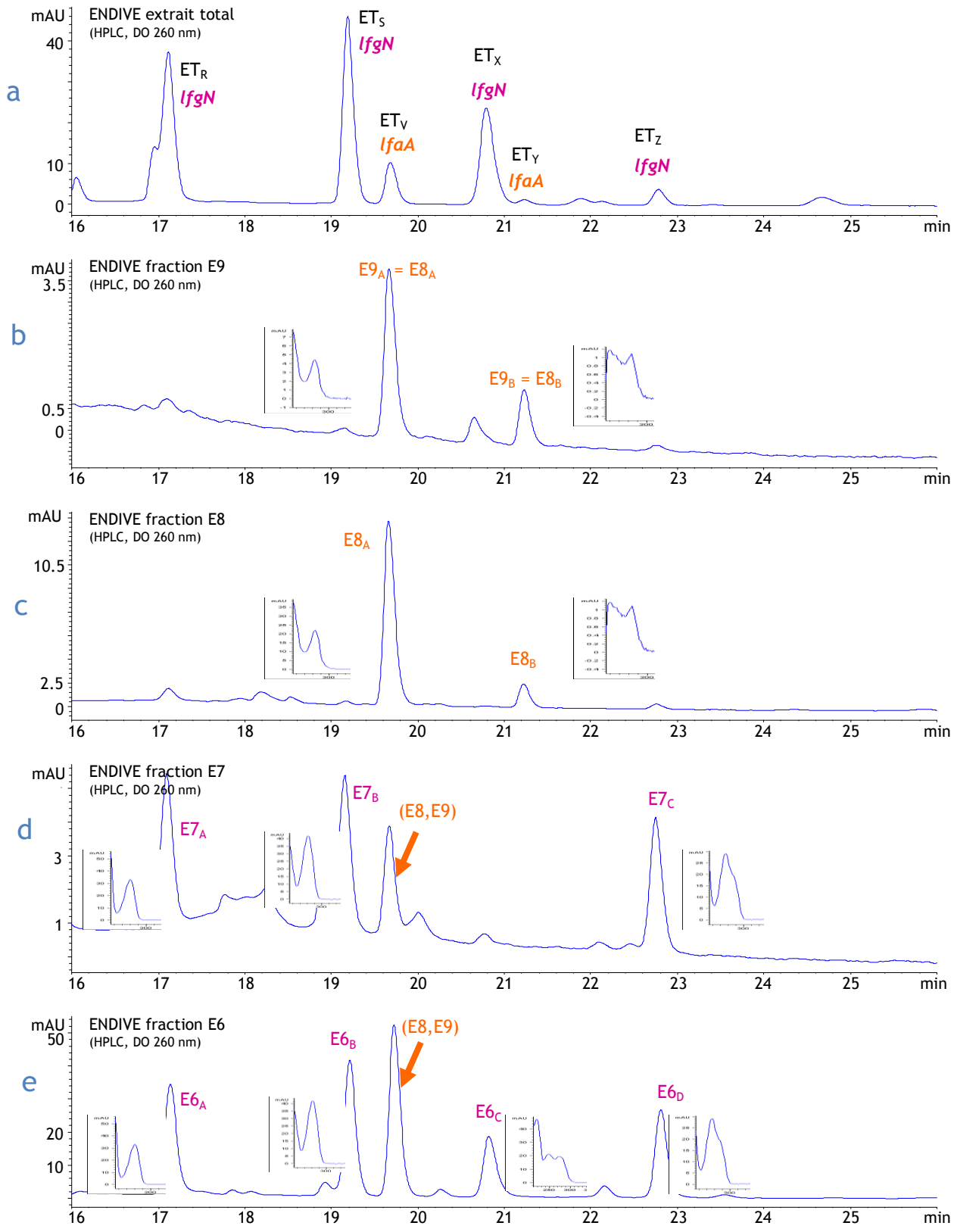


FIGURE 33 : Analyse HPLC de l'extrait total et de fractions actives obtenues à partir de l'extrait d'endive

Les composés sont détectés à 260 nm. Les pics observés dans les fractions actives E6, E7, E8 et E9 (e, d, c et b) sont retrouvés dans l'extrait total (a) (mêmes temps de rétention et spectres UV). Les fractions E8 (c) et E9 (b) induisent *lfaA*, et elles contiennent deux composés majeurs identiques. Les fractions E6 (e) et E7 (d) n'induisent que la fusion *lfgN*. Le composé majeur de E6 et E7 (flèches orange) ne peut pas être l'inducteur de *lfgN* car il est présent dans les fractions E8 et E9 qui n'induisent que *lfaA*.

IV. Identification de molécules purifiées

Pour les composés purs et potentiellement actifs, la structure est déterminée par analyse par Spectrométrie de Masse (SM) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Parmi toutes les fractions actives de pommes de terre (P6, P7, P8, P12) et d'endives (E6, E7, E8, E9), la purification a continué à partir de la fraction P12 de pomme de terre active sur la fusion *lfaA*. Cette fraction contient deux composés majeurs P12A et P12B qui absorbent très fortement à 260 nm. L'inducteur pourrait être un de ces deux composés, ou l'association des deux. La quantité de la fraction P12 est assez faible. Elle contient seulement 12 mg de matière sèche. Cette quantité pouvait suffire pour identifier les deux composés majeurs. Ceux-ci ont été séparés par HPLC semi-préparative (Figure 34). Le composé P12B a été récupéré pratiquement pur dans une fraction de 3,2 mg. 1 mg a été utilisé pour la détermination de la masse moléculaire en LC-MS. La masse moléculaire de ce composé est de 283 g (Figure 35). Le reste de la fraction contenant le composé P12B a été traité par RMN (Figure 36). Ces analyses RMN ont permis d'identifier le composé P12B comme étant la guanosine (Figure 37). Ceci a été confirmé par co-chromatographie avec la guanosine pure d'origine commerciale (Figure 38). Ces co-chromatographies ont également confirmé que la guanosine est le composé majeur dans la fraction active P12. Cependant, les résultats négatifs aux tests biologiques montrent que P12B n'est pas l'inducteur de *lfaA*. La fraction contenant le composé P12A a ensuite été récupérée à partir de la chromatographie semi-préparative. L'analyse LC-MS montre que la masse moléculaire de P12A est 358 g (Figure 39). La quantité de la matière sèche inférieure à 1 mg est insuffisante pour réaliser l'analyse RMN qui permettrait la détermination de la structure de la molécule P12A. Cependant, l'analyse biologique a confirmée son activité sur la fusion *lfaA*.

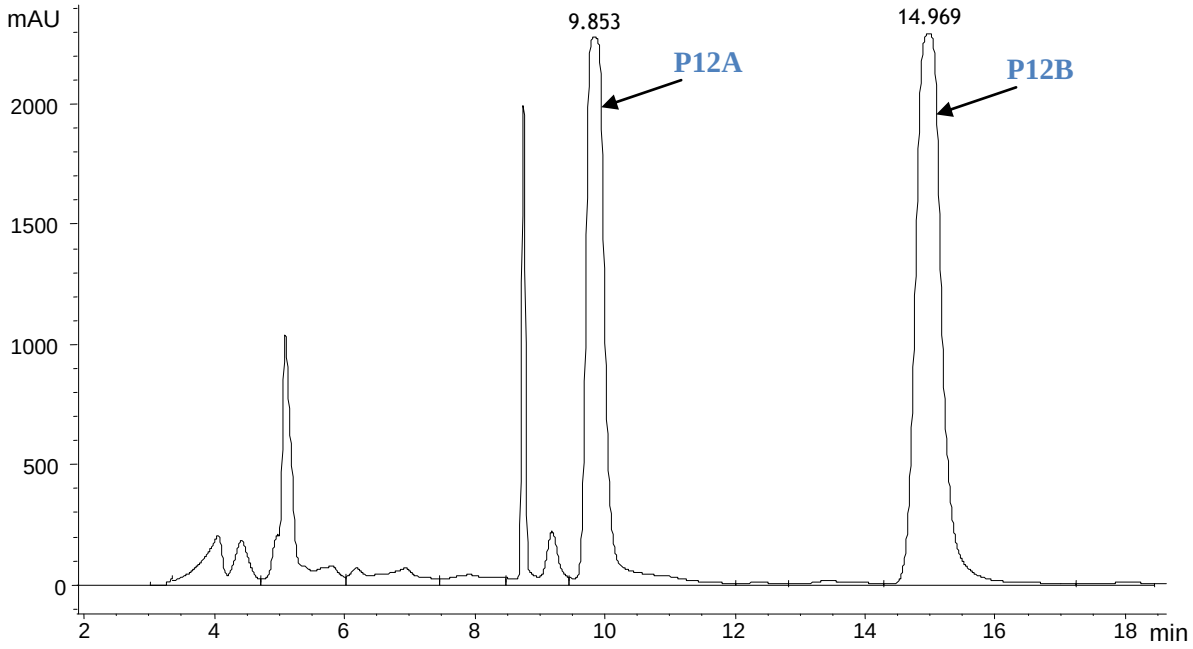


FIGURE 34 : Séparation de molécule P12A et P12B en HPLC semi-préparative
La séparation a été effectuée sur la colonne Nucleodur Carbone 18 avec de l'acétonitrile 5% comme solvant. La concentration de la fraction P12 est de 10 mg/mL et le volume d'injection est de 100 µL.

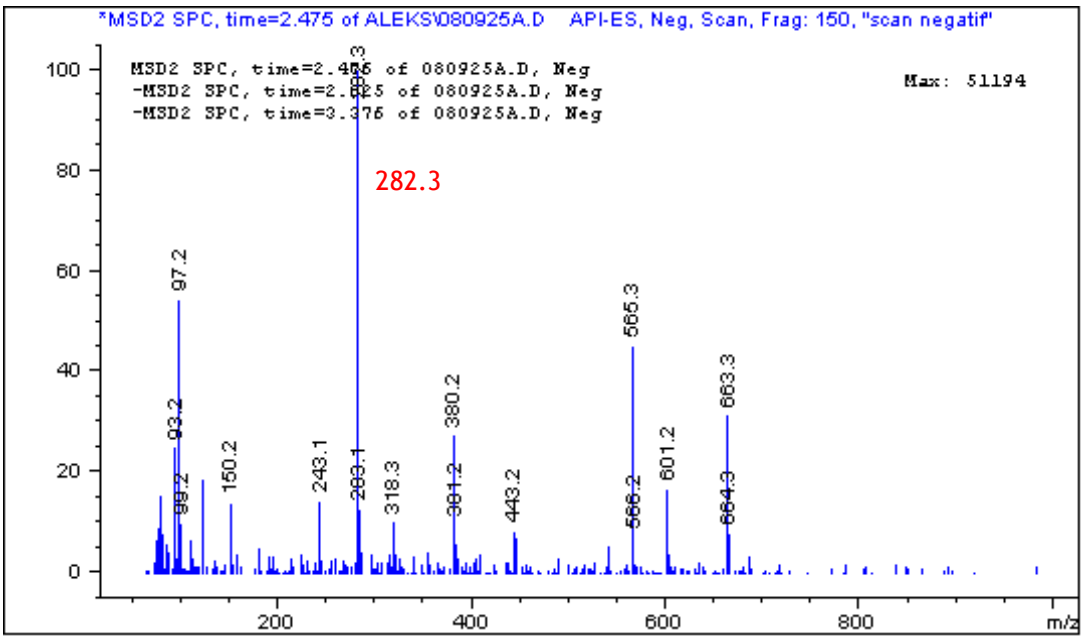
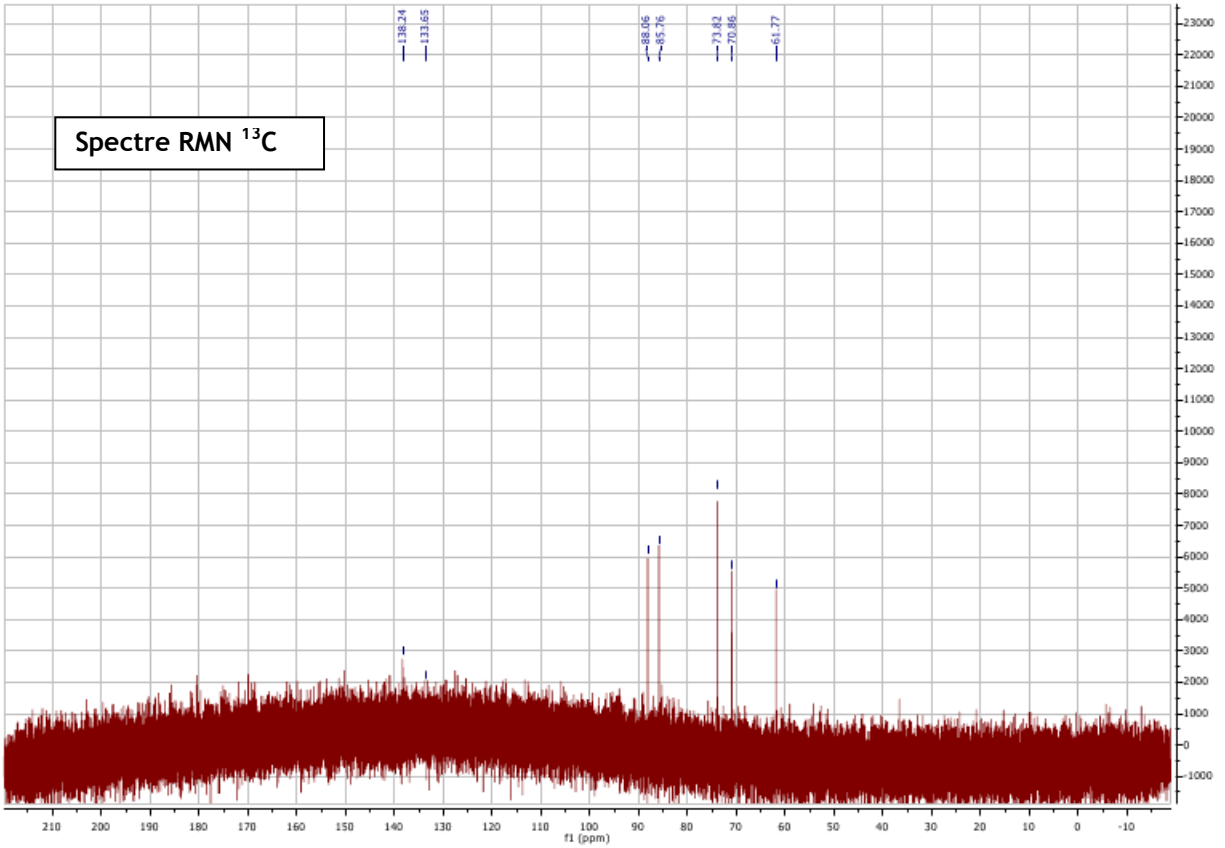
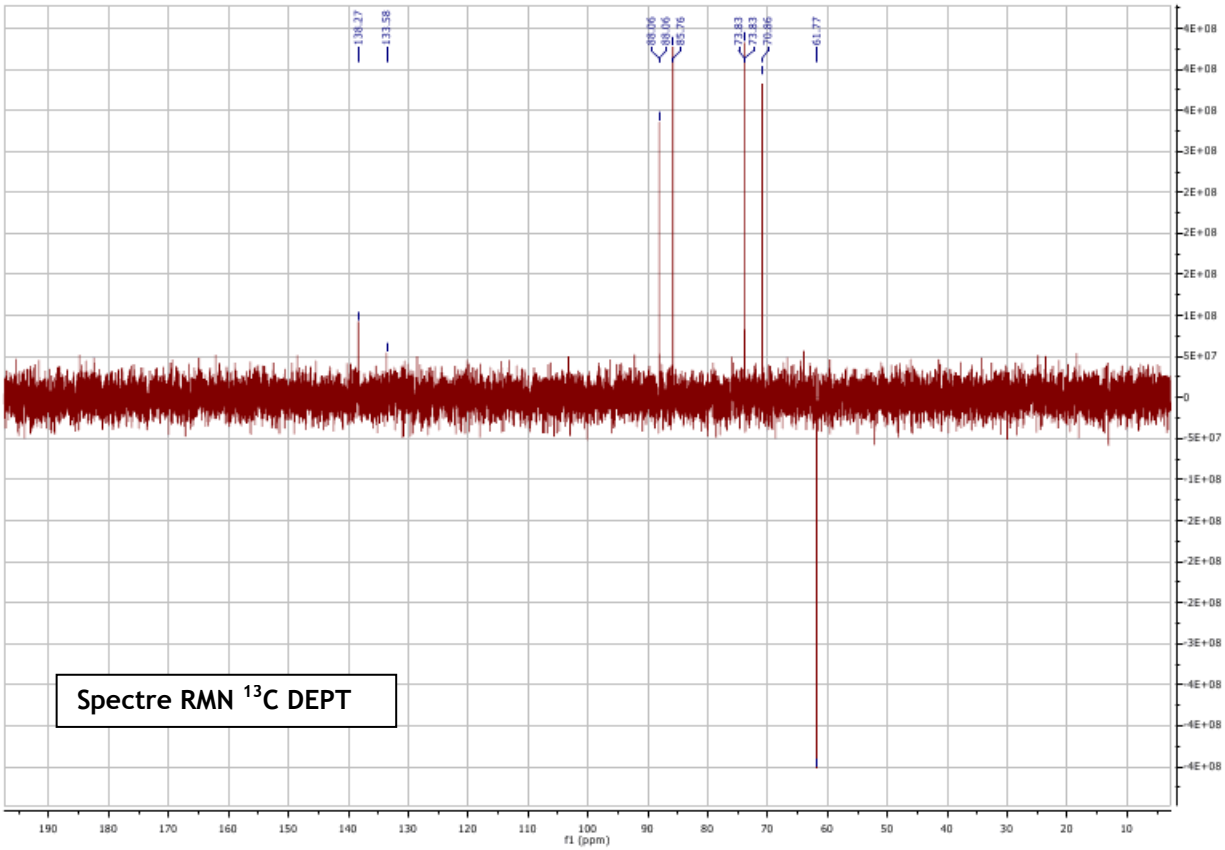
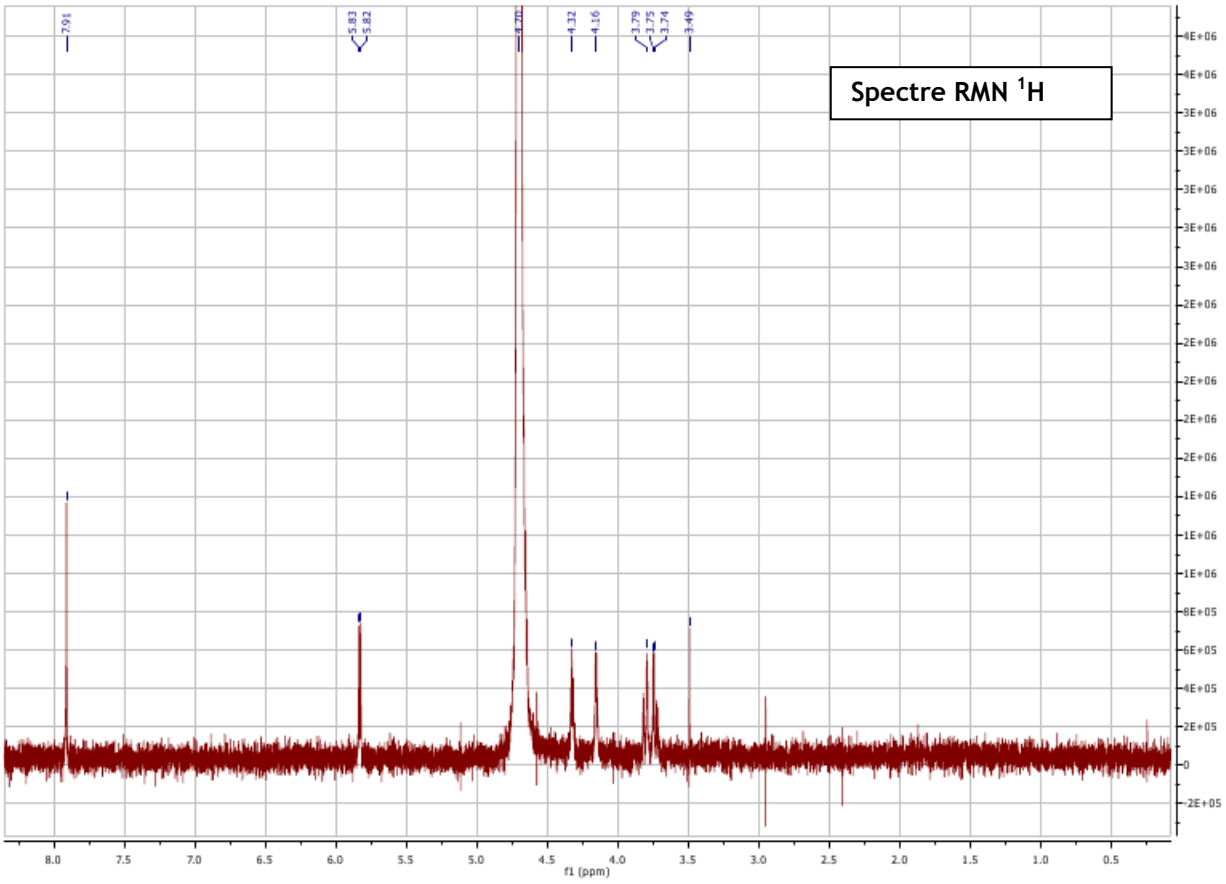
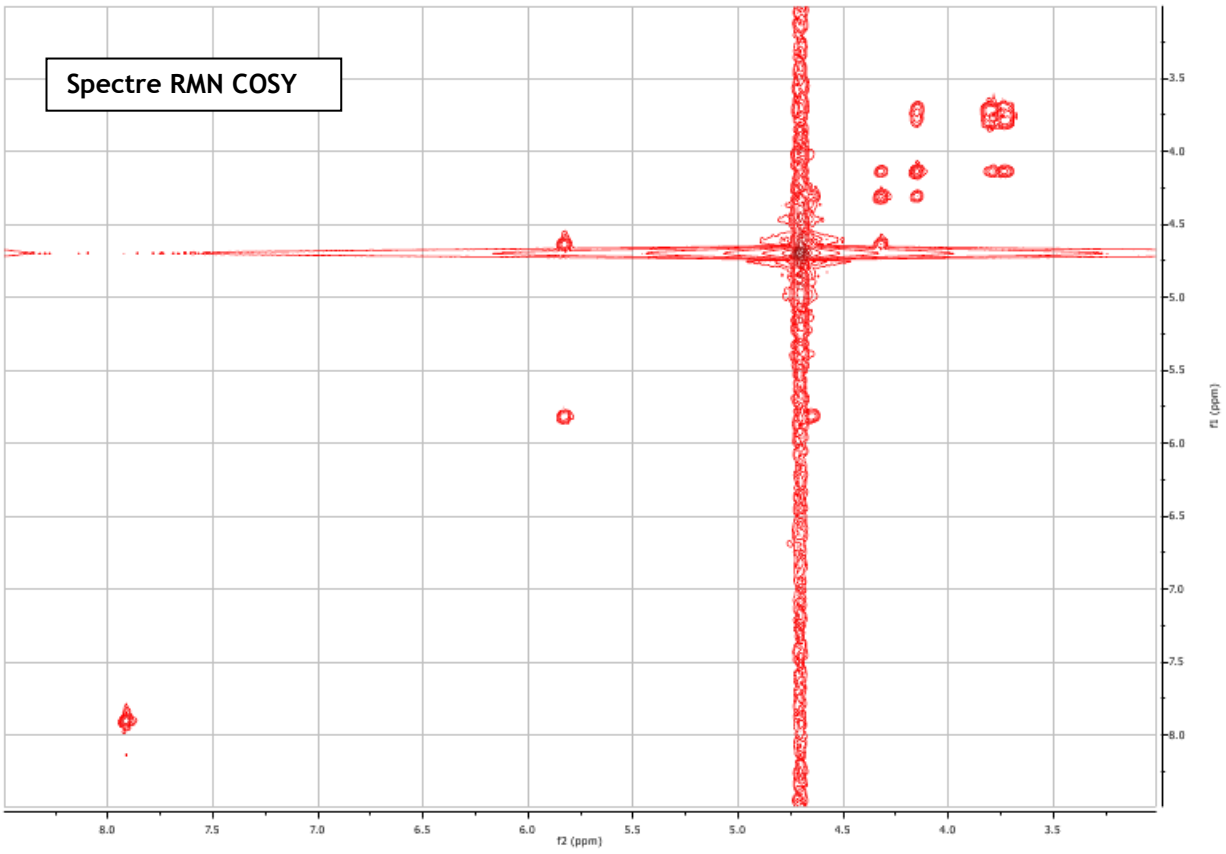


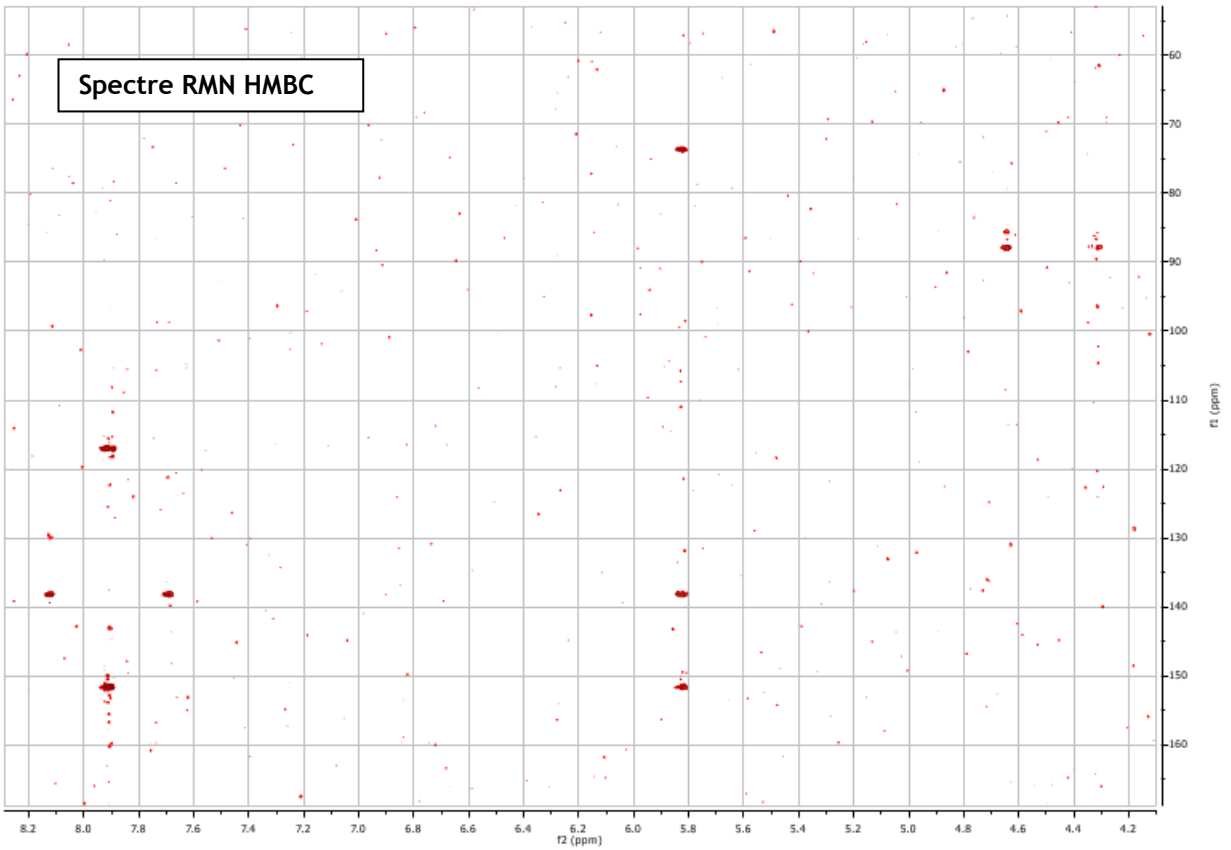
FIGURE 35 : Spectre de masse pour le composé P12B
La masse exacte de composé P12B est calculée sur la base suivante m/z 282 $[M-H]^-$ => M=283 g, en sachant que en mode négatif il faut rajouter 1 proton.


Spectre RMN ^{13}C
138.24
133.65
88.06
85.76
73.42
70.86
61.77
f1 (ppm)


Spectre RMN ^{13}C DEPT
138.27
131.58
88.06
88.06
85.76
73.83
73.83
70.866
61.77
f1 (ppm)


Spectre RMN ¹H
7.91
5.83
5.82
4.32
4.16
3.79
3.75
3.74
3.49
f1 (ppm)


Spectre RMN COSY
f2 (ppm)
f1 (ppm)



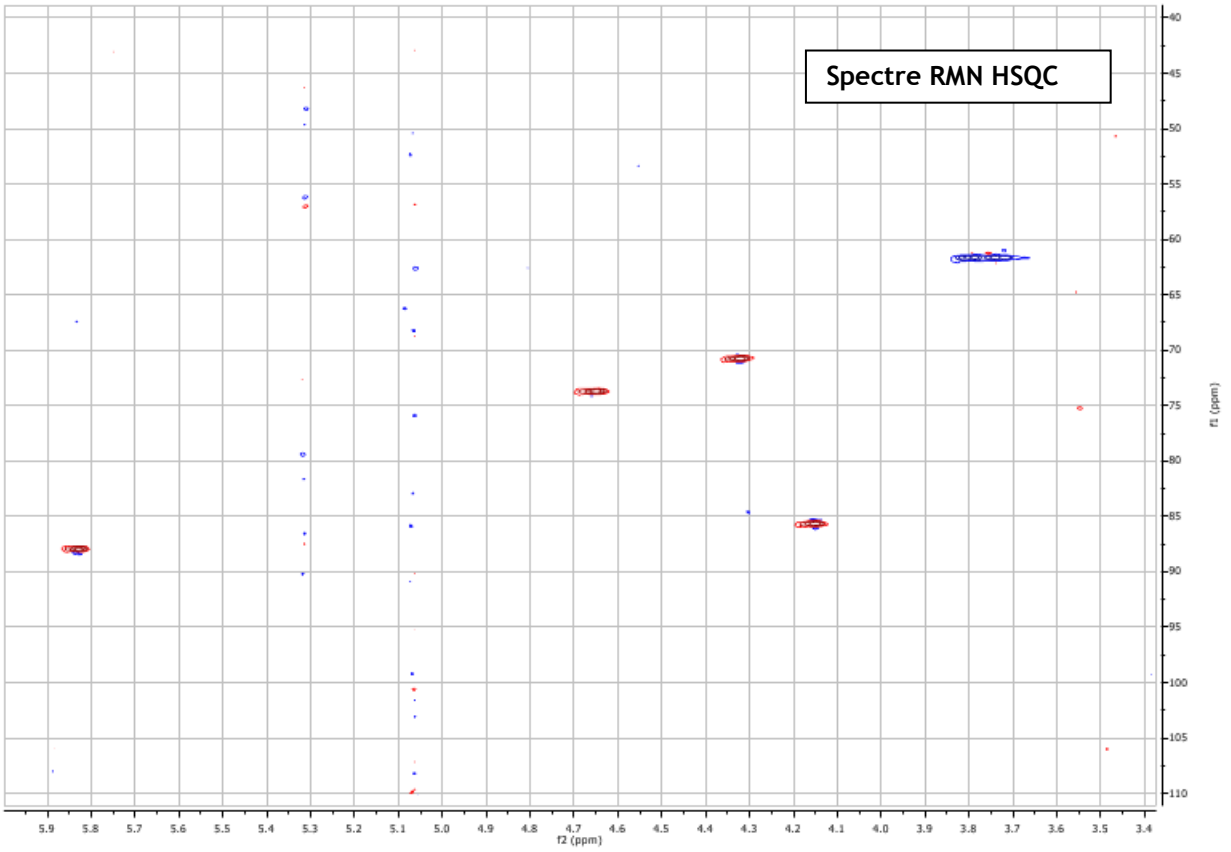
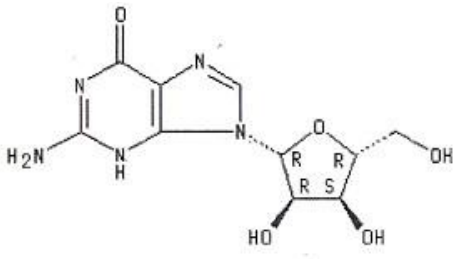
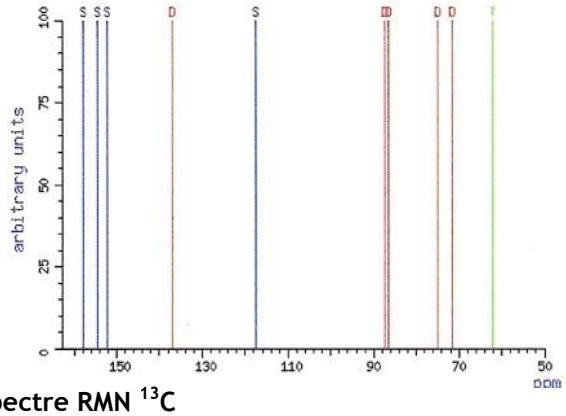


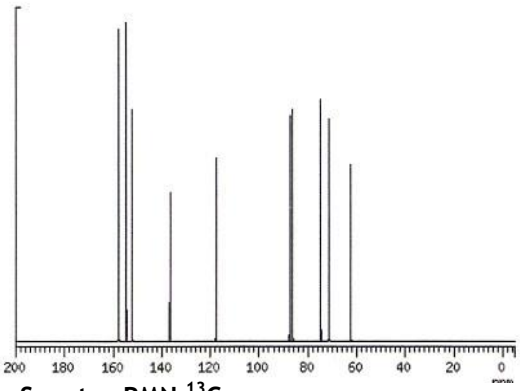
FIGURE 36 : Analyse RMN du composé P12B
Cette analyse confirme que composé P12B est bien la guanosine.

GUANOSINE
$C_{10}\ H_{13}\ N_5\ O_5$

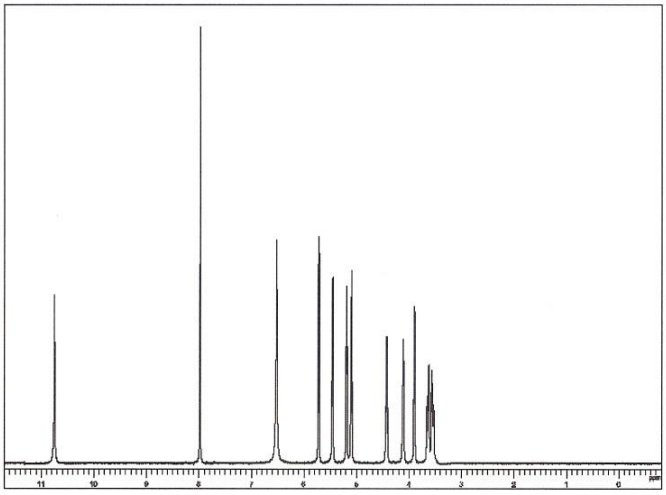




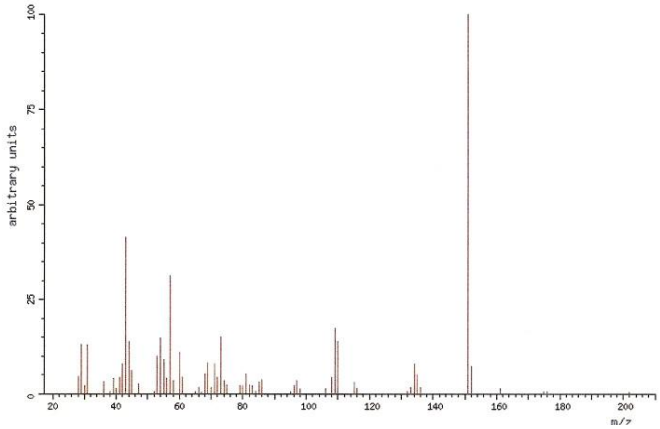
Spectre RMN ^{13}C
Fréquence : 270 MHz
Solvant : Diméthyle sulfoxide
Source : Wiley Subscription Service, Inc. (USA)



Spectre RMN ^{13}C
Fréquence : 25 MHz
Solvant : Diméthyle sulfoxide-d6
Source : National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan)



Spectre RMN ^{1}H
Fréquence : 400 MHz
Solvant : Diméthyle sulfoxide-d6
Standard : Tetramethylsilane
Source : National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan)



Spectre de masse
Masse nominale : 283 g
Source : Wiley Subscription Services, Inc. (USA)

FIGURE 37 : Structure de la guanosine et spectres en RMN proton et carbone-13, et LC-MS (SciFinder, American Chamical Society)

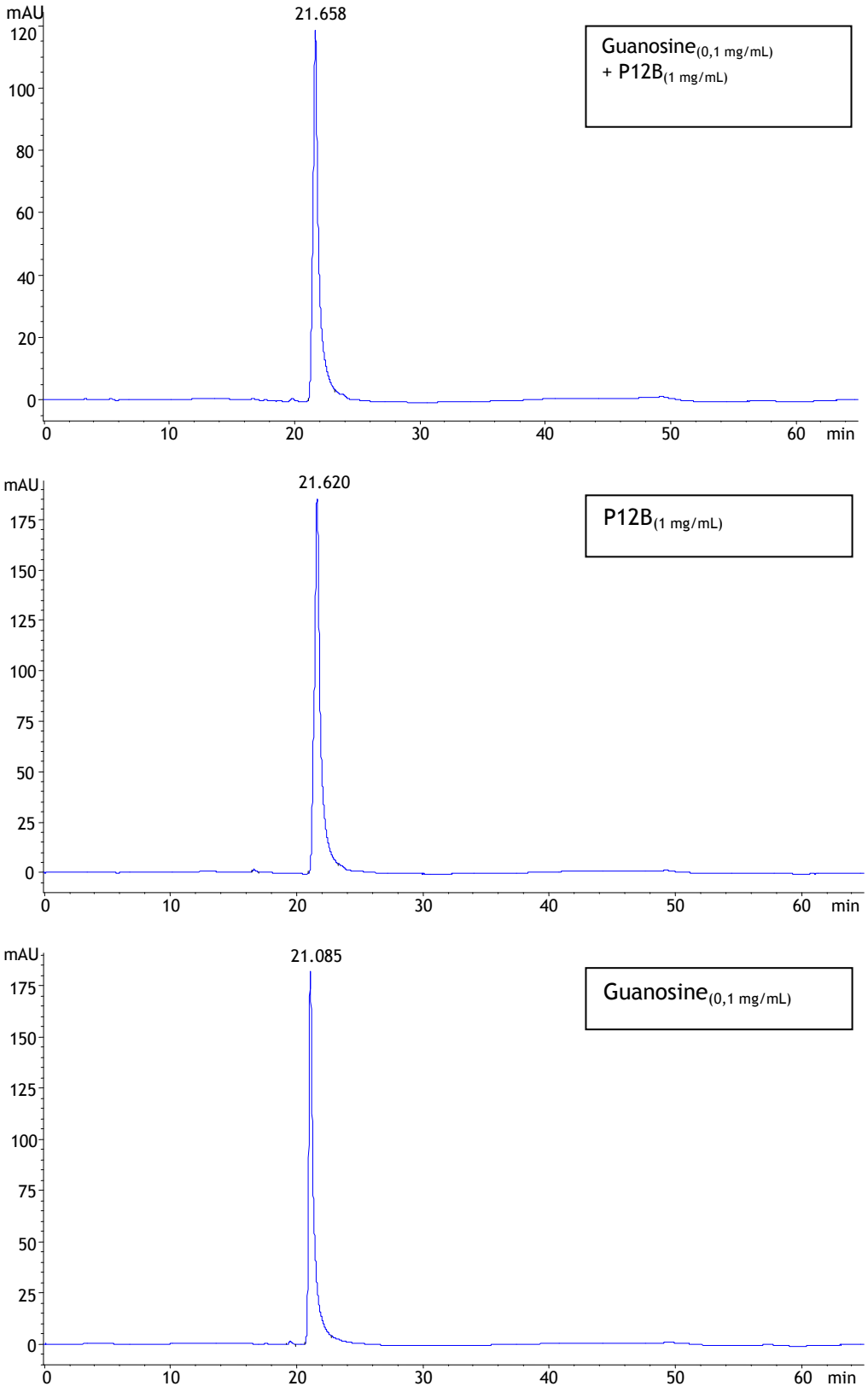


FIGURE 38 : Co-chromatographie de la guanosine commerciale et du composé P12B identifié comme étant la guanosine

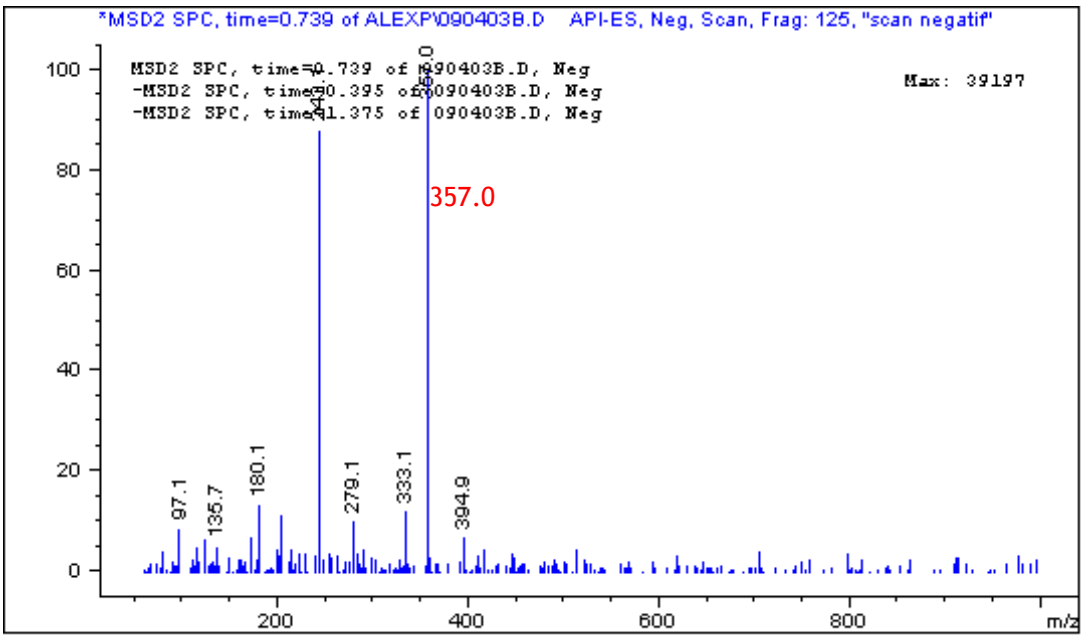


FIGURE 39 : Spectre de masse du composé P12A

La masse exacte de composé P12A est calculée sur la base suivante m/z 357 $[M-H]^-$ => M=358 g, en sachant que en mode négatif il faut rajouter 1 proton.

Discussion

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude des signaux impliqués dans la virulence bactérienne et dans l'interaction bactéries-hôtes. Les thématiques de recherche abordées portent sur l'identification de « petites molécules » impliquées dans les interactions biologiques : métabolites secondaires et phytoconstituants jouant un rôle dans les phénomènes de communication et les interactions plantes-microorganismes.

Erwinia chrysanthemi est un bon modèle pour l'étude des fonctions impliquées dans l'interaction plantes-bactéries. Cette entérobactérie phytopathogène ne présente pas de spécificité d'hôte et est responsable de pourritures sur de nombreux végétaux tels que la pomme de terre, l'endive, le chrysanthème et le saintpaulia (Perombelon, 2002). L'importance des pertes économiques engendrées par ces bactéries varie en fonction des conditions climatiques, ainsi que des méthodes de culture et de conservation des végétaux. Les infections par *E. chrysanthemi* qui se manifestaient autrefois essentiellement dans les régions tropicales sont maintenant en nette progression dans les pays tempérés. La macération des tissus végétaux résulte de la production par la bactérie d'un arsenal d'enzymes lytiques agissant sur la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales par attaque des principaux polysaccharides pariétaux (pectine, cellulose, hémicellulose). La dégradation de la pectine par *E. chrysanthemi* est le déterminant majeur des symptômes observés (Robert-Baudouy *et al.,* 2000). La forte multiplication des bactéries dans la plante implique qu'elles sont capables d'assimiler de nombreux nutriments nécessaires, au dépend des végétaux, et de résister aux réactions de défense des plantes. La virulence bactérienne est donc multifactorielle et dépend d'une succession d'évènements. L'expression coordonnée des facteurs de virulence nécessite la reconnaissance de signaux moléculaires ou de conditions spécifiques de la plante. L'ajustement du métabolisme bactérien dépend d'un réseau de régulation complexe qui intègre ces signaux (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.,* 1996).

A l'heure actuelle, l'étude des interactions biotiques se fait par des approches complémentaires mais aussi de plus en plus de manière intégrée, sur la base de méthodes globales de génomique, de protéomique mais également de métabolomique (Bino *et al.,* 2004). Concernant ce dernier aspect, le métabolisme primaire ou secondaire des végétaux ou des microorganismes n'est plus seulement considéré comme une source de molécules. Il est de plus en plus utilisé comme un outil puissant de visualisation phénotypique d'une interaction ou d'un stress, qu'il soit biotique ou abiotique (Wang *et al.,* 2006c). Chez les

végétaux, le métabolome semble constituer le principal moyen de communication entre la plante et son environnement. Pourtant, le fait d'aborder l'étude des interactions plantes-microorganismes par la prise en compte des métabolites végétaux est relativement récent. Bien que le dialogue entre la plante et les microorganismes soit considéré comme essentiel dans les associations symbiotiques ou pathogènes, les métabolites utilisés comme signaux moléculaires sont souvent mal connus. Il devient donc particulièrement intéressant de développer des approches à l'interface de différentes disciplines telles que la génétique, la microbiologie, l'écologie, la phytochimie et la chimie analytique pour pouvoir prendre en compte le phénomène de l'interaction dans sa globalité, c'est-à-dire à travers un écosystème complexe impliquant des molécules de communication.

L'obtention récente de la séquence entière du génome d'*E. chrysanthemi* (Glassner *et al.*, en préparation) ouvre à une analyse globale de ses capacités biologiques et, en particulier, des fonctions liées à sa virulence envers les plantes. Dans une approche de génomique fonctionnelle, une dizaine de régions du génome d' *E. chrysanthemi* ont été identifiées sur la base du regroupement de gènes typiques de voies métaboliques (enzymes, transporteurs, régulateurs) dont la fonction est totalement inconnue mais qui sont retrouvés uniquement chez des bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium, Pseudomonas, Ralstonia, Frankia, Xanthomonas*…) ou associées aux plantes (*Rhizobium*…). Une étude systématique de telles régions incluant un régulateur de la famille LacI (Van Gijsegem *et al.,* 2008) a conduit à identifier les deux régions, désignées par *lfa* et *lfg*, exprimées en réponse à une/des molécule(s) végétale(s).

Description des régions *lfa* et *lfg*. L'analyse des deux régions d'intérêt (*lfaATR* et *lfgBONAEMR*) a été réalisée grâce à la construction de fusions avec un gène rapporteur. Les gènes de structure de ces régions sont induits lors de l'infection de plantes mais également en présence d'extraits végétaux bruts, démontrant que les inducteurs sont des composés solubles présents dans la plante. La région *lfg* est conservée dans les génomes de trois autres bactéries associées aux plantes : *Erwinia carotovora* (Bell *et al.,* 2004), *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner *et al.,* 2001) et *Rhizobium etli* (Gonzales *et al.,* 2006), mais son rôle n'a pas été étudié. La région *lfa* est conservée chez quelques entérobactéries dont *Yersinia pestis* (Chain *et al.,* 2006) et des souches pathogènes d'*Escherichia coli* (Chouikha *et al.,* 2006). Chez ces dernières, il est situé dans un îlot de pathogénie qui a été récemment étudié et semble impliqué dans l'assimilation de sucres et la virulence envers les poulets (Chouikha *et al.,* 2006).

Les études effectuées sur les fusions *lfaA* et *lfgN* confirment qu'il y a une induction nette par différents extraits végétaux, soit des jus bruts crus obtenus par broyage et centrifugation, soit des extraits aqueux obtenus par chauffage. Les extraits actifs peuvent provenir de différents végétaux sensibles à *E. chrysanthemi* : chrysanthème, endive, pomme de terre, saint paulia... Ces résultats nous ont conduits à envisager d'isoler les molécules actives à partir d'un de ces types d'extraits, de préférence à partir d'endive ou de pomme de terre, légumes facilement disponibles dans le commerce en toute saison.

Analyse de mutants dans les régions *lfa* et *lfg*. Des mutants ont été construits par insertion de cassette Cm pour inactiver les gènes des régulateurs *lfaR* et *lfgR* et par insertion de cassettes *uidA*-Kan pour obtenir des fusions dans les gènes *lfaT, lfaA, lfgB* et *lfgN* avec comme rapporteur l'activité β-glucuronidase. Les fusions *lfaA* et *lfaT* sont peu exprimées en absence d'extrait de plantes. La fusion *lfaA* est induite en présence d'extrait, alors que la fusion *lfaT* ne l'est pas. LfaT étant un transporteur membranaire, cela suggère que son inactivation provoque une absence de transport de l'inducteur de la région *lfa*. L'effet du régulateur LfaR a été testé sur ces fusions. Lorsque le régulateur LfaR est inactivé, les fusions *lfaA* et *lfaT* montrent une expression dérégulée très forte, même en absence d'inducteur. Le régulateur LfaR exerce donc un effet de répression sur *lfaA* et *lfaT*. De plus, l'absence d'induction de la fusion *lfaA* lorsque *lfaR* est inactivé, suggère fortement que le régulateur LfaR est responsable de la réponse à l'inducteur de *lfaA* présent dans l'extrait de plante.

La fusion *lfgN* est également induite en présence d'extraits de plante alors que le transporteur *lfgB* est peu, ou pas, induit par cet extrait. LfgB pourrait donc transporter l'inducteur de la région *lfg*. L'augmentation d'expression des fusions *lfgN* et *lfgB* lorsque LfgR est inactivé indique que LfgR agit comme répresseur de ces gènes. Le régulateur LfgR est probablement responsable de l'induction de *lfgN* en présence d'extrait de plante car son inactivation provoque une absence de réponse à la présence d'extrait de plante.

L'effet d'extraits provenant de différentes plantes : endive, chrysanthème, pommes de terre et saint paulia, a été évalué sur les fusions *lfaA* et *lfgN*. Tous les extraits testés sont inducteurs de la fusion *lfaA*. Par contre, ces extraits n'ont pas tous un effet sur la fusion *lfgN*. Les extraits de pomme de terre et de saint paulia ne déclenchent pas d'induction significative. Ces premières données suggèrent que ce ne sont pas les mêmes molécules qui agissent pour l'induction des deux fusions *lfaA* et *lfgN*.

L'effet de différents extraits, crus ou chauffés, a été comparé sur les fusions *lfaA* et *lfgN*. Les extraits crus sont toujours plus efficaces que les extraits chauffés car l'induction est obtenue à plus basse concentration. L'extrait a été chauffé par autoclavage, ce qui correspond à une montée progressive en température (une activité enzymatique reste possible lors de cette montée). Pour la fusion *lfaA*, une forte induction est obtenue à partir de 0,25% d'extrait cru et de 2% d'extrait chauffé. La fusion *lfgN* est bien induite par des concentrations d'extrait cru supérieures à 1% et d'extrait chauffé supérieures à 8%. Il faut donc une concentration plus forte d'extrait pour l'induction de *lfgN* que pour celle de *lfaA*. Cette étude montre que tous les extraits deviennent inducteurs de la fusion *lfgN* s'ils sont utilisés à une concentration suffisante. Les molécules inductrices des régions *lfa* ou *lfg* pourraient donc être identiques ou très proches si les régulateurs LfaR et LfgR avaient une affinité différente pour ces molécules.

L'analyse des différents mutants et de l'expression des fusions en présence de plusieurs extraits de plantes a permis de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes *lfa* et *lfg*. Dans le cas du système *lfa* (Figure 40), en absence de plante, donc d'inducteur, la protéine régulatrice LfaR se fixe sur le promoteur de *lfaT* afin d'empêcher l'expression de l'opéron lfaTA. C'est un cas typique de répression de la transcription. En présence de plante, l'inducteur végétal est transporté par la protéine LfaT dans le cytoplasme où il est reconnu par le régulateur LfaR. Cette molécule se fixe sur le régulateur LfaR, provoquant un changement de la conformation du régulateur qui perd sa propriété de se fixer sur le promoteur. L'expression des gènes *lfa* devient alors possible. Il n'y a plus de répression grâce à la présence de l'inducteur, c'est un cas classique d'induction.

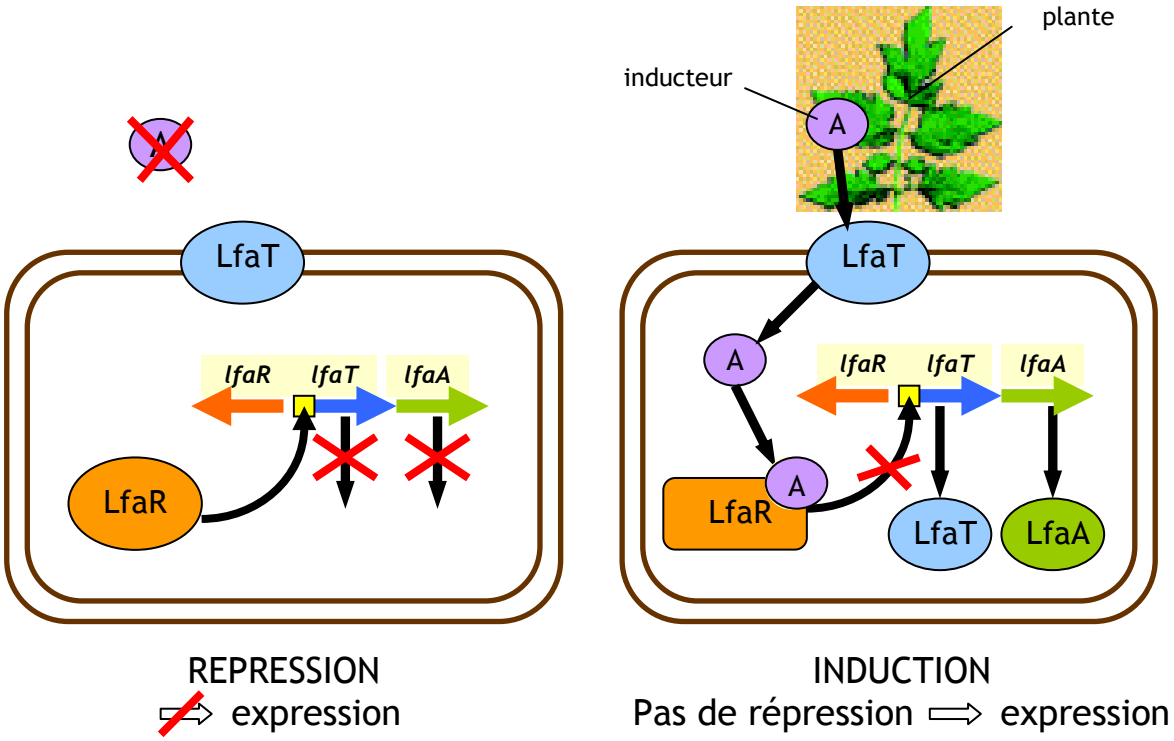


FIGURE 40 : Modèle de fonctionnement du système *lfa*
A - inducteur végétal,
LfaR - répresseur opéron lfaTA,
LfaT - transporteur de l'inducteur,
LfaA - enzyme de la famille GH31.

Le fonctionnement du système *lfg* est voisin de celui proposé pour *lfa* mais un peu plus complexe. Le transport de l'inducteur de *lfg* se fait par un mécanisme de type ABC qui implique une protéine affine périplasmique LfgB et un couplage énergétique au niveau de la membrane interne grâce à l'ATPase LfgA. Les transporteurs ABC sont généralement utilisés pour l'entrée de molécules présentes à faible concentration dans l'environnement bactérien car ils présentent de plus fortes affinités et spécificités que les transporteurs de la large famille MSF. L'inducteur de la région *lfg* pourrait donc être présent dans les plantes à une concentration inférieure à celui de la région *lfa*. Ceci est cohérent avec le résultat expérimental indiquant qu'il faut une plus grande quantité d'extrait de plante pour induire la fusion *lfgN* que pour la fusion *lfaA*.

Autres conditions affectant l'expression des gènes *lfa* et *lfg*. L'environnement est un facteur qui influence l'expression de la majorité des gènes bactériens. Ainsi diverses conditions environnementales affectent l'expression des fusions *lfaA* et *lfgN*. L'extrait de levure est responsable de l'induction de la fusion *lfaA*, il agit presque aussi efficacement que l'extrait d'endive, ceci est probablement du à la présence de composés chimiques similaires dans la plante et la levure. La fusion *lfgN* n'est pas affectée par l'extrait de levure, ce qui

indique une plus forte spécificité pour un composé végétal et confirme la distinction entre inducteurs de *lfa* et *lfg*.

L'induction pour les deux gènes *lfaA* et *lfgN* commence en fin de phase exponentielle de la croissance bactérienne, un peu plus tardivement pour *lfgN* que pour *lfaA*. La température optimale de l'expression des gènes *lfaA* et *lfgN* (environ 27°C) est légèrement inférieure à la température optimale de croissance d'*E. chrysanthemi* (30°C). L'ajout de glucose ainsi qu'une forte osmolarité provoquent une répression de l'induction de la fusion *lfgN*. Ces influences des conditions environnementales sont probablement dépendantes de régulateurs globaux de la transcription.

Effet d'autres régulateurs de la virulence. Lorsque les conditions environnementales varient, des différences d'expression des fusions sont observées même quand le régulateur voisin LfaR ou LfgR, est inactivé. Cela suggère que les gènes *lfa* et *lfg* sont modulés par d'autres régulateurs secondaires. L'expression des fonctions de virulence d'*E. chrysanthemi* est contrôlée par Crp (activateur global du catabolisme carboné) ou par les régulateurs KdgR, PecS, ExpR ou PecT qui jouent un rôle de répresseur. L'inactivation des gènes *pecS, kdgR*, *pecT* et *expR* montre que les régulateurs de diverses fonctions de virulence PecS, KdgR, PecT et ExpR n'affectent pas le niveau de base et/ou l'induction par des extraits de plante des fusions *lfaA* et *lfgN*. Les régulateurs secondaires qui agissent sur l'expression des régions *lfa* et *lfg* restent donc à identifier.

Mise au point d'un test biologique. L'induction des gènes d'intérêt *lfaA* et *lfgN* est provoquée par des extraits provenant de diverses plantes. Les endives et les pommes de terre ont été choisies en raison de leur disponibilité dans le commerce en toute saison et de la présence moindre de contaminants chimiques. En effet, contrairement aux plantes ornementales comme les chrysanthèmes et les saint paulia qui sont très exposés aux traitements chimiques, les plantes à usage alimentaire ne sont pas traitées dans les semaines précédents leur récolte. La peau et la chair de pomme de terre n'ont pas la même composition chimique mais induisent les gènes d'intérêt sans différence significative. Ces premières études ont conduit à se focaliser sur l'extrait de chair de pomme de terre qui peut être obtenu facilement et en grande quantité.

Afin d'effectuer un grand nombre de tests d'induction, il était nécessaire de mettre au point un crible reproductible et rapide à moyen débit, compatible avec un fractionnement bio-guidé. Cette mise au point nous a permis d'augmenter les capacités en nombre d'échantillons

qui peuvent être traités simultanément, tout en diminuant la quantité de réactifs et d'échantillons utilisés. Les extraits crus d'endive et de pomme de terre servent de témoins positifs du phénomène d'induction des fusions dans les deux gènes d'intérêt, *lfaA* et *lfgN*. Les conditions adaptées à l'induction en microplaque sont assez semblables pour les fusions *lfaA* et *lfgN* sauf que la quantité d'extrait de plante doit être 5 fois supérieure pour obtenir une induction nette de *lfgN*. Suite à la mise au point des conditions d'induction en microplaque, les tests biologiques ont été réalisés avec divers composés commercialisés appartenant à différentes classes chimiques (sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides, aminoacides, bases nucléiques et divers métabolites secondaires végétaux). Aucun effet d'induction significatif n'a été observé après addition de l'un de ces composés commercialisés.

Fractionnement d'extraits végétaux. L'approche choisie pour la purification des inducteurs impliquait un couplage de méthodes de fractionnement avec l'analyse de l'activité des fractions obtenues grâce au test biologique d'induction. Ces expériences ont débuté avec des extraits d'endives et de chair de pommes de terre. Après fractionnement en fonction de la polarité des composés (SPE), les échantillons provenant des extraits d'endive et de pommes de terre ont été évalués pour l'induction de *lfaA* et *lfgN*. Les composants moins polaires extraits par le méthanol ne sont pas inducteurs. Des composants polaires solubles dans l'eau sont responsables de l'induction des fusions *lfaA* et *lfgN*. Mais l'induction était toujours plus faible après fractionnement SPE que dans le cas d'extraits de plantes non-fractionnés. Cette méthode n'a donc pas été employée par la suite.

Les extraits d'endives et de chair de pommes de terre ont été soumis à des chromatographies sur colonnes de Sephadex LH-20 et sur colonnes de Sephadex G-10, celles-ci ayant la capacité de trier des molécules de tailles inférieures à 1 000 Da et 700 Da, respectivement. Les profils HPLC de toutes les fractions récupérées ont été déterminés ainsi que les spectres UV des pics majeurs. Certains composés similaires sont retrouvés dans les deux types d'extraits, endive et pomme de terre, en considérant leur temps de rétention ainsi que leur spectre UV-visible. D'autres composés semblent spécifiques de la plante, ou du tissu, ayant servit à préparer l'extrait.

Quelques fractions sont actives sur les deux fusions *lfaA* et *lfgN* mais plusieurs ne sont actives que sur une fusion. Les fractions provenant de Pomme de terre et d'Endive ont été dénommées Pn et En, respectivement. Quelques fractions ont plus particulièrement retenu notre attention. Par rapport à l'extrait total de pomme de terre, la fraction P12 semble

contenir seulement deux composés, P12A et P12B. Cette fraction étant active pour l'induction de *lfaA,* P12A et P12B sont donc de bons candidats comme inducteurs potentiels de *lfaA.* De même, la fraction P8 qui induit *lfaA* contient deux composés largement majoritaires, P8A et P8B. La fraction P7 montre une activité inductrice à la fois pour *lfaA* et *lfgN*. Elle contient plusieurs composés dont un composé majeur P7A, qui pourrait être un inducteur potentiel de la fusion *lfgN*. La fusion *lfaA* serait induite soit par le composé P7A, soit par d'autres composés présents en plus faible quantité. Les composés potentiellement inducteurs présents dans ces fractions actives sont bien visibles sur le chromatogramme de l'extrait total de pomme de terre, l'identité entre les pics des fractions et ceux de l'extrait total étant confirmée par les spectres UV.

Une interprétation similaire peut être donnée pour les fractions obtenues à partie de l'extrait d'endive. A partir de celui-ci, on retrouve également des fractions qui induisent l'un des deux, ou les deux, gènes d'intérêt. La fraction E6 contient plusieurs composés qui peuvent correspondre à l'inducteur de la fusion *lfgN*. Cependant, le pic majeur ne peut pas être un inducteur de *lfgN* car ce pic (par rapport à son temps rétention) est retrouvé dans les fractions E8 et E9 qui n'induisent que *lfaA.*

En conclusion, les inducteurs sont des composés très polaires potentiellement reliés à la famille des phénols étant donné leurs caractéristiques spectrales. Les fractionnements réalisés prouvent la présence de plusieurs composés potentiellement inducteurs. Ils pourraient exister sous plusieurs formes, par exemple sous forme glycolyse et aglycone, deux formes qui co-existent fréquement dans les plantes.

Purification de molécules à partir des fractions inductrices. Grace à différentes techniques utilisées comme la chromatographie liquide semi-préparative sous haute pression, la co-chromatographie, la spectrométrie de masse et la RMN, la caractérisation des composés présents dans les fractions actives de pomme de terre et d'endive était possible. La fraction active provenant de pomme de terre P12 possède deux composés majeurs qui ont été purifiés. Ces méthodes d'analyse, en particulier la RMN ont montré que le pic majeur P12B correspond à la guanosine, un nucléoside. Cependant la guanosine n'est pas un inducteur de la fusion *lfaA*, comme cela a été montré par les tests biologiques avec le composé pur P12B ainsi qu'avec la guanosine commercialisée. La caractérisation du deuxième composé de la fraction P12, P12A, s'est arrêtée au niveau de sa masse moléculaire, la quantité n'était pas suffisante pour effectuer les analyses de RMN. L'inducteur peut donc être le composé P12A, car les tests biologiques confirment une activité envers la fusion *lfaA.* Les analyses co-

chromatographiques ont montré que les autres nucléosides tels que l'adénosine, le 2-désoxyadénosine, l'inosine et la xanthosine ne correspondent pas au composé P12A.

Il faut aussi noter que le composé P12A pur n'induit que faiblement le gène d'intérêt alors que la fraction P12 montre une forte activité. Il est également possible qu'une synergie existe entre les deux composés P12A et P12B. Le fait que l'on ne retrouve plus autant d'activité pour les composés purifiés que dans l'extrait de départ peut résulter de leur dégradation au cours du processus de fractionnement. Des changements de conformation ou de structure suite à des réactions chimiques ou physiques (luminosité, température, humidité) ont pu se produire au cours des fractionnements et purifications. Cela pourrait expliquer la faible activité du composé P12A par rapport à la forte activité de la fraction P12 entière. La faible activité du composé P12A doit aussi être relativisée par rapport à la caractéristique de l'extrait de départ qui présente le niveau maximum de l'effet biologique. Une dernière hypothèse est que, dans cette fraction, il existe d'autres composés mineurs ou dont l'absorbance est faible par rapport aux molécules P12A et P12B. Leur mise en évidence exigera de reprendre tous les protocoles de fractionnement en utilisant une quantité beaucoup plus importante d'extrait au départ.

Perspectives

L'effet inducteur qui était testé sur plusieurs plantes (feuilles d'endive, de saint paulia, de chrysanthème et tubercules de pommes de terre) semble montrer des variations entre ces extraits. Afin de vérifier si l'inducteur est présent chez toutes les plantes et dans tous les tissus, il serait intéressant de tester d'autres plantes modèles telles que arabidopsis, le riz, la vigne, mais aussi de comparer différentes parties d'une même plante, telles que feuilles, tiges, racines, graines... Il faudrait aussi vérifier si l'état physiologique des plantes est important, par exemple en comparant des plantes jeunes ou âgées, des plantes saines ou blessées. Il serait particulièrement intéressant de voir si la quantité de composés inducteurs varie lors des réactions de défense de la plante, après mise en contact de la plante avec *Erwinia* ou d'autres pathogènes.

Pour éviter toute métabolisation non contrôlée des inducteurs lors de la montée en température des extraits chauffés, il serait préférable de comparer l'effet inducteur après un choc thermique rapide, réalisé en plaçant un petit volume d'extrait dans un bain-marie bouillant. L'influence de la métabolisation par des enzymes végétales peut être testée en

incubant l'extrait à 40°C pendant quelques heures pour voir s'il y a modification de l'activité inductrice. L'effet de ces extraits chauffés à 40°C ou à 90°C pourra être comparé à celui de l'extrait de départ. Pour voir si des enzymes bactériennes modifient les composés inducteurs, un lysat *d'E. chrysanthemi* pourra également être ajouté à l'extrait brut.

Au niveau bactérien, il serait intéressant de comparer le transcriptome de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* en présence ou absence des inducteurs, et avec celui des mutants de régulation *lfaR* et *lfgR*, afin de connaître l'ensemble des cibles affectées par l'inducteur et les régulateurs.

Au niveau de la plante, la caractérisation des molécules inductrices permettrait de vérifier s'il existe des mutants affectés pour la biosynthèse des inducteurs dans la collection de mutants d'*Arabidopsis*. La sensibilité de ces plantes mutantes à l'infection par *E. chrysanthemi* ou d'autres pathogènes pourra alors être analysée. Ceci aiderait à comprendre le rôle de ces molécules dans l'interaction.

L'objectif principal de ce travail reste de purifier et de déterminer la structure de tous les composés actifs présents dans les extraits de plantes. Il semble en effet exister plusieurs molécules inductrices car plusieurs fractions sont actives au niveau du test biologique. Le type de variation entre ces molécules sera alors identifié, il peut s'agir de glycosylation ou de méthylation, comme dans d'autres cas de métabolites végétaux actifs. Avec les composés purifiés, il sera possible de réaliser une gamme de concentration pour les deux gènes d'intérêt *lfaA* et *lfgN*, afin de comparer les effets respectifs de ces molécules. Cela permettra de vérifier qu'il y a une différence entre les molécules inductrices des deux régions et de déterminer leur recouvrement potentiel. L'ensemble de ces travaux conduira à une meilleure connaissance des signaux impliqués dans l'interaction entre la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* et ses plantes hôtes.

Références bibliographiques

Alfano, J. R. et Collmer, A. 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. Plant Cell. 8: 1683-1698.

Ankenbauer, R. G. et Nester, E. W. 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes : structural specificity and activities of monosaccharides. J Bacteriol. 172: 6442-6446.

Ashby, A. M., Watson, M. D., Loake, G. J. et Shaw, C. H. 1988. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward *vir*-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. J Bacteriol. 170: 4181-4187.

Bardonnet, N. et Blanco, C. 1992. '*uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. FEMS Microbiol. Lett. 72: 243-247.

Beaulieu, C., Boccara, M. et Van Gijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 6: 197-202.

Bell, C. E. et Lewis, M. 2001. Crystallographic analysis of Lac repressor bound to natural operator O1. J Mol. Biol. 312: 921-92.

Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P., Birch, P. R., Parkhill, J. et Toth, I. K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 27; 101: 11105-11110.

Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F. et Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins : mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 266-292.

Bergman, K., Gulashhoffee, M., Hovestadt, R. E., Larosiliere, R. C., Ronco, P. G. et Su, L. 1988. Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti* - evidence for a dual chemotaxis pathway. J Bacteriol. 170: 3249-3254.

Binns, A. N. et Constantino, P. 1998. The *Agrobacterium* oncogenes, p. 251-266. *In* Spaink, H.P., Kondorosi, A., et Hooykaas, P. J. J. (ed.), The *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Kazuki, S., Draper, J., Nikolau, B. J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, H., Terthewey, R. N., Lange, M., Wurtele, E. S. et Summer, L. W. 2004. Potential of metabolomics as a functional genomic tool. Trends in Plant Sciences. 9: 418-425.

Bourson, C., Favey, S., Reverchon, S. et Robert-Baudouy, J. 1993. Regulation of the expression of a *pelA::uidA* fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of the synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis. J Gen. Microbiol. 139: 1-9.

Bouzar, H. et Jones, J. B. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. Inter. J Syst. Evol. Microbiol. 51: 1023-1026.

Brencic, A. et Winans, S. C. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiol. Mol. Biol. 69: 155-194.

Brencic, A., Eberhard, A. et Winans, S. C. 2004. Signal quenching, detoxification and mineralization of *vir* gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Microbiol. 51 : 1103-1115.

Burn, J., Rossen, L. et Johnston, W. B. 1987. Four classes of mutations in the *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae that affect its ability to autoregulate and/or activate other *nod* genes in the presence of flavonoid inducers. Genes & Development. 1: 456-464.

Caetano-Anolles, G., Wall, L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M., Bauer, W. D. et Favellukes, G. 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 86: 1228-1235.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. et Henrissat, B. 2008. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37: D233-238. (http://www.cazy.org/)

Cardenas, L., Dominguez, J., Quinto, C., Lopez-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J. et Thomas-Oates, J. E. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. Plant Mol. Biol. 29: 453-464.

Carlier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y. et Faure, D. 2004. In *Agrobacterium tumefaciens* strain C58, the assimilation of γ-butyrolactone interferes with the accumulation of the *N*-acyl-homoserine lactone signal. Mol. Plant-Microbe Interact. 17: 951-957.

Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y. et Faure, D. 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4989-4993.

Castillo, A., Nasser, W., Condemine, G. et Reverchon, S. 1998. The PecT repressor interacts with regulatory regions of pectate lyase genes in *Erwinia chrysanthemi*. Biochimica et Biophysica Acta. 1442: 148-160.

Chai, Y., Tsai, C. S., Cho, H. et Winans, S. C. 2007. Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL, and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 189: 3674-3679.

Chain, P. S., Hu, P., Malfatti, S. A., Radnedge, L., Larimer, F., Vergez, L. M., Worsham, P., Chu, M. C. et Andersen, G. L. 2006. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. J Bacteriol. 188: 4453-4463.

Chang, C. H. et Winans, S. C. 1992. Functional roles assigned to the periplasmic, linker, and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. J Bacteriol. 174: 7033-7039.

Charles, T. C. et Nester, E. W. 1993. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 175: 6614-6625.

Chatterjee, A., Cui, Y. Y., Yang, H. L., Collmer, A., Alfano, J. R. et Chatterjee, K. 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, act as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional avtivators, and alternate sigma factors. Mol. Plant-Microbe Interact. 16: 1106-1117.

Chen, T. H. et Murata, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Curr. Opin. Plant Biol. 5 : 250-257.

Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E. et Faure, D. 2006. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 7460-7464.

Chouikha, I., Germon, P., Bree, A., Gilot, P. et Moulin-Schouleur, C. 2006. A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. J Bacteriol. 188: 977-987.

Collmer, A. et Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 383-409.

Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et Robert-Baudouy, J. 1992. Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by KdgR. Mol. Microbiol. 6: 3199-3211.

Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et Robert-Baudouy, J. 1986. Isolation of *Erwinia chrysanthemi kduD* mutants altered in pectin degradation. J Bacteriol. 165: 937-941.

Condemine, G. et Robert-Baudouy, J. 1987. Tn-5 insertion in KdgR, a regulatory gene of the polygalacturonate pathway in *Erwinia chrysanthemi*. FEMS Microbiol. Letters. 42: 39-46.

Costacurta, A. et Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21: 1-18.

Cornu, A. 2006. Identification de nouvelles voies cataboliques impliquées dans la virulence d'*Erwinia chrysanthemi* envers les végétaux. Master 2 Ecologie, Ecologie Microbienne, Evolution. Université Lyon 1.

Cullimore, J. V., Ranjeva, R. et Bono, J. J. 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharid Nod factors in legumes. Trends in Plant Science. 6: 24-30.

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. et Chen, J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72: 317-364.

de la Cruz, F. et Lanka, E. 1998. Function of the Ti plasmid Vir proteins : T-complex formation and transfer to the plant cell, p. 281-301. *In* Spaink, H.P., Kondorosi, A., et Hooykaas, P.J.J. (ed.), The *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Debellé, F., Rosenberg, C., Bono, J-J. (2007 <http://www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier/e-parus/00/00/00/64/sommaire.md>) Calcium et signalisation Nod. Médecine/Science <http://www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier/e-docs/00/00/04/3F/document_revue.md> 23 <http://www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier/e-parus/00/00/00/64/sommaire.md> (n° 2 <http://www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier/e-parus/00/00/00/64/sommaire.md>) : 130-132.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Müller, T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T. et Hedrich, R. 2006. An intergrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. Plant Cell. 18: 3617-3634.

Delangle, A., Prouvost, A.-F., Cogez, V., Bohin, J.-P., Lacroix, J.-M. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2007. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi gan* locus, involved in galactan catabolism. J Bacteriol. 189: 7053-7061.

Dénarié, J., Debellé, F. et Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46: 497-531.

Dey, P. M. et Harborne, J. B. 1997. Plant biochemistry. Academic Press. San Diego, U S A.

Dixon, R. A. et Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell. 7: 1085-1097.

Doty, S. L., Chang, M. et Nester, E. W. 1993. The chromosomal virulence gene, *chvE*, of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by a LysR family member. J Bacteriol. 175: 7880-7886.

Doty, S. L., Yu, M. C., Lundin, J. I., Heath, J. D. et Nester, E. W. 1996. Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 178: 961-970.

Douglas, C. J. 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. Trends in Plant Science. 1: 171-178.

Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C.-W., Stingl, N., Mueller, M., Hartung, W., Hedrich, R. et Deeken, R. 2007. A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on Arabidopsis. Plant Physiology. 145: 853-862.

Expert, D. 1999. Withholding and exchanging iron: interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 307-334.

Fisher, R. F., Egelhoff, T. T. et Mulligan, J. T. 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. Genes & Development. 2: 282-293.

Fisher, R. F. et Long, S. R. 1993. Interactions of NodD at the *nod* Box : NodD binds to two sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. J Mol. Biol. 233: 336-348.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. et Greenberg, E. P. 1994. Quorum Sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol. 176: 269-275.

Gagnon, H. et Ibrahim, R. K. 1998. Aldonic acids : a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. Mol. Plant-Mibrobe Interact. 11: 988-998.

Gao, R. et Lynn, D. G. 2005. Environmental pH sensing : resolving the VirA/VirG two-component system input for *Agrobacterium* pathogenesis. J Bacteriol. 187: 2182-2189.

Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: 16-37.

Geurts, R. et Bisseling, T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. Plant Cell. S239-S249.

Glasner, J. D., Yang, C.-H., Reverchon, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Bohin, J.-P., Van Gijsegem, F., Yang, S., Franza, T., Expert, D., Plunkett III, G., San Francisco, M. J., Charkowski, A., Py, B., Grandemange, L., Bell, K., Rauscher, L., Rodriguez-Palenzuela, P., Toussaint, A., Holeva, M., He, S. Y., Douet, V., Boccara, M., Blanco, C., Toth, I., Anderson, B. D., Biehl, B., Mau, B., Flynn, S. M., Barras, F., Lindeberg, M., Birch, P., Tsuyumu, S., Shi, X. Y., Hibbing, M., Yap, M.-N., Masahiro, U., Kim, J. F., Soni, P., Mayhew, G. F., Fouts, D., Gill, S., Blattner, F. R., Keen, N. T. et Perna, N. T. Collaborative annotation and analysis of the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genome. En preparation.

Gnanamanickam, S. S., Starratt, A. N. et Ward, W. B. 1982. Coronatine production in vitro and its relation to symptom development in bacterial-blight of soybean. Canadian Journal of Botany. 60: 645-650.

Goldmann, A., Boivin, V., Fleury, V., Message, B., Lacoeur, L., Maille, M. et Tepfer, D. 1991. Betaine use by rhizosphere bacteria : genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 571-578.

Gonzalez, V., Santamaria, R. I., Bustos, P., Hernandez-Gonzalez, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramirez, M. A., Jimenez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. et Davila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103: 3834-3839.

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S;, Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y. W., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M.,

Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. et Slater, S. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. 294: 2323-2328.

Göttfert, M., Holzhäuser, D., Bäni, D. et Hennecke, H. 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 257-265.

Grignon, C. et Sentenac, H. 1991. pH and ionic conditions in the apoplast. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 103-128.

Gross, D. C., Cody, Y. S., Proebdting, E. L., Radamaker, G. K. et Spotts, R. A. 1984. Ecotypes and pathogenicity of ice-nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolated from desiduous fruit tree orchards. Phytopathology. 74: 241-248.

Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. et Grandi, G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster : a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. J Biol. Chem. 273: 32857-32863.

Harris, S. J., Shih, Y.-L., Bentley, S. D. et Salmond, P. C. 1998. The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. Mol. Microbiol. 28: 705-717.

Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. et Swings, L. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Syst. Appl. Microbiol. 21: 384-397.

Haudecoeur, E., Tannières, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y. et Faure, D. 2009. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. Mol. Plant-Microbe Interact. 22: 529-537.

Hawes, M. C. et Smith, L. Y. 1989. Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea palnts. J Bacteriol. 171: 5668-5671.

Heath, J. D., Charles, T. C. et Nester, E. W. 1995. Ti plasmid and chromosomally encoded two-component system important in plant cell transformation by *Agrobacterium* species, p. 367-385. *In* Hoch, J. A., et Silhavy, T. J. (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.

Heeb, S. et Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 1351-1363.

Herron, S. R., Benen, J. A., Scavetta, R. D., Visser, J. et Jurnak, F. 2000. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97: 8762-8769.

Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligori, S., Expert, D., Nasser, W. et Reverchon, S. 2008. PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol. 190: 7508-7522.

Huang, M-L. W., Cangelosi, G. A., Halperin, W. et Nester, E. W. 1990. A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. J Bacteriol. 172 : 1814-1822.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. The RhaS activator controls the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes *rhiN*, *rhiT*, and *rhiE* involved in rhamnogalacturonan catabolism. Mol. Microbiol. 51: 1361-1374.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et Charaoui-Boukerzaza, S. 2009. The catabolism of raffinose, sucrose and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol. [Epub ahead of print].

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine G., Nasser, W. et Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. 50 : 213-257.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H. et Robert-Baudouy, J. 1992. Environmental conditions affect the transcription of the pectinases genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol. 174: 7807-7818.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Quesneau, Y. et Robert-Baudouy, J. 1983. Aldohexuronate transprot system in *Erwinia carotovora*. J Bacteriol. 154 : 663-668.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et Robert-Baudouy, J. 1987. Hexuronate catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. J Bacteriol. 169: 1223-1231.

Hutchison, M. L. et Gross, D. C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 347-354.

Hutchison, M. L., Tester, M. A. et Gross, D. C. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux : a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 610-620.

Ji, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et Robert-Baudouy, J. 1987. Use of Mu-lac insertions to study the secretion of pectate lyases by *Erwinia chrysanthemi*. J Gen. Biol. 133: 793-802.

Jin, S., Roitsch, T., Christie, P. J. et Nester, E. W. 1990. The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis*-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. J Bacteriol. 172 : 531-537.

Johnson, T. M. et Das, A. 1998. Organization and regulation of expression of the *Agrobaterium* virulence genes, p. 265-279. *In* Spaink, H.P., Kondorosi, A., et Hooykaas, P.J.J. (ed.), The *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Kado, C. I. 1998. *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer. Genetic Engineering. 20: 1-24.

Kalogeraki, V. S., Zhu, J., Eberhard, A., Medsen, E. L. et Winans, S. C. 1999. The phenolic *vir* gene inducer ferulic acid is O-demethylated by the VirH2 protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Mol. Microbiol. 34: 512-522.

Kape, R., Parniske, M. et Werner, D. 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 316-319.

Kemner, J. M., Liang, X. et Nester, E. W. 1997. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. J Bacteriol. 179: 2452-2458.

Law, C. J., Maloney, P. C. et Wang, D. N. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. Annu. Rev. Microbiol. 62: 289-305.

Lee, K. H., Dudley, M. W., Hess, K. M., Lynn, D. G., Joerger, R. D. et Binns, A. N. 1992. Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes : identification of phenol-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 8666-8670.

Lee, Y.-W., Jin, S. G., Sim, W.-S. et Nester, E. W. 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. Gene. 179: 83-88.

Lee, Y.-W., Jin, S. G., Sim, W.-S. et Nester, E. W. 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumafaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 12245-12249.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. et Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determinated by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. 344: 781-784.

Leroux, B., Yanofsky, M. F., Winans, S. C., Ward, J. E., Ziegler, S. F. et Nester, E. W. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens* : a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO J. 6: 846-856.

Létoffé, S., Delepelaire, P. et Wandersman, C. 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. EMBO J. 9: 1375-1382.

Lewis, M. 2005. The Lac repressor. C. R. Biol. 328: 521-548.

Li, L. P., Jia, Y. H., Hou, Q. M., Charles, T. C., Nester, E. W. et Pan, S. Q. 2002. A global pH sensor : *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 12369-12374.

Li, X. Z., Starratt, A. N. et Cuppels, D. A. 1998. Identification of tomato leaf factors that activate toxin gene expression in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Phytopathology. 88: 1094-1100.

Liu, Y., Murata, H., Chatterjee, A. et Chatterjee, A. K. 1993. Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp carotovora. Mol. Plant-Microbe Interact. 6: 299-308.

Lojkowska, E., Masclaux, C., Boccara, M., Robert-Baudouy, J. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1995. Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol. Microbiol. 16: 1183-1195.

Mantis, N. J. et Winans, S. C. 1993.The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Esccherichia coli phoB* mutation and is required for virulence. J Bacteriol. 175: 6626-6636.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.

McCullen, C. A. et Binns, A. N. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities and its for interkingdom macromolecular transfer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22: 101-127.

McIver, J., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Bender, G. L. et Rolfe, B. G. 1989. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii caused by point mutations in *nodD* that results in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. Mol. Plant-Microbe Interact. 2(3): 97-106.

Melchers, L. S., Regensburgtuink, A. J. G., Schilperoort, R. A. et Hooykaas, P. J. J. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. Mol. Microbiol. 3: 969-977.

Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Mitchell, R. E., Hale, C. N. et Shanks, J. C. 1983. Production of different pathogenic symptoms and different toxins by strains of *Pseudomonas syringae* pv tomato not distinguishable by gel-immunodiffusion assay. Physiol. Plant Pathol. 23: 315-322.

Mo, Y. Y., Geibel, M., Bonsall, R. F. et Gross, D. C. 1995. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) leaves for plant signal molecules that activate the *syrB* gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. Plant Physiol. 107: 603-612.

Mo, Y. Y. et Gross, D. C. 1991. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. syringae. J Bacteriol. 173: 5784-5792.

Moran, F., Nasuno, S. et Starr, M. 1968. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid transeliminase of *Erwinia carotovora*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 123: 298-306.

Mulligan, J. T. et Long, S. R. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 : 6609-6613.

Murata, H., Mcevoy, J. L., Chatterjee, A., Collmer, A. et Chatterjee, A. K. 1991. Molecular cloning of an *aepA* gene that activates production of extracellular pectolytic, cellulolytic, and proteolytic enzymes in *Erwinia carotovora* subsp carotovora. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 239-246.

Nachin, L. et Barras, F. 2000. External pH : an environmental signal that helps to rationalize *pel* gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 882-886.

Nasser, W., Condemine, G., Plantier, R., Anker, D. et Robert-Baudouy, J. 1991. Inducing properties of analogs of 2-keto-3-deoxygluconate on the expression of pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi*. FEMS Microbiol. Letters. 81: 73-78.

Nasser, W., Reverchon, S., Condemine, G. et Robert-Baudouy, J. 1994. Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. J Mol. Biol. 236: 427-440.

Nasser, W., Reverchon, S. et Robert-Baudouy, J. 1992. Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Microbiol. 6: 257-265.

Nasser, W., Shevchik, V. E. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1999. Analysis of three clustered polygalacturonase genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator. Mol. Microbiol. 34: 641-650.

Nomura, K., Nasser, W., Kawagishi, H. et Tsuyumu, S. 1998. The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 14034-14039.

Okker, R. J., Spaink, H., Hille, J., van Brussel, T. A., Lugtenberg, B. et Schilperoort, R. A. 1984. Plant-inducible virulence promoter of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature. 312: 564-566.

Pan, S. Q., Charles, T., Jin, S. G., Wu, Z. L. et Nester, E. W. 1993. Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-*Agrobacterium* signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 9939-9943.

Parke, D. 1995. Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 177 (13): 3808-17.

Parke, D., Ornston, L. N. et Nester, E. W. 1987. Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti-plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 169: 5336-5338.

Perombelon, M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias : an overview of pathogenesis. Plant Pathology. 51: 1-12.

Peng, W. T., Lee, Y. W. et Nester, E. W. 1998. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are boradened by a high level of the sugar binding protein ChvE. J Bacteriol. 180: 5632-5638.

Perret, X., Staehelin, C. et Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 180-201.

Peters, N. K., Frost, J. W. et Long, S. R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science. 233: 977-980.

Phillips, D. A., Dakora, F. D., Sande, E. S., Joseph, C. M. et Zon, J. 1994. Synthesis, release, and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. Plant Soil. 161: 69-80.

Phillips, D. A., Joseph, C. M. et Maxwell, C. A. 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology. 99: 1526-1531.

Pissavin, C., Robert-Baudouy, J. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1996. Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol. 178: 7187-7196.

Popoff, M. Y., Kersters, K., Kiredjian, M., Miras, I. et Coynault, C. 1984. Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin. Annales de Microbiologie. 3: 427-442.

Powell, B. S. et Kado, C. I. 1990. Specific binding of VirG to the *vir* box requires a C-terminal domain and exhibits a minimum concentration threshold. Mol. Microbiol. 4: 2159-2166.

Praillet, T., Reverchon, S. et Nasser, W. 1997. Mutual control of the PecS/PecM couple, two proteins regulating virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Microbiol. 24: 803-814.

Priefert, H., Rabenhorst, J. et Steinbüchel, A. 2001. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56(3-4):296-314.

Rao, J. R. et Cooper, J. E. 1994. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. J Bacteriol. 176: 5409-5413.

Redfield, R. J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends in Microbiology. 10: 365-370.

Résibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, T. et Toussaint, A. 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. Virology. 137: 102-112.

Reverchon, S., Nasser, W. et Robert-Baudouy, J. 1994. *pecS*, a locus controlling pectinase, cellulase, and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Microbiol. 11: 1127-1139.

Reverchon, S., Nasser, W. et Robert-Baudouy, J. 1991. Characterization of KdgR, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. Mol. Microbiol. 5: 2203-2216.

Reverchon, S. et Robert-Baudouy, J. 1987. Molecular cloning of an *Erwinia chrysanthemi* oligogalacturonate lyase gene involved in pectin degradation. Gene. 55: 125-133.

Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. et Nasser, W. 2002. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. J Bacteriol. 184: 654-665.

Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W. et Sagen, H. E. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery trees of apples. Journal of Agricultural Research 41: 507-540.

Robert-Baudouy, J., Nasser, W., Condemine, G., Reverchon, S., Shevchik, V. E. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2000. Regulation of pectinase gene expression in *Erwinia chrysanthemi*. Plant-Microbe Interact. (eds G. Stacey et N. Keen, APS Press) 5: 221-268.

Robinson, J. B. et Bauer, W. D. 1993. Relationships between C-4 dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol. 175: 2284-2291.

Rodionov, D. A., Gelfand, M. S. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. Microbiol. 150: 3571-3590.

Rossi, L., Tinland, B. et Hohn, B. 1998. Role of virulence proteins of *Agrobacterium* in the plant, p. 303-320. *In* Spaink, H.P., Kondorosi, A., et Hooykaas, P.J.J. (ed.), The *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A. et Kondorosi, A. 1986. Conservation of extend promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 1757-1761.

Salmond, G. P. C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant-pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 181-200.

Sambrook, J. et Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. et Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Inter. J Syst. Evol. Microbiol. 55 : 1415-1427.

Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J. et Berleth, T. 2006. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. Genes & Development. 20: 1015-1027.

Schell, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 47: 597-626.

Schirawski, J., Böhnert, H. U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L. et Kahmann, R. 2005. Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. Plant Cell. 17: 3532-43.

Schlaman, H. R. M., Phillips, D. A. et Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes, p.361-386. *In* Spaink, H.P.,

Kondorosi, A., et Hooykaas, P.J.J. (ed.), The *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997. Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. J Bacteriol. 179: 7321-7330.

Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S. et Machida, Y. 1993. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. J Biol. Chem. 268: 26552-26558.

Silverstein, R. M., Bsler, G. C. et Morill, T. C. 1998. Identification spectrométrique de composés organiques. 5ème édition. De Boeck, Bruxelles, p. 420.

Smirnova, A. V., Wang, L., Rohde, B., Budde, I., Weingart, H. et Ullrich, M. S. 2002. Control of temperature-responsive synthesis of the phytotoxin coronatine in Pseudomonas syringae by the unconventional two-component system CorRPS. J Mol. Microbiol. Biotechnol. 4: 191-196.

Smith, E. F. et Townsend, C. O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. Science. 25: 671-673.

Spaink, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54: 257-288.

Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Okker, R. J. H. et Lugtenberg, B. E. J. 1989. Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. Plant Mol. Biol. 12: 59-73.

Spencer, P. A. et Towers, G. H. N. 1988. Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. Phytochemistry. 27: 2781-2785.

Sreedharan, A., Penaloza-Vazquez, A., Kunkel, B. N. et Bender, C. L. 2006. CorR regulates multiple components of virulence in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 768-779.

Stachel, S. E., An, G., Flores, C. et Nester, E. W. 1985a. Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of β-galactosidase gene fusions : application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. J Europ. Mol. Biol. 4: 891-898.

Stachel, S. E., Messens, E., Vanmontagu, M. et Zambryski, P. 1985b. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature. 318: 624-629.

Stachel, S. E., Nester, E. W. et Zambryski, P. 1986. A plant-cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 379-383.

Stachel, S. E. et Zambryski, P. 1986. VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell. 46: 325-333.

Stock, A. M., Robinson, V. L. et Goudreau, P. N. 2000. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69: 183-215.

Surgey, N., Robert-Baudouy, J. et Condemine, G. 1996. The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. J Bacteriol. 178: 1593-1599.

Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases : enzyme characteristics and potential inhibitors. J Bacteriol. 179: 2503-2511.

Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P. et Vanderleyden, J. 1999. Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. Mol. Microbiol. 32: 703-714.

Van Gijsegem, F., Wlodarczyk, A., Cornu, A., Reverchon, S. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2008. Analysis of the LacI family regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, involvement in the bacterial phytopathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact. 21: 1471-1481.

Van Rhijn, P. J. S., Feys, B., Verreth, C. et Vanderleyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. J Bacteriol. 175: 438-447.

Wächter, R., Langhans, M., Aloni, R., Götz, S., Weilmünster, A., Koops, A., Temguia, L., Mistrik, I., Pavlovkin, J., Rascher, U., Schwalm, K., Koch, K. E. et Ullrich, C. I. 2003. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 133: 1024-1037.

Wang, N., Lu, S.-E., Records, A. R. et Gross, D. C. 2006a. Characterization of the transcriptional activators SalA and SyrF, which are required for syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. syringae. J Bacteriol. 188: 3290-3298.

Wang, N., Lu, S.-E., Wang, J., Chen, J. et Gross, D. C. 2006b. The expresion of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. syringae is coordinated in response to plant signal molecules. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 257-269.

Wang, Q. Z., Wu, C. Y., Chen, T., Chen, X. et Zhao, X. M. 2006c. Integrating metabolomics into systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 151-161.

Wang, Y., Gao, R., et Lynn, D. G. 2002. Ratcheting up *vir* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens* : coiled coils in histidine kinase signal transduction. Chembiochem. 3: 311-317.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. et Salmond, G. P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25: 365-404.

Winans, S. C. 1990. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. J Bacteriol. 172: 2433-2438.

Winans, S. C., Ebert, P. R., Stachel, S. E., Gordon, M. P. et Nester, E. W. 1986. A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8278-8282.

Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Woo, L., Chen, Y. C., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutyavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z. N., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S. P., Yoo, H. Y., Tao, M., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Grodon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V. et Nester, E. W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. 294: 2317-2323.

Yuan, Z. C., Edlind, M. P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L. M., Wise, A. A., Ronzone, E., Binns, A. N., Kerr, K. et Nester, E. W. 2007. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 11790-11795.

Yuan, Z. C., Liu, P., Saenkham, P., Kerr, K. et Nester, E. W. 2008. Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. J Bacteriol. 190: 494-507.

Zhang, H. B., Wang, C. et Zhang, L. H. 2004. The quormone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. Mol. Microbiol. 52: 1389-1401.

Zhang, H. B., Wang, L. H. et Zhang, L. H. 2002. Genetic control of quorum-sensing turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 4638-4643.

Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K. et Winans, S. C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. J Bacteriol. 182: 3885-3895.

Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G., Gigot-Bonnefoy, C., Schnider-Keel, U., Heeb, S., Reimmann, C. et Hass, D. 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 16: 634-644.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. et Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights. Plant J. 23: 11-28.

MPMI Vol. 21, No. 11, 2008, pp. 1471–1481. doi:10.1094/MPMI-21-11-1471. © 2008 The American Phytopathological Society

Analysis of the LacI Family Regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, Involvement in the Bacterial Phytopathogenicity

Frédérique Van Gijsegem,[1] Aleksandra Wlodarczyk,[2] Amandine Cornu,[2] Sylvie Reverchon,[2] and Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat[2]

[1]Laboratoire Interactions Plantes Pathogènes, UMR217 INRA/AgroParisTech/UPMC Univ Paris 6, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, Cedex 05, France; [2]Univ Lyon, F-69622, Lyon, Université Lyon 1 Villeurbanne, INSA de Lyon F-69621 Villeurbanne, CNRS UMR5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, bat Lwoff, 10 rue Dubois, Domaine Scientifique de la Doua, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Submitted 29 February 2008. Accepted 26 June 2008.

Analysis of the regulators of the LacI family was performed in order to identify those potentially involved in pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Among the 18 members of the LacI family, the function of 11 members is either known or predicted and only 7 members have, as yet, no proposed function. Inactivation of these seven genes, called *lfaR*, *lfbR*, *lfcR*, *lfdR*, *lfeR*, *lffR*, and *lfgR*, demonstrated that four of them are important for plant infection. The *lfaR* and *lfcR* mutants showed a reduced virulence on chicory, *Saintpaulia* sp., and *Arabidopsis*. The *lfeR* mutant showed a reduced virulence on *Arabidopsis*. The *lfdR* mutant was more efficient than the wild-type strain in initiating maceration on *Saintpaulia* sp. The genetic environment of each regulator was examined to detect adjacent genes potentially involved in a common function. Construction of transcriptional fusions in these neighboring genes demonstrated that five regulators, LfaR, LfcR, LfeR, LffR, and LfgR, act as repressors of adjacent genes. Analysis of these fusions also indicated that the genes controlled by LfaR, LfcR, LfgR, and LffR are expressed during plant infection. Moreover, addition of crude plant extracts to culture medium demonstrated that the expression of the LfaR- and LfgR-controlled genes is specifically induced by plant components.

Additional keywords: induction, in planta expression, regulation.

Pectinolytic enterobacteria produce soft-rot disease on many plant species. The disease is characterized by the maceration of plant tissue as the result of the action of a set of enzymes degrading the plant cell wall. Among these enzymes, pectate-lyases, which depolymerise pectin, play an essential role in pathogenicity (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996). Although essential, the synthesis and secretion of pectate lyases are not the sole factors necessary for bacterial virulence. Plant colonization is a multifactorial process involving numerous additional factors. Moreover, fine tuning is required for the production of the virulence factors at the right time and level during infection. Bacterial pathogenesis includes steps wherein the partners recognize each other and respond accordingly by modulating the expression of specific sets of genes. The completion of the *Erwinia chrysanthemi* (or *Dickeya dadantii*) 3937 genome provide a genome-scale view of the metabolic capacities of this plant-pathogenic bacterium (J. D. Glassner and N. T. Perna *unpublished data*). A substantial part of the *E. chrysanthemi* genome is dedicated to genes involved in regulation. Nearly 9% of strain 3937 predicted proteins (approximately 400 proteins) are thought to play a role in transcriptional regulation, and 293 of these proteins are predicted to be DNA-binding transcriptional regulators. Approximately 20% of strain 3937 transcriptional regulators display similarity with regulators found only in plant-associated bacteria, such as *Ralstonia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., or *Rhizobium* spp.. Such regulators could be implicated in responses to conditions specifically encountered in the plant tissues. Strain 3937 transcriptional regulators are distributed in 28 distinct families containing from 1 to 62 members. As observed in other enterobacteria, the LysR family is the largest family of transcriptional regulators in *E. chrysanthemi*, with 62 members. The two-component response regulators are represented by 30 members. The LacI family is quite well represented, with 18 members, compared with 14 in *Escherichia coli* K-12 and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Bell et al. 2004).

Among the numerous *E. chrysanthemi* regulators, only a few have been shown to be involved in the control of virulence factors. The correct production of pectate lyases, the major maceration factors, is directed by a regulatory network including mostly repressors of various families (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996; Sepulchre et al. 2007). KdgR, a repressor of the IclR family, mediates induction of several genes involved in pectin degradation or related functions (Reverchon et al. 1991; Rodionov et al. 2004). PecS, a repressor of the MarR family, controls production of plant cell-wall-degrading enzymes and of a blue pigment, indigoidine, which could act as antioxydant (Reverchon et al. 1994, 2002). PecT, a repressor of the LysR family, controls pectate lyase and exopolysaccharide synthesis (Surgey et al. 1996). The positive regulator CRP was found to be the major activator of pectate lyase synthesis (Reverchon et al. 1997). Recently, the GacA-GacS two-component system was shown to be important for activation of *E. chrysanthemi* virulence factors (Lebeau et al. 2008; Yang et al. 2008).

Corresponding author: N. Hugouvieux-Cotte-Pattat; Telephone: +33-472-43-1553; Fax: +33-472-43-1584; E-mail: Nicole.Cotte-Pattat@insa-lyon.fr

Current address of N. Hugouvieux-Cotte-Pattat: Microbiologie Adaptation et Pathogénie.

Our aim was to use a functional approach on a whole family of *E. chrysanthemi* regulators. The LacI family was chosen for the present work. The regulators of the LacI family are often involved in the control of degradative pathways. They directly interact with DNA, frequently by a negative effect, acting as repressors in the absence of the inducing compound (Lewis 2005). Among the 18 regulators of the LacI family found in *E. chrysanthemi*, 7 have a totally unknown function. We analyzed the potential involvement of these LacI family regulators in the interaction with the plant hosts. This study was performed by i) systematic mutagenesis of each gene encoding a LacI family regulator to establish their role in virulence and ii) construction of genetic fusions in adjacent genes, taken as potential regulated targets, to assess their expression during plant infection.

RESULTS

The regulators of the LacI family in *E. chrysanthemi*.

The *E. chrysanthemi* 3937 genome encodes 18 potential transcriptional regulators of the LacI family. Homologs of these regulators were identified by Blast searches. The best identity score was found in 10 cases with *E. carotovora*, in 4 cases with *Yersinia* spp., in 2 cases with *Salmonella* spp. and in the 2 last cases with the nonenterobacterial genera *Chromobacterium* and *Rhizobium* (Table 1). Eight of these regulators are conserved in *Escherichia coli* K-12 (Table 1) and their function has been clearly determined in this species. CytR, FruR, GalR, GalS, GntR, LacI, RbsR, and PurR are involved in the catabolism of nucleosides, fructose, galactose, galactosides, gluconate, lactose, and ribose and in the biosynthesis of purine, respectively. In the case of these eight regulators, we hypothesized that their function is conserved in *Erwinia chrysanthemi*. In addition, the role of the two regulators RafR and ScrR, which are encoded by genetic mobile elements, was described in various enterobacteria (Aslanidis et al. 1989; Titgemeyer et al. 1996). They are involved in the catabolism of raffinose and sucrose, respectively, and these functions were confirmed in *E. chrysanthemi* (*unpublished data*). ID 18202, encoding the GanR regulator, is situated in a cluster of genes which was recently shown to be involved in galactan degradation (Delangle et al. 2007). Thus, there are still seven *E. chrysanthemi* regulators of the LacI family which do not yet have a known function.

We decided to perform a systematic analysis of these seven *E. chrysanthemi* regulators. To facilitate this analysis, we arbitrarily allocated a name to each of these genes or proteins and to certain adjacent genes (Tables 1 and 2; Fig. 1). The LacI family regulators were named LfaR (ID 15303), LfbR (ID 16819), LfcR (ID 18397), LfdR (ID 18466), LfeR (ID 18558), LffR (ID 18801), and LfgR (ID 19202). A systematic mutagenesis was carried out to determine the importance of these *E. chrysanthemi* regulators in the plant–bacteria interaction. A chloramphenicol-resistant (Cm^r) cassette was inserted into the cloned genes and, using reverse genetics, these insertions were integrated in the chromosome of the wild-type strain 3937. Hence, we were able to obtain mutants affected for each regulator.

Virulence of the regulator mutants.

We first compared the maceration on chicory leaves provoked by each mutant 24 h postinfection with that caused by the parental strain 3937 (Fig. 2). There was no significant difference in the degree of maceration caused by the mutants *lfbR, lfdR, lfeR, lffR*, and *lfgR*. In contrast, the *lfaR* and *lfcR* mutants caused a clearly reduced maceration (Fig. 2). This result showed that the integrity of the regulators LfaR and LfcR is important for the development of soft-rot disease.

The pathogenicity of these mutants was also tested on two types of whole plants: *Saintpaulia ionantha* (African violet), the host plant from which strain 3937 has been isolated, and the plant model *Arabidopsis thaliana*, for which the pathosystem has been recently established (Dellagi et al. 2005). *Saintpaulia* sp. inoculations were performed by infiltration using a bacterial suspension at 10^8 bacteria/ml (Fig. 3A). There was no difference in symptoms caused by the wild-type strain and the mutants affected for *lfbR, lffR*, and *lfgR* ($P > 0.3$) (Fig. 3A). A repetitive but only slight delay in symptom occurrence was observed with the *lfeR* mutant ($P \approx 0.1$) (Fig. 3A). In contrast, the *lfaR, lfcR*, and *lfdR* mutants behaved significantly differently from the wild-type strain. The *lfaR* mutant was able to initiate

Table 1. Eighteen regulators of the LacI family encoded by the 3937 genome and their homologues

ID no.	Name	Identity with (%)[a]		Other bacteria spp.[c]
		Escherichia coli[b]	*Erwinia carotovora*	
18277	FruR	89	89	90 *Yersinia*, 89 *Salmonella*
14676	PurR	80	92	86 *Yersinia*, 86 *Photorhabdus*
18375	GalS	76	(56 GalR)	77 *Salmonella*
18477	GalR	75	71	77 *Yersinia*, 75 *Salmonella*
15046	GntR	72	69	72 *Yersinia*, 72 *Salmonella*
18142	RbsR	69	83	70 *Salmonella*, 69 *Photorhabdus*
20411	CytR	66	74	68 *Yersinia*, 66 *Salmonella*
15766	LacI	55	62	
19140	RafR	55[d]	59	55 *Yersinia*
16544	ScrR	62[d]	84	66 *E. amylovora*, 64 *Klebsiella*, 62 *Salmonella*
18202	GanR	(42 LacI)	(47 LacI)	85 *Yersinia*
15303	LfaR	52[d]	67	57 *Yersinia*
18466	LfdR	(46 AscG)	71	62 *Salmonella*
19202	LfgR	…	78	40 *Rhizobium*, 39 *Agrobacterium*
18801	LffR	…	75	60 *Mannheimia*, 41 *Thermoanaerobacter*, 40 *Oceanobacillus*, 37 *Bacillus*
18558	LfeR	…	67	76 *Salmonella*, 48 *Ralstonia*, 39 *Streptomyces*, 37 *Pseudomonas*, 35 *Agrobacterium*
18397	LfcR	(31 ScrR)	(29 ScrR)	35 *Chromobacterium*, 31 *Vibrio*
16819	LfbR	…	(32 ECA4246)	34 *Rhizobium*

[a] The best score is underlined. The level of identity with homologues known to be involved in a different pathway is shown in brackets parentheses, with the name of the corresponding homologue.
[b] *Escherichia coli* K12 and other *E. coli* or *Shigella* strains.
[c] The genus is indicated for bacteria encoding an homologous protein with an identity score superior or equal to the score obtained for *E. coli* proteins.
[d] RafR and ScrR genes are encoded by mobile genetic elements, either plasmids or transposons. An LfaR homologue is found in a genomic island of an extraintestinal avian pathogenic *E. coli* strain.

symptoms at the same frequency as the wild-type strain but symptom progression was delayed and less severe ($P < 0.05$). The *lfcR* mutant was greatly affected in virulence because, compared with the wild-type strain, fewer inoculated plants exhibited symptoms and a delay in symptom progression was observed ($P < 0.05$). Compared with the wild-type strain, the *lfdR* mutant developed more rapidly severe symptoms (for example, 3 days postinoculation, $P = 0.01$) (Fig. 3A). This was even more visible when a low inoculum was used (bacterial suspension at 10^7 bacteria/ml, $P < 0.04$) (Fig. 3B), a condition in which the wild-type strain was moderately efficient in symptom development (Fig. 3B).

On *Arabidopsis*, a decreased virulence was also observed with the *lfaR* and *lfcR* mutants (Fig. 4). The *lfaR* mutant produced delayed and reduced symptoms ($P < 0.05$) and the *lfcR* mutant was impaired both in symptom occurrence and symptom severity ($P < 0.05$). Although the *lfeR* mutant was weakly affected on *Saintpaulia* spp., it was clearly impaired in disease symptom progression on *Arabidopsis* ($P < 0.05$) (Fig. 4). Thus, on whole plants, the integrity of the regulators LfaR, LfcR, and LfeR is important for the development of soft-rot disease.

Bacterial growth in planta is also a parameter of bacterial virulence (Lebeau et al. 2008; Yang et al. 2008). Bacterial numerations were performed 24 h after inoculation of *Arabidopsis* leaves with the wild-type strain or the *lfaR*, *lfcR*, *lfdR*, and *lfeR* mutants. At this time point, maceration symptoms are not yet observed, and it was shown that the bacterial population reaches a level of approximately 10^5 bacteria per leaf, a level that remains stable as long as no rotting occurs (Lebeau et al. 2008). With the *lfaR* mutant, the bacterial population per leaves appeared 6- to 40-fold lower than that obtained with the wild-type strain ($P < 0.0001$). This alteration in bacterial growth in the early stages of infection suggests that the *lfaR* mutant is affected for adaptation to the plant environment.

Table 2. Proteins encoded by the *Erwinia chrysanthemi* genomic clusters including a LacI regulator gene

ID no.	Name	Protein description[a]
20045	LfaA	Putative α-glycosidase, of glycoside hydrolase family 31
20044	…	MFS, anion:cation symporter
16820	LfbE	Putative metal-dependent hydrolase
16821	…	ABC transporter, ATPase
16822	…	ABC transporter, membrane protein
16823	…	ABC transporter, membrane protein
16824	LfbB	ABC transporter, sugar periplasmic binding protein
18391	LfcK	Putative carbohydrate kinase
18392	…	Hypothetical protein
18394	…	Putative lyase or synthase
18395	…	Hypothetical protein
18396	…	MSF, metabolite:H^+ symporter
18467	…	PTS, component IIA
18469	…	PTS, component IIC
18471	LfdP	Putative phospho-β-glucosidase, of glycoside hydrolase family 1
18472	…	PTS, component IIB
18557	LfeW	Putative racemase or enolase
18805	…	Putative isomerase
18804	…	MFS, nucleoside H^+ symporter
18803	LffE	Putative enzyme, 27% identity with IolE (Yoshida et al. 2004)
18802	…	Putative oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family
18800	…	Hypothetical protein
19204	…	ABC transporter, membrane protein
09205	…	ABC transporter, membrane protein
09206	…	ABC transporter, ATPase
19207	LfgN	Putative enzyme, 44% identity with RhiN (Hugouvieux-Cotte-Pattat 2004)
19208	…	Hypothetical protein
19212	…	ABC transporter, periplasmic binding protein

[a] MFS, major facilitator superfamily; PTS, phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system; ABC, ATP binding cassette.

Effect of the regulator mutations on adjacent structural genes.

Because the targets of a regulator are frequently found in the vicinity of its gene, we analyzed the genetic environment of the seven selected regulator genes (Fig. 1). They are all adjacent to or included in predicted operonic structures encoding both potential enzymes and transport systems (Fig. 1; Table 2). In most cases, these groups of genes are at least partially conserved in the vicinity of the orthologous regulator gene in other bacteria (data not shown). Such a global conservation suggested the occurrence of sets of genes involved in a common function. To test whether these adjacent conserved genes are potential targets of the regulator, we constructed transcriptional fusions in one gene of each cluster. Such fusions were obtained by insertion of *uidA*-Km cassettes in the structural genes *lfaA, lfbB, lfcK, lfdP, lfeW, lffE*, and *lfgN* (Fig. 1; Table 2).

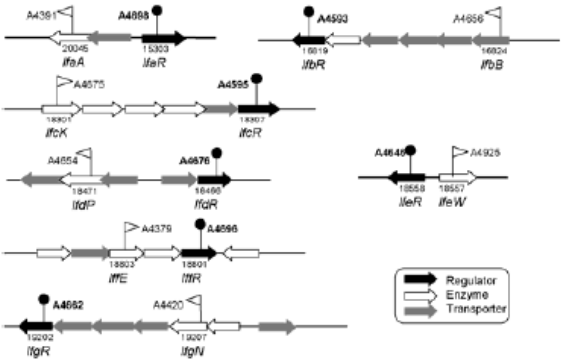


Fig. 1. Genetic organization of the *Erwinia chrysanthemi* clusters encoding the regulators of the LacI family. The regulator genes are represented by black arrows. The adjacent genes are shown in white when they encode potential enzymes and in gray when they encode transporters. The transcription direction of the genes is given by the direction of the arrows. Both the ID number and the name of the gene are given below the arrows of the studied genes. The white flags indicate the *uidA*-kanamycin fusions in the structural genes and the black circles indicate the chloramphenicol insertions in the regulator genes. The name of the strain containing the mutation is given above these drawings.

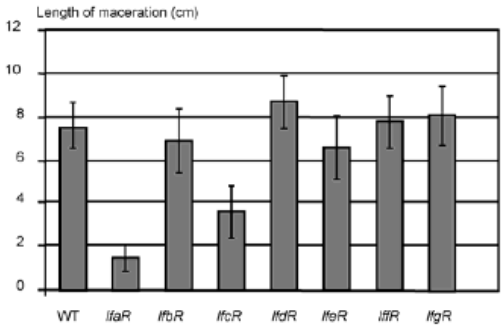


Fig. 2. Virulence of the regulator mutants on chicory leaves. After infection with each regulator mutant and the wild-type strain 3937 (WT), the leaves were incubated for 24 h and the length of rotted tissue was measured to estimate the disease severity. The mean value and the standard deviations reported correspond to 12 leaves inoculated with each strain.

Each fusion was then transduced into the mutant containing a Cm^r insertion in the corresponding regulator gene, using the phi-EC2 transducing phage. As expected for contiguous genes, a high frequency of cotransduction (50 to 90%) was observed for each couple of mutations, and only kanamycin-resistant (Km^r) Cm^r transductants were retained.

The expression of the fusions was then compared between strains containing, or not containing, the regulator mutation. The expression of *lfaA, lfcK, lfeW, lffE*, and *lfgN* clearly increased in the regulator mutant, with factors of approximately 70-, 90-, 1,100-, 750-, and 120-fold, respectively (Table 3). Such high derepression demonstrates that LfaR, LfcR, LfeR, LffR, and LfgR act as repressors to control the expression of *lfaA, lfcK, lfeW, lffE*, and *lfgN*, respectively. In contrast, *lfbB* and *lfdP* expression was not affected by the inactivation of their adjacent regulator gene. LfbR and LfdR are either not involved in the control of these structural genes or the effect of the regulator mutation is not visible in our conditions.

Complementation tests were performed using plasmids containing the regulator genes *lfaR, lfcR, lfeR*, or *lfgR* (Table 4). The plasmid encoding a given regulator was introduced in the strain bearing both the regulator inactivation and the fusion in the corresponding target gene (Table 3). The empty vector (pGEM-T) had no effect on the expression of the fu-

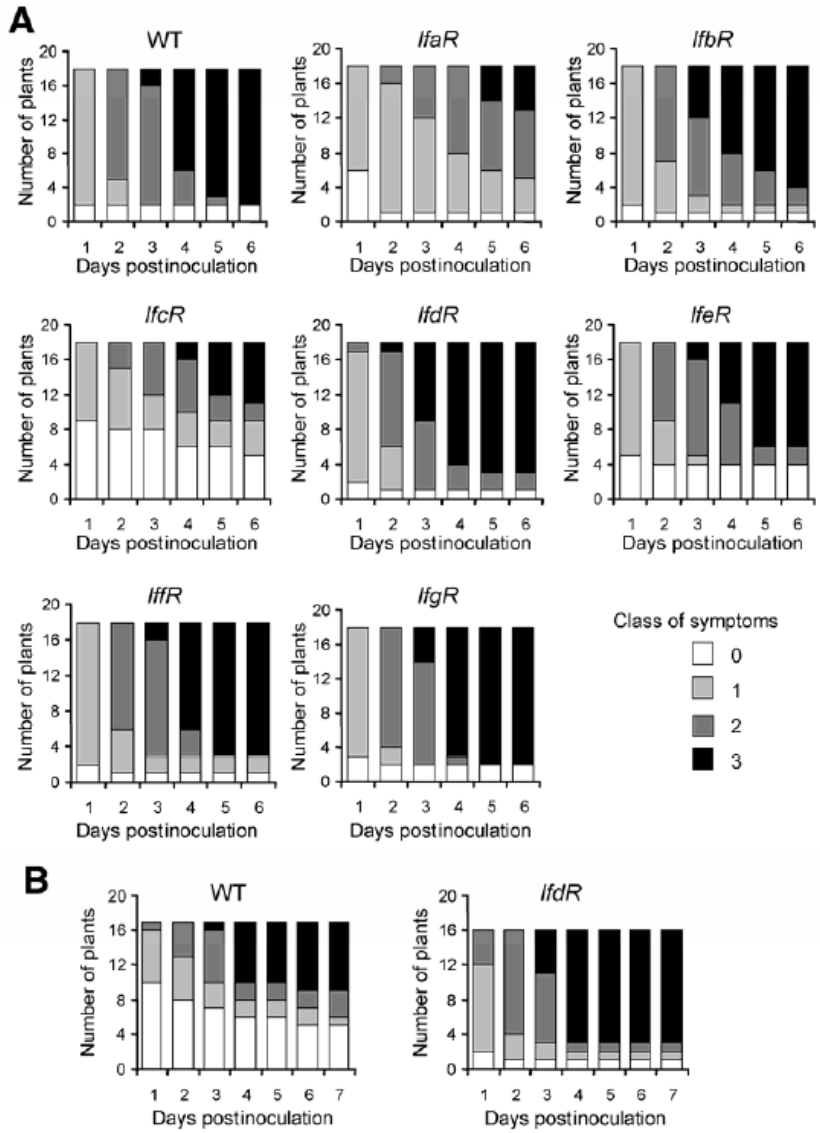


Fig. 3. Virulence of the regulator mutants in *Saintpaulia ionantha*. The evolution of the soft rot symptoms was followed after inoculation with the wild-type strain 3937 (WT) and the regulator mutants. **A,** Eighteen plants were inoculated by infiltration of a single leaf using a bacterial suspension at 10^8 bacteria/ml. **B,** Similar inoculations were performed using a bacterial suspension at 10^7 bacteria/ml. Symptom occurrence was scored daily for a week. Symptoms are classified in four stages as defined by Lebeau and associates (2008): stage 0, no symptoms; stage 1, rotting confined to the infiltrated zone; stage 2, maceration of the leaf limb; stage 3, maceration of the whole leaf including the petiole. In each column, the differently filled boxes correspond to the number of plants exhibiting a given stage of symptoms (identified as shown in the legend). At least three independent experiments were performed. In each case, the proportion of full symptomatic leaves was compared between the WT strain and mutant groups using the Fisher's exact test. Statistical significance was defined as $P = 0.05$. The different experiments gave similar interpretations and results of a representative experiment are shown.

sions (data not shown). Introduction of the regulator genes *lfaR*, *lfcR*, *lfeR*, and *lfgR* affected the expression of the *lfaA*, *lfcK*, *lfeW*, and *lfgN* fusions, respectively (Table 3). When compared with the same strain without plasmid, the high derepressed level of the *lfaA*, *lfcK*, *lfeW*, or *lfgN* fusions decrease with factors of approximately 3-, 3-, 16-, and 2-fold, respectively. However, comparison with the strain bearing a wild-type allele of the regulator gene revealed only a partial complementation of the regulator mutation (Table 3). In the transformed strains, the expression of the fusion is intermediate between the level observed in the wild-type background and that in the regulator mutant (Table 3). With plasmid constructions, the intracellular concentration of the encoded regulator could differ from its concentration in the wild-type strain. Such variations could affect the expression of the target genes because the intracellular concentration of a repressor protein is often determinant in regulatory circuits (Nasser et al. 2001).

In planta expression of the genetic fusions in the potential target genes.

To determine whether the expression of the potential target genes is induced during plant infection, we followed the expression of the seven *uidA* fusions in planta. We first assayed the reporter enzyme in the macerated tissue following infection of chicory leaves. A fusion in the highly induced pectate lyase gene *pelD* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1992) was used for comparison. After 24 h of infection of chicory leaves,

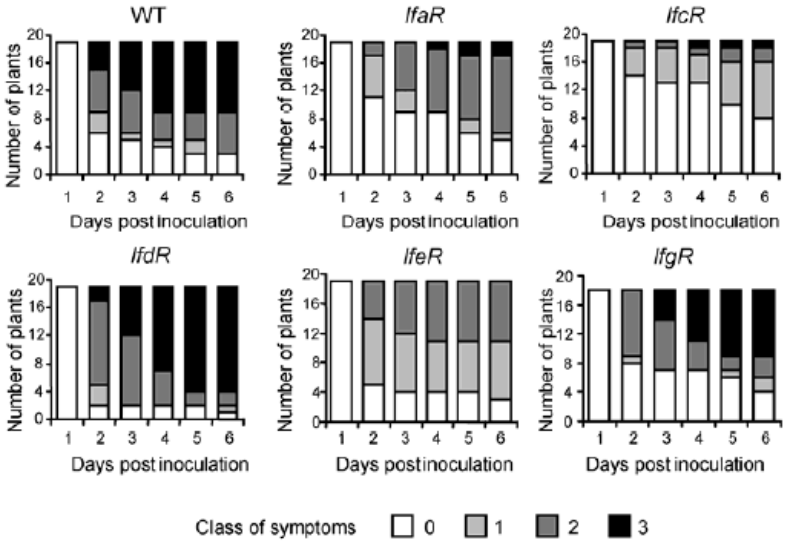


Fig. 4. Virulence of the regulator mutants in *Arabidopsis thaliana*. The evolution of the soft rot symptoms was followed after inoculation with the wild-type strain 3937 (WT) and the regulator mutants. Inoculation was performed by putting about 50 bacteria on a leaf wound. Symptom occurrence was scored daily for a week. Symptoms are classified in four stages as defined by Lebeau and associates (2008): stage 0, no symptom; stage 1, maceration of the area around the bacterial suspension droplet; stage 2, maceration extending to the other half of the leaf and along the central vein; stage 3, total maceration of the leaf including the petiole. At least three independent experiments were performed. The proportion of full symptomatic leaves was compared between the WT strain and mutant groups using the Fisher's exact test. Statistical significance was defined as $P = 0.05$. Results of a typical experiment are presented.

Table 3. Expression of transcriptional fusions and effect of regulator mutations and plant extract addition[a]

Fusion	Regulator mutation	Plasmid	Specific activity (nmol min^{-1} mg^{-1}) in	
			Glycerol	Glycerol + plant extract
lfaA::uidA	…	…	7 ± 3	874 ± 305
lfaA::uidA	*lfaR*	…	504 ± 102	395 ± 96
lfaA::uidA	*lfaR*	pI3366 *lfaR*$^+$	191 ± 57	433 ± 131
lfbB::uidA	…	…	7 ± 4	10 ± 3
lfbB::uidA	*lfbR*	…	9 ± 5	…
lfcK::uidA	…	…	212 ± 68	209 ± 27
lfcK::uidA	*lfcR*	…	18,823 ± 1136	…
lfcK::uidA	*lfcR*	pI3133, *lfcR*$^+$	6,178 ± 596	…
lfdP::uidA	…	…	0	0
lfdP::uidA	*lfdR*	…	0	…
lfeW::uidA	…	…	4 ± 3	3 ± 2
lfeW::uidA	*lfeR*	…	4,464 ± 403	…
lfeW::uidA	*lfeR*	pI3156, *lfeR*$^+$	272 ± 80	…
lffE::uidA	…	…	12 ± 5	15 ± 3
lffE::uidA	*lffR*	…	9,037 ± 927	…
lfgN::uidA	…	…	13 ± 4	226 ± 74
lfgN::uidA	*lfgR*	…	1,608 ± 234	1,796 ± 269
lfgN::uidA	*lfgR*	pI3367 *lfgR*$^+$	971 ± 272	1,013 ± 234

[a] Cells were grown at 30°C in minimal medium containing glycerol (2 g liter^{-1}), with or without the addition of a chicory leaf extract (1%, vol/vol) as inducer. The results reported for β-glucuronidase activities are the mean value of at least three independent experiments and the corresponding standard deviations are indicated.

the *lfgN* fusion was very highly expressed in the macerated tissue (Fig. 5A). The *lfaA* fusion was also expressed at a high level, similar to that observed for *pelD*. The *lfcK* and *lffE* fusions were expressed at low levels and no detectable expression of *lfbB, lfdP*, and *lfeW* was observed.

To determine whether the expression of these genes varies according to the host plant, expression of the *lfaA*, *lfcK, lfdP, lffE*, and *lfgN* fusions was also assayed in *Arabidopsis*. Although chicory leaf inoculations were classically performed at 30°C, expression of the fusions in *Arabidopsis* was measured at 27°C and also at 19 and 24°C, the usual condition for *Arabidopsis* pathogenicity tests (Fig. 5B). The fusion expression was measured in leaves exhibiting the initial stage of maceration (Fig. 4, stage 1). At both temperatures, the *lfaA* and *lfgN* fusions were expressed at a level comparable with that observed for the *pelD* fusion while the *lcfK* fusion was expressed at a low level and no detectable expression of *lfdP* or *lffE* was observed.

Table 4. *Erwinia chrysanthemi* strains, plasmids, and oligonucleotides

E. chrysanthemi	Genotype, description[a]		Reference, origin
Strains			
3937	Wild-type strain		Laboratory collection
A4698	*lfaR*::Cm		This work
A4391	*lfaA*::*uidA*-Km		This work
A4797	*lfaR*::Cm *lfaA*::*uidA*-Km		This work
A4593	*lfbR*::Cm		This work
A4657	*lfbB*::*uidA*-Km		This work
A4792	*lfbR*::Cm *lfbB*::*uidA*-Km		This work
A4595	*lfcR*::Cm		This work
A4675	*lfcK*::*uidA*-Km		This work
A4793	*lfcR*::Cm *lfcK*::*uidA*-Km		This work
A4676	*lfdR*::Cm		This work
A4654	*lfdP*::*uidA*- Km		This work
A4789	*lfdR*::Cm *lfdP*::*uidA*-Km		This work
A4646	*lfeR*::Cm		This work
A4925	*lfeW*::*uidA*-Km		This work
A4928	*lfeR*::Cm *lfeW*::*uidA*-Km		This work
A4696	*lffR*::Cm		This work
A4379	*lffE*::*uidA*-Km		This work
A4790	*lffR*::Cm *lffE*::*uidA*-Km		This work
A4662	*lfgR*::Cm		This work
A4420	*lfgN*::*uidA*-Km		This work
A4791	*lfgR*::Cm *lfgN*::*uidA*-Km		This work
A4415	*pelD*::*uidA*-Km		HCP 1992[b]
Plasmids			
pGEM-T	Vector for direct cloning of polymerase chain reaction (PCR) product, Ap^r		Promega
pI3073	pGEM-T derivative with a 0.95-kb PCR fragment, *'lfaR'*		This work
pI3366	pGEM-T derivative with a 1.3-kb PCR fragment, *lfaR*		This work
pI3031	pGEM-T derivative with a 1.05-kb PCR fragment, *'lfaA'*		This work
pI3128	pGEM-T derivative with a 1.1-kb PCR fragment, *lfbR*		This work
pI3173	pGEM-T derivative with a 1.1-kb PCR fragment, *lfbB'*		This work
pI3133	pGEM-T derivative with a 1.15-kb PCR fragment, *lfcR*		This work
pI3176	pGEM-T derivative with a 1.15-kb PCR fragment, *'lfcK'*		This work
pI3174	pGEM-T derivative with a 1.15-kb PCR fragment, *'lfdR*		This work
pI3171	pGEM-T derivative with a 1.05-kb PCR fragment, *lfdP'*		This work
pI3156	pGEM-T derivative with a 1.2-kb PCR fragment, *lfeR*		This work
pI3276	pGEM-T derivative with a 1.15-kb PCR fragment, *lfeW'*		This work
pI3071	pGEM-T derivative with a 1.15-kb PCR fragment, *lffR'*		This work
pI3024	pGEM-T derivative with a 1.05-kb PCR fragment, *'lffE'*		This work
pI3175	pGEM-T derivative with a 1-kb PCR fragment, *'lfgR'*		This work
pI3367	pGEM-T derivative with a 1.3-kb PCR fragment, *lfgR*		This work
pI2862	pGEM-T derivative with a 1.2-kb PCR fragment, *lfgN*		This work
Oligonucleotides[c]			
lfaR	GCGGATCCTCAAAATTCGTGAAATCGC	GCTCTAGATCAGCTGAAGCTGTAACAAC	...
lfaR$_2$	GCGGATCCGCCTTTTTCTGGTGATG	GCTCTAGACTCAGGCATCATATAAATCGG	...
lfaA	GCGGATCCATTGAAACATTGGGTATTGC	GCTCTAGATCCTGTAACAGGCAGG	...
lfbR	GCGGATCCTGGCTGTTCAGCCTG	GCTCTAGATAAGCTTGAACGCAATC	...
lfbB	GCGGATCCGGCGTACAGTTGATGG	GCTCTAGACCACTTTGGATTTGGCG	...
lfcR	GCGGATCCGTGATATGACCAAAGACG	GCTCTAGACGATGATACCCGTCTC	...
lfcK	GCGGATCCCGGCACGTTATCAGC	GCTCTAGACGGCTCATCTGTTGCTG	...
lfdR	GCGGATCCACAGTATCACGGGTGTTG	GCTCTAGATTATCTGGTGTTCCATGACACC	...
lfdP	CGCCAAGATCTCCTTCGGCC	GCTCTAGATTCTTGTGGTGGTTCCAC	...
lfeR	GCGGATCCACGAAACGGACGCC	GCTCTAGATGCACATCAGCCAGCG	...
lfeW	GCGGATCCCGCCACACAAAGC	GCTCTAGAGCGACGTTCTTCAGC	...
lffR	GCGGATCCCTGCGACTTCG	GCTCTAGAAGACTGTCAGGGTCATTG	...
lffE	GCGGATCCAAACAATAAAAGGGCC	GCTCTAGACGCGTTTTCTCCTTTCAG	...
lfgR	GCGGATCCGACGCTCAAAGATATTGCC	GCTCTAGACCGAATCCCTGATCTTCAG	...
lfgR$_2$	GCGGATCCACCGGCATTGCCAACAC	GCTCTAGATGGAAACGTTAGCAAGCGC	...
lfgN	GCGGATCCGACACGGTGTCGGTAATAC	GCTCTAGATGTTTTCAAACCCGTTTCTG	...

[a] Km = kanamycin, Cm = chloramphenicol, and Ap^r = ampicillin resistant.
[b] HCP = Hugouvieux-Cotte-Pattat and associates (1992).
[c] Restriction sites are underlined.

Effect of plant extracts on the expression of the genetic fusions in the potential target genes.

To determine whether the expression of the transcriptional fusions is induced by a plant component, we assayed the fusions in various culture media. The expression of each fusion in the potential target genes was analyzed in glycerol minimal medium supplemented, or not, with 1% chicory leaf extract (Table 3). No expression of the *lfdP* fusion was detected in both media. In glycerol minimal medium, fusions in *lfaA*, *lfbB*, *lffE*, and *lfgN* were expressed at a low basal level whereas the *lfcK* fusion was more highly expressed than the other. Addition of the plant extract did not modify the expression of *lfbB, lfcK, lfdP, lfeW*, and *lffE*. In contrast, both the *lfaA* and *lfgN* fusions were clearly induced in the presence of the extract, with induction ratios of 125 and 17, respectively. The level of *lfaA* expression in the presence of the plant extract nearly reached the derepressed level observed in the *lfaR* mutant (Table 3). The expression of the *lfgN* fusion after addition of the plant extract remained lower than that reached in the *lfgR* mutant (Table 3), indicating that this extract provokes only a partial induction of *lfgN*.

Various sugars or plant compounds were then tested for a potential effect on the expression of the *lfaA* and *lfgN* fusions. None of the following compounds showed an inducing effect: arabinogalactan, L-arabinose, arbutine, cellobiose, D-fructose, L-fucose, D-galactose, D-galacturonate, D-glucose, D-glucuronate, D-mannose, pectin, polygalacturonate, L-rhamnose, rhamnogalacturonan, salicine, sucrose, or D-xylose. Thus, the inducer or inducers of the *lfaA* and *lfgN* genes remain to be determined.

DISCUSSION

Among the 18 regulators of the LacI family encoded by the *E. chrysanthemi* 3937 genome, 7 regulators are involved in totally unknown pathways. They were designated as LfaR, LfbR, LfcR, LfdR, LfeR, LffR, and LfgR. Homologous proteins are encoded by other bacterial genomes but no function has been assigned to them. The five regulators LfaR, LfdR, LfeR, LffR, and LfgR are conserved in the closely related pectinolytic species, *E. carotovora* (67 to 78% identity) (Table 1). LfbR homologs are encoded only by plant-associated bacterial genera, such as *Rhizobium* and *Agrobacterium*. LfcR homologs are

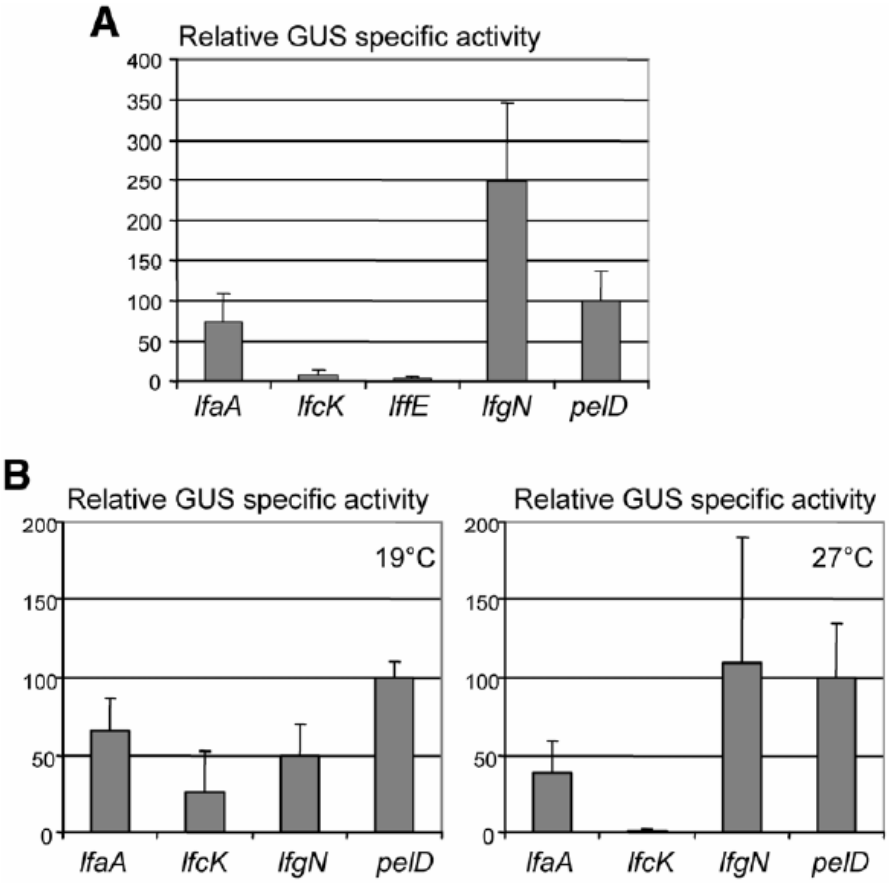


Fig. 5. Expression of the structural genes during plant infection. **A,** Chicory leaves or **B,** *Arabidopsis* plants were infected with strains containing a *uidA* fusion. A fusion in the *pelD* gene was used as the positive control in each experiment and β-glucuronidase (GUS) activities are expressed as a percentage of the *pelD* fusion. After incubation for **A,** 24 h at 30°C or **B,** 24 h at 27°C or 48 h at alternating temperatures of 19 and 24°C during night (16 h) and day (8 h) conditions, respectively, the macerated tissue was recovered to perform bacterial cell numeration and a GUS assay with either **A,** *p*-nitrophenyl-β-D-glucuronide or **B,** 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide as substrate (see experimental procedures). To facilitate comparison between the different experiments and assay methods, GUS activities were expressed as a percentage of the *pelD* fusion, chosen as reference. The results of the specific activity reported are the mean value of **A,** 12 leaves for chicory leaves and **B,** four plants for *Arabidopsis*, and the corresponding standard deviations are indicated. No data are reported for the *lfbB, lfdP*, and *lfeW* fusions because no GUS activity could be detected after infection with these strains. Similarly, no GUS activity was detected when the wild-type strain was used as negative control.

found in distant bacterial genera, such as *Chromobacterium* and *Vibrio*. The genetic environment of each regulator was examined to detect conserved adjacent genes that could constitute functional units. The seven regulators of the LacI family are clustered with genes encoding putative enzymes and transport systems of different families, either the major facilitator superfamily (MFS), the ATP binding cassette (ABC) family, or the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) family (Fig. 1; Table 2). In some cases, homologies have been detected for the potentially encoded enzymes. However, the identity scores are insufficient to predict the function of the selected regions. To gain information on these regulators, we inactivated the corresponding genes and we constructed transcriptional fusions in potentially controlled adjacent genes. Then, we analyzed the behavior of each regulator mutant and fusion after plant infection.

Locus lfa. The pathogenicity of the *lfaR* mutant is affected on the different plants tested, with a decreased maceration on chicory leaves and an attenuated virulence on whole plants (Figs. 2 through 4). The gene *lfaR* is adjacent to two genes, *lfaT* and *lfaA*, which are probably cotranscribed (Fig. 1). This cluster of three genes is conserved, with the same genetic organization , in the genome of other pathogenic enterobacteria, *E. carotovora, Yersinia pestis, Y. pseudotuberculosis, Shigella sonnei*, and in some *Escherichia coli* strains (Table 1). The gene *lfaT* encodes an MFS permease. The gene *lfaA* encodes a member of the glycosylhydrolase family 31 (Coutinho et al. 2003). In addition to proteins of undetermined function, this family includes α-glucosidases, glucoamylases, sucrase-isomaltases, α-xylosidases, α-glucan lyases, and isomaltosyltransferases. Thus, enzymes of the family GH31 cleave different α-glycosidic linkages (1-1, 1-2, 1-3, 1-4, and 1-6) in various substrates. We observed that the gene *lfaA* is highly expressed during plant infection and is specifically induced by a plant component (Table 3). LfaR acts as a repressor of *lfaA* expression and probably responds to an inducer of plant origin. These preliminary data suggest that the *lfa* locus is involved in the degradation of a plant component containing an α-glucosidic bond, such as a glycoside or an oligosaccharide. The decreased virulence of the *lfaR* mutant suggests a role of the *lfa* substrate in the plant–bacteria interaction. Recently, deletion of a homologous cluster (*aec-35-36-37*) included in a genomic island of an extraintestinal avian-pathogenic *E. coli* strain was shown to attenuate the virulence for chickens (Chouikha et al. 2006). The conservation of this locus in pathogenic enterobacteria and its involvement in the virulence of an animal pathogen suggest that the *lfa* substrate is a general signal involved in the interaction between pathogenic enterobacteria and their eukaryotic hosts. The characterization of the *lfa* substrate would be very useful in acquiring information about this locus and in understanding its role in pathogeny.

Locus lfb. LfbR is not involved in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* on all the tested plants. The best identity score of LfbR was found with a *Rhizobium* protein (Table 1). An LfbR homolog is also encoded by *E. carotovora* but the low identity score suggests that this homolog is not an LfbR ortholog. Five genes are clustered with *lfbR* on the *E. chrysanthemi* chromosome. They encode a putative enzyme (LfbE) and the four elements of an ABC transporter, including the periplasmic binding protein LfbB (Table 2; Fig. 1). The genes *lfb* seem to be organized in a large operon, with the last gene encoding the regulator. This type of organization appears to be quite frequent because it is also observed for the *lfc*, *lff*, and *lfg* loci (Fig. 1). The gene *lfbB* is not expressed in planta and LfbR has no repressor effect on *lfbB* expression. Similar results were obtained by analysis of a transcriptional fusion in *lfbE* (data not shown). Thus, LfbR is either a positive regulator of the *lfb* operon or it is not involved in its transcription. Positive regulators are not frequent in the LacI family but some cases have been experimentally demonstrated (Bausch et al. 1998).

Locus lfc. The virulence of the *lfcR* mutant is strongly affected on whole plants and, to a lesser extent, on chicory leaves (Figs. 2 through 4). LfcR homologs are present in only a few bacteria, including *Chromobacterium* and *Vibrio* spp. (Table 1). LfcR shares 31% identity with the regulator ScrR involved in sucrose catabolism but a true ScrR ortholog is encoded by the *E. chrysanthemi* genome (Table 1). The four genes clustered with *lfcR* encode an MFS transporter, two hypothetical proteins, and a putative sugar kinase, LfcK (Table 2; Fig. 1). We show here that LfcR is a repressor of *lfcK* expression (Table 3). The *lfcK* gene is quite highly expressed in liquid cultures (Table 3). Its expression is not induced in the presence of sucrose (data not shown). However, the *lfcK* gene appeared to be moderately expressed in planta. Complementary analysis of the phenotype of the *lfcR* mutant revealed a decreased production of the extracellular enzymes, pectinases, cellulases, and proteases compared with the wild-type strain (data not shown). Thus, LfcR positively controls the genes encoding these enzymes. This positive regulation could be either direct or indirect; for instance, resulting from a cascade of regulation or from the modification of the physiological state in the mutant. To understand the LfcR effect better, it would be interesting to perform a transcriptome analysis of the *lfcR* mutant to identify the other direct or indirect targets of the regulator. In any case, the reduced virulence of the *lfcR* mutant could be explained by the decreased production of extracellular plant cell-wall-degrading enzymes, which are the main *E. chrysanthemi* factors causing maceration.

Locus lfd. The *lfdR* mutant was more efficient than the wild-type strain in initiating maceration on whole plants (Fig. 3). LfdR shares 46% identity with the *Escherichia coli* AscG regulator whose function has not been clearly characterized. LfdR homologs are also found in *Erwinia carotovora* and *Salmonella* spp. (Table 1). The gene *lfdR* is situated in the vicinity of three genes encoding the components of the sugar-specific enzyme II of a PTS transporter (Table 2; Fig. 1) and of the gene *lfdP*, which encodes a member of the glycoside hydrolases family 1 (Coutinho et al. 2003). Considering its homologs, LfdP is predicted to be a 6-phospho-β-glucosidase. The gene *lfdP* is not expressed either in vitro or in planta and no regulation of *lfdP* by LfdR could be detected. Thus, LfdR probably regulates other targets. Contrary to the other LacI family regulators involved in pathogenicity, the inactivation of *lfdR* appears to favor the initiation of infection (Fig. 3). Such a phenotype was previously observed for a *pecS* mutant (Reverchon et al. 2002). PecS is a global regulator that represses the expression of several virulence factors necessary in the first steps of infection. Because the *pecS* mutation accelerates pectate lyase production, the initiation of maceration is facilitated. LfdR does not affect pectate lyase production (data not shown) but it could control the production of other virulence factors. A transcriptome analysis of the *lfdR* mutant could reveal potential LfdR targets involved in the early steps of pathogeny.

Locus lfe. The *lfeR* mutant showed a reduced virulence on *Arabidopsis* (Fig. 4). Homologs of LfeR are detected in various bacteria, mostly found in soil or associated with plants, including *E. carotovora*, *Ralstonia* spp., and *Streptomyces* spp. (Table 1). Only one gene is grouped with *lfeR* on the *E. chrysanthemi* chromosome and it encodes a putative enzyme, LfeW (Table 2; Fig. 1). LfeR acts as a repressor of *lfeW* expression and the *lfeW* gene is weakly expressed in planta. In the absence of additional data, it is not clear why the derepression of *lfeW* would provoke the reduced virulence of the *lfeR* mutant.

Locus lff. LffR is not involved in *E. chrysanthemi* virulence. A homolog of LffR is found in *E. carotovora* and also in various bacteria which are not associated with plants, such as *Mann-*

heimia, *Thermoanaerobacter*, and *Bacillus* spp. (Table 1). Five genes are clustered with *lffR* on the *E. chrysanthemi* chromosome (Table 2; Fig. 1). They encode a hypothetical protein, an MFS transporter, and three putative enzymes, including a protein, LffE, sharing 27% identity with IolE, an enzyme involved in myo-inositol catabolism (Yoshida et al. 2004). LffR is a repressor of *lffE* expression. The *lffE* gene is moderately expressed in planta. We verified that *lffe* expression is not induced in the presence of myo-inositol (data not shown). Thus, the *lff* locus is probably involved in the degradation of a compound present in the environment that could be related to inositol.

Locus lfg. Despite the fact that LfgR homologs are encoded only by the plant-associated bacteria *E. carotovora*, *Rhizobium* spp., and *Agrobacterium* spp. (Table 1), the virulence of the *lfgR* mutant is not affected in the tested conditions. The five genes clustered with *lffR* (Fig. 1) encode the four elements of an ABC transporter and a putative enzyme, LfgN, sharing 44% identity with RhiN, which is involved in rhamnogalacturonan catabolism (Hugouvieux-Cotte-Pattat 2004). The role of RhiN is to cleave, by an unknown mechanism, the small oligomers generated by a rhamnogalacturonan lyase. The gene *lfgN* is highly expressed in planta and is specifically induced by a plant component (Table 2). LfgR acts as a repressor on *lfgN* expression and could respond to the plant inducer. Because the *rhiN* expression is induced in the presence of galacturonate and rhamnose, we tested the effect of these compounds on *lfgN*. Neither galacturonate, polygalacturonate, rhamnose, nor rhamnogalacturonan induced the *lfgN* expression. Thus, the *lfg* locus is probably involved in the degradation of another type of plant cell wall oligosaccharide.

In summary, analysis of transcriptional fusions demonstrated that five regulators of the LacI family, LfaR, LfcR, LfeR, LffR, and LfgR, act as the repressors of an adjacent gene. The regulators of the LacI family are often repressors of the transcription of the controlled genes. Among the 14 LacI regulators of *Escherichia coli* K-12, there is one case of positive regulation (IdnR) (Bausch et al. 1998) and one case of dual control because FruR could act as either a positive or negative regulator, depending on the target (Ramseier et al. 1995). The inactivation of a repressor leads to a derepression of the controlled genes that can be easily detected. In contrast, to observe the effect of activator inactivation it is necessary to know the conditions in which the controlled gene is expressed. Thus, an absence of any effect of the regulator mutation does not always mean an absence of control. The data obtained with LfbR and LfdR result from either an absence of control of the tested adjacent genes or a positive regulation not detectable in our conditions. However, no expression of the *lfb* and *lfd* fusions could be detected in planta, indicating that, even if they are positively regulated, no activation of these genes occurs in the macerated tissue.

Among the five genes controlled by the adjacent repressors, four are expressed during plant infection. Most often the expression of a locus is linked to its involvement in pathogeny. This is clear for the gene *lfa*, which is highly expressed during infection, and also for the genes *lfc* and *lfe*, which are expressed in planta. The gene *lfg* is the only example in our study for which a high expression in planta is not associated with an effect on virulence. This suggests that the locus *lfg* has an accessory role during plant infection or that it has a role in other untested host plants. Further analysis of the fusions demonstrated that two of them are specifically induced by the addition to the culture medium of a crude plant extract, corresponding to a plant juice. The plant extracts probably induce the genes *lfa* and *lfg* by derepression of the LacI-family regulators LfaR and LfgR, respectively. The next challenge, of course, will be to identify the inducers of the *lfa* and *lfg* loci.

A few regulators of the LacI family have already been shown to be involved in bacterial virulence against animals. PtxS, a LacI family regulator of *P. aeruginosa,* is a negative regulator of the *kgu* operon involved in 2-ketogluconate utilization (Swanson et al. 2000) but it is also involved in the activation cascade of exotoxin A by a poorly understood mechanism (Colmer and Hamood 1998). In *Streptococcus pneumoniae*, two LacI family regulators are involved in the adaptive response to the host. Both RegM and RegR have a dual function. RegM is a repressor of some enzymes but it activates biosynthesis of the capsular polysaccharide. RegR modulates virulence by repression of hyaluronidase and activation of adherence to animal cells (Chapuy-Regaud et al. 2003). Interestingly, as was observed in our study for three *Erwinia chrysanthemi* regulators of the LacI family, the virulence of the *ptxS*, *regM*, and *regR* mutants is attenuated (Colmer and Hamood 1998; Giammarinaro and Paton 2002).

Most known regulators of the LacI family are involved in degradation pathways (Table 1). Catabolic pathways could be necessary for the assimilation of carbon sources during the saprophytic life of the bacteria. During the infection process, they can be important for the use of main or secondary carbon sources when bacterial multiplication is rapid. No difference was observed between the wild-type strain and the mutants constructed in this study for their growth in rich or minimal media complemented with either sugars or plant extracts (data not shown). Alternatively, degradative enzymes can serve to eliminate toxic compounds or plant elicitors, thus increasing the bacterial fitness or altering the plant resistance. Notably, three mutants inactivated for a repressor of the LacI family (LfaR, LfcR, and LfeR) showed a reduced virulence, provoking attenuated symptoms or a delay in their appearance. This indicates that the correct production of virulence factors is influenced either directly or indirectly by these regulators. The *lfaR* mutant also showed an alteration in bacterial growth during the first steps of infection, suggesting that it is affected for early adaptation to the plant environment. Because a range of virulence factors has been characterized in *E. chrysanthemi*, we evaluated the impact of the regulator mutations on extracellular enzymes, exopolysaccharide, and indigoidine. The sole difference was a decrease of pectate lyase, cellulase, and protease production in the *lcfR* mutant (data not shown). Thus, inactivation of LcfR suggested a positive regulatory effect on the production of extracellular degrading enzymes. It would be interesting to analyze whether LcfR directly acts on these virulence genes or whether perturbations in the regulation of the Lcf-related pathway could indirectly affect virulence.

In conclusion, the analysis of regulators of the LacI family allows identification of four additional regulators which are important for *E. chrysanthemi* virulence, namely LfaR, LfcR, LfdR, and LfeR. The inactivation of *lfdR* favors the initiation of soft rot, as observed for other negative regulators. In contrast, the inactivation of LfaR, LfcR, and LfeR results in a delayed or decreased virulence. These three regulators negatively control genes involved in the transport and catabolism of unknown substrates. The derepression of these putative catabolic pathways results in an attenuated virulence, suggesting that subtle metabolic changes could alter the proper production of bacterial factors leading to a successful infection.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, and growth conditions.

The bacterial strains of *E. chrysanthemi* and the plasmids used in this study are listed in Table 4. The phage Phi-EC2 was used to transfer the *uidA*-Km fusions in the regulator mutants by generalized transduction (Resibois et al. 1984). *E. chrysan-*

themi cells were grown at 30°C in minimal medium M63 or Luria-Bertani (LB) rich medium (Miller 1972). Carbon sources were added to minimal medium at 2 g liter^{-1}. The plant extract, a crude juice obtained from chicory leaves and sterilized by filtration through 0.45 µ, was used at the final concentration of 1% (vol/vol). The media were solidified with agar (15 g liter^{-1}). When required, antibiotics were added at the following concentrations: Km, 20 µg ml^{-1}; ampicillin (Ap), 50 µg ml^{-1}; or Cm, 20 µg ml^{-1}.

Recombinant DNA techniques.

Preparation of plasmid or chromosomal DNA, restriction digestions, ligations, DNA electrophoresis, and transformations were carried out as previously described (Sambrook et al. 1989). Sequence data were obtained from the genome sequencing project for the *E. chrysanthemi* strain 3937.

Polymerase chain reaction (PCR) primers (19 to 30 mers) were designed to amplify approximately 1 kb of *E. chrysanthemi* 3937 chromosomal DNA overlapping the selected gene (Table 4). Restriction sites were added to each primer to facilitate determination of the DNA orientation in the vector (*Bam*HI or *Bgl*II at the 5′ end and *Xba*I at the 3′ end). The PCR products were purified (QIAquick PCR purification kit, Qiagen), and ligated to the pGEM-T vector (Promega) which has a protruding T nucleotide at each 3′ end. To construct nonpolar insertions, each regulator gene was inactivated by insertion of the CKC15 Cm^r cassette (Lebeau et al. 2008) into a restriction site situated inside the corresponding open reading frame. The following sites were used: *Hinc*II for *lfaR* and *lfdR*, *Ehe*I for *lfbR*, *Sal*I for *lfcR* and *lffR*, *Eco*RV for *lfeR*, and *Sac*II for *lfgR*.

Genetic fusions were constructed on selected structural genes by insertion of *uidA*-Km cassettes (Bardonnet and Blanco 1992) into a restriction site situated inside the corresponding open reading frame. The following sites were used: *Eco*RI for *lfaA* and *lfbB*, *Hinc*II for *lfcK*, *Mam*I for *lfdP*, *Sac*II for *lfeW* and *lfgN*, and *Eco*47III for *lffE*. The orientation of the *uidA*-Km cassette was determined by restriction analysis. Only plasmids in which *uidA* and the mutated gene have the same transcriptional direction were retained.

Plasmids bearing the Cm^r or *uidA*-Km^r insertions were then introduced into *E. chrysanthemi* cells by electroporation. The insertions were integrated into the *E. chrysanthemi* chromosome by marker exchange recombination after successive cultures in low-phosphate medium, in the presence of the appropriate antibiotic (Roeder and Collmer 1985). Verification of the correct recombination of the insertions was performed by PCR using the primers designed for cloning the corresponding gene (Table 4).

Pathogenicity tests.

Chicory leaves were inoculated as previously described (Hugouvieux-Cotte-Pattat 2004). Prior to infection, leaves were slightly wounded in their center to define the inoculation site. Twelve leaves were infected for each strain using 10^6 bacteria (10 µl of a suspension at 10^8 bacteria/ml). After incubation in a dew chamber for 24 h at 30°C, the length of rotted tissue was measured to estimate the disease severity.

Saintpaulia and *Arabidopsis* plants were inoculated as described by Lebeau and associates (2008). Briefly, 1-month-old *Saintpaulia* cuttings were inoculated by wounding the lower part of the leaf followed by infiltration of a bacterial suspension at 10^8 or 10^7 bacteria/ml in 100 mM KCl with a 1-ml syringe without a needle; 6-week-old *Arabidopsis* plants were inoculated by wounding the leaf with a needle and then depositing a 5-µl drop of KPO_4 buffer (50 mM, pH 7) containing 50 bacteria. The plants were incubated at saturated humidity and in short-day conditions (8 h of light). For virulence analysis, symptoms were scored daily for a week. For assay of the gene fusions, the macerated tissue was recovered at 24 or 48 h after incubation at either 27°C or alternating temperatures of 19 and 24°C during night (16 h) and day (8 h) conditions, respectively.

Enzyme assays.

β-Glucuronidase activity was measured to estimate the expression of the fused genes (Bardonnet and Blanco 1992). Samples were taken at the end of the exponential growth phase and toluene was added to disrupt the cells. The degradation of *p*-nitrophenyl-β-D-glucuronide into *p*-nitrophenol was followed at 405 nm. Specific activity is expressed as nmol of product liberated per minute per milligram of bacterial dry weight.

Expression of fusions in planta.

For chicory leaves, the plant macerated tissue was recovered after infection and used to perform bacterial cell numeration and β-glucuronidase assay. The number of colony-forming bacteria was determined by serial dilutions on LB plates containing kanamycin. The results of enzyme assays were normalized to account for the number of bacteria present in each sample. The β-glucuronidase-specific activity was calculated in nmol of product formed per 10^9 bacteria. This specific activity is representative of the level of fusion expression in the macerated tissue. For expression in chicory leaves, after 24 h of infection at 30°C, macerated tissue was recovered and mixed with the same volume of KPO_4 buffer, 100 mM, pH 7. β-Glucuronidase assay was performed by following the degradation of 1 mM *p*-nitrophenyl-β-D-glucuronide in the same buffer, using 50 µl of samples in a 1-ml final reaction mixture. For expression in *Arabidopsis*, 6-week-old plants were inoculated, as described above, and incubated at either 27 or 19 and 24°C for 24 or 48 h, respectively. Leaves exhibiting the initial stages of maceration (stage 1) were collected and crushed in 40 µl of KPO_4 buffer (50 mM, pH 7). These samples were used to perform bacterial cell numeration and β-glucuronidase assays using a protocol adapted from that described by Jefferson and associates (1987). Samples (10 µl each) were incubated with 1 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide in a 200-µl final reaction mixture. Fluorescence was measured with excitation at 360 nm and emission at 460 nm at 1-min intervals for 60 min using a CytoFluor 4000 multiwell plate reader fluorimeter (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, U.S.A.). For the different plants, the wild-type strain used as negative control gave no detectable β-glucuronidase activity. A fusion in the *pelD* gene was used as the positive control in each experiment (Masclaux et al. 1996). To facilitate comparison between the different experiments and assay methods, β-glucuronidase activities were expressed as a percentage of the *pelD* fusion, chosen as reference.

In planta bacterial growth.

Six to eight *Arabidopsis* leaves were infected after wounding by deposit of a bacterial suspension droplet containing approximately 50 bacteria. In planta bacterial growth was assessed 24 h after incubation at alternating temperatures of 19 and 24°C during night (16 h) and day (8 h) conditions (stage 0). Inoculated leaves were dried to eliminate the inoculation droplet and ground in 50 mM KPO_4 buffer, pH 7. The number of bacteria present in the resulting extract was determined by serial dilutions on LB plates. The bacterial numerations were performed in at least three independent experiments. A linear regression model where numeration has been $\log_{10}$ transformed to normalize the data was carried out to assess the effect of mutations compared with the wild-type strain as reference. Ef-

fect of a mutation was considered to be significant when the corresponding parameter in the regression was significantly different from 0 (P value <0.05).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Effantin for her assistance with some experiments, L. Desquilbert for his assistance with statistical analysis, G. Condemine for reading the manuscript, and the members of the *Erwinia* groups in Lyon and Paris for their helpful discussions. We acknowledge members of the International *Erwinia* Consortium for the exchange of unpublished data concerning the *E. chrysanthemi* 3937 genome. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche and was initiated with the Programme Microbiologie 2003 (ACIM-2-17).

LITERATURE CITED

Aslanidis, C., Schmid, K., and Schmitt R. 1989. Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171:6753-6763.

Bardonnet, N., and Blanco, C. 1992. *'uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 72:243-247.

Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, C., Blais, T., Murray, E., Lowary, T., and Conway, T. 1998. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in Escherichia coli. J. Bacteriol. 180:3704-3710.

Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P., Birch, P. R., Parkhill, J., and Toth, I. K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:11105-11110.

Chapuy-Regaud, S., Ogunniyi, A. D., Diallo, N., Huet, Y., Desnottes, J. F., Paton, J. C., Escaich, S., and Trombe, M. C. 2003. RegR, a global LacI/GalR family regulator, modulates virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 71:2615-2625.

Chouikha, I., Germon, P., Brée, A., Gilot, P., Moulin-Schouleur, M., and Schouler C. 2006. A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. J. Bacteriol. 188:977-987.

Colmer, J. A., and Hamood, A. N. 1998. Characterization of *ptxS*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene which interferes with the effect of the exotoxin A positive regulatory gene, *ptxR*. Mol. Gen. Genet. 258:250-259.

Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., and Henrissat, B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. J. Mol. Biol. 328:307-317.

Delangle, A., Prouvost, A.-F., Cogez, V., Bohin, J.-P., Lacroix, J.-M., and Hugouvieux Cotte-Pattat, N. 2007. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi gan* locus involved in galactan catabolism. J. Bacteriol. 189:7053-7061.

Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.-F., Gaymard, F., and Expert, D. 2005. Siderophore-mediated up-regulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. Plant J. 43:262-272.

Giammarinaro, P., and Paton, J. C. 2002. Role of RegM, a homologue of the catabolite repressor protein CcpA, in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 70:5454-5461.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. The RhaS activator controls the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes *rhiN*, *rhiT* and *rhiE* involved in rhamnogalacturonan catabolism. Mol. Microbiol. 51:1361-1374.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H., and Robert-Baudouy, J. 1992. Environmental conditions affect the transcription of the pectinases gene of *Erwinia chrysanthemi* 3937. J. Bacteriol. 174:7807-7018.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. 50:213-257.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 6:3901-3907.

Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert S., Kraepiel Y., Simon-Cote E., Nasser W., and Van Gijsegem, F. 2008. The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. Environ. Microbiol. 10:545-559.

Lewis, M. 2005. The Lac repressor. C. R. Biol. 328:521-548.

Masclaux C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., and Expert, D. 1996. Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyases in pathogenesis of African Violets. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:198-205.

Miller, J. H. 1972. A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Nasser W., Faelen M., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., and Reverchon S. 2001. Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* Mol. Plant-Microbe Interact. 14:10-20.

Ramseier, T. M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., and Saier, M. H. 1995. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 16:1157-1169.

Resibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, T., and Toussaint, A. 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. Virology 137:102-112.

Reverchon, S., Nasser, W., and Robert-Baudouy, J. 1991. Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* regulating pectin degradation. Mol. Microbiol. 5:2203-2216.

Reverchon, S., Nasser, W., and Robert-Baudouy, J. 1994. *pecS*, a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Microbiol. 11:1127-1139.

Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy J., and Nasser, W. 1997. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 179:3500-3508.

Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D., and Nasser, W. 2002. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. J. Bacteriol. 184:654-665.

Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gram-negative bacteria. Microbiology 150:3571-3590.

Roeder, D. L., and Collmer, A. 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 164:51-56.

Sambrook, J. E., Fritsch, F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Sepulchre, J. A., Reverchon, S., and Nasser, W. 2007. Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. J. Theor. Biol. 244:239-257.

Surgey, N., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. 1996. The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. J. Bacteriol. 178:1593-1599.

Swanson, B. L., Hager, P., Phibbs, P., Ochsner, U., Vasil, M. L., and Hamood, A. N. 2000. Characterization of the 2-ketogluconate utilization operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol. Microbiol. 37:561-573.

Titgemeyer, F., Jahreis, K., Ebner, R., and Lengeler, J. W. 1996. Molecular analysis of the *scrA* and *scrB* genes from *Klebsiella pneumoniae* and plasmid pUR400, which encode the sucrose transport protein Enzyme II Scr of the phosphotransferase system and a sucrose-6-phosphate invertase. Mol. Gen. Genet. 250:197-206.

Yang, S., Peng, Q., Zhang, Q., Yi, X., Choi, C. J., Reedy, R. M., Charkowski, A. O., and Yang, C. H. 2008. Dynamic regulation of GacA in type III secretion, pectinase gene expression, pellicle formation, and pathogenicity of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937). Mol. Plant-Microbe Interact. 21:133-142.

Yoshida, K., Yamaguchi, M., Ikeda, H., Omae, K., Tsurusaki, K., and Fujita, Y. 2004. The fifth gene of the *iol* operon of *Bacillus subtilis*, *iolE*, encodes 2-keto-myo-inositol dehydratase. Microbiology 150:571-580.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

J. Craig Venter Institute genome sequencing project: www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html

Wisconsin School of Veterinary Medicine Genome-Evolution Laboratory: asap.ahabs.wisc.edu/genome-evolution-laboratory

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : **WLODARCZYK** DATE de SOUTENANCE : **22 mars 2010**
(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : **Aleksandra**

TITRE : **RECHERCHE DE SIGNAUX MOLECULAIRES VEGETAUX IMPLIQUES DANS L'INDUCTION DE GENES CHEZ LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE *ERWINIA CHRYSANTHEMI (DICKEYA DADANTII)***

NATURE : Doctorat Numéro d'ordre : 2010-ISAL-0019

Ecole doctorale : **E2M2** (Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation)

Spécialité : **Microbiologie environnementale**

Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 / et bis CLASSE :

RESUME : *Dickeya dadantii* est une bactérie responsable de pourritures sur un large spectre de plantes. Sa virulence est principalement due à la sécrétion d'enzymes dégradant la paroi végétale. Ce travail de thèse a porté sur l'identification de molécules jouant un rôle de signal dans les interactions entre plantes et bactéries. Divers phytoconstituants sont connus être impliqués dans les phénomènes de communication entre plantes et microorganismes. Chez *D. dadantii*, nous avons caractérisé deux régions génomiques, *lfa* et *lfg*, codant des protéines exprimées seulement lors de l'infection de plantes ou en présence d'extraits végétaux. Leur expression est modulée par des répresseurs agissant différemment en présence ou absence d'inducteur. Ces régulateurs, LfaR et LfgR, contrôlent également l'expression de gènes permettant le transport de l'inducteur dans le cytoplasme bactérien. Après mise au point d'un test de criblage, la recherche de l'inducteur végétal a été réalisée à partir d'extraits de feuilles d'endive et de tubercules de pomme de terre. Plusieurs étapes chromatographiques ont permis d'obtenir plusieurs fractions actives, dont une très fortement. Cette fraction provenant de pomme de terre contient seulement deux composés qui ont été purifiés. Le composé majeur a été identifié comme étant un nucléoside, la guanosine, mais cette molécule pure n'a pas d'activité inductrice. La quantité de l'autre composé était insuffisante pour permettre l'identification de cette molécule active. Les résultats de ce travail montrent l'implication et le mécanisme d'action de petites molécules hydrophiles agissant comme signaux dans l'interaction entre la plante et *D. dadantii*.

MOTS-CLES : *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, activité biologique, régulation génétique, molécule signal, fractionnement bioguidé, interaction plante-bactérie

Laboratoire (s) de recherche : Microbiologie, Adaptation et Pathogénie UMR 5240 CNRS-UCBL-INSA-BayerCropScience,
Domaine Scientifique de la Doua, Bat. André Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois
69622 Villeurbanne Cedex
et
CESN UMR 5557 CNRS-UCBL
Bat. Forel, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex

Directeur de thèse: Mme HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT Nicole et Mr COMTE Gilles

Président de jury : Mr LEJEUNE Philippe

Composition du jury : Mr COMTE Gilles
Mr FAURE Denis
Mme HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT Nicole
Mr LEJEUNE Philippe
Mme LOJKOWSKA Ewa