



HAL
open science

Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes aux semences d'*Arabidopsis thaliana*

Stéphanie Pochon

► **To cite this version:**

Stéphanie Pochon. Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes aux semences d'*Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université d'Angers, 2012. Français. NNT: . tel-00999458v2

HAL Id: tel-00999458

<https://theses.hal.science/tel-00999458v2>

Submitted on 4 Nov 2014

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.

**Etudes des mécanismes moléculaires
impliqués dans la transmission des agents
pathogènes aux semences d'*Arabidopsis
thaliana***

Thèse de doctorat

spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

Ecole doctorale VENAM

Présentée et soutenue publiquement le 18 Septembre 2012

à la Faculté de Sciences

d'ANGERS

par Stéphanie POCHON

Devant le jury ci-dessous :

Mme Frédérique VAN GIJSEGEM

Mr Marc-Henri LEBRUN

Mme Isabelle DEBEAUJON

Mr Matthieu ARLAT

Mr David MACHEREL

Mme Claire CAMPION

Mme Marie-Agnès JACQUES

Mr Philippe SIMONEAU

Chargé de recherche (INRA Versailles)

Directeur de recherche (INRA Versailles)

Chargé de recherche (INRA Versailles)

Professeur de l'Université de Toulouse

Professeur de l'Université d'Angers

Maître de Conférences (Université Angers)

Chargé de recherche (INRA Angers)

Professeur de l'Université d'Angers

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Examinateur

Co-encadrante

Co-encadrante

Directeur de thèse

Directeur de thèse : Mr Philippe SIMONEAU

Co-directrice de thèse : Mme Julia BUITINK

Institut de Recherche en Horticulture et Semences

Equipes IRHS-EmerSys et IRHS-FungiSem

42 rue Georges Morel / 2 boulevard Lavoisier

49071 Beaucouzé Cedex / 49045 Angers

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de thèse déposé à l'Ecole Doctorale Végétal Environnement Nutrition Agroalimentaire Mer (VENAM) de l'Université d'Angers présente le travail que j'ai réalisé, dans le cadre de cette thèse de doctorat, depuis Octobre 2009 au sein de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences, dans les équipes IRHS-EmerSys (INRA) et IRHS-FungiSem (Université Angers).

Ce travail de thèse s'inscrit et est financé dans le cadre du programme QUALISEM financé par la région des Pays de la Loire (2009 – 2013). Un contrat de moniteur, d'une durée d'un an, m'a permis de découvrir l'enseignement universitaire.

Un article scientifique émanant de ce travail a été accepté au cours de l'année 2012 et plusieurs autres articles, concernant différents axes d'étude, sont actuellement en cours de rédaction. Ces travaux ont été présentés à plusieurs reprises dans des congrès nationaux et internationaux sous forme de posters.

La première partie de ce document a pour objectif de resituer ce travail dans son contexte scientifique et de restituer les connaissances bibliographiques sur la thématique de recherche. Suite à une description des différentes méthodologies employées au cours de ce travail, les résultats obtenus seront présentés en deux parties et traiteront successivement de la transmission des agents pathogènes aux graines et de la survie de ces microorganismes sur ces organes déshydratés. Enfin, la discussion générale associée aux perspectives présentera une vision globale et intégrée de ce travail de thèse.

REMERCIEMENTS

Les remerciements constituent la partie la plus personnalisée d'un mémoire de thèse dans le sens où elle permet de se projeter trois ans en arrière et de faire une rétrospective de tous les moments qui mis, bout à bout, ont façonnés cette aventure. Cette phrase prend d'autant plus son sens pour cette aventure de doctorat tant celle-ci fut riche aussi bien sur le plan scientifique que des rencontres. L'aspect scientifique sera développé dans le reste de ce document et comme je l'ai indiqué à plusieurs personnes, je voulais mettre un point d'honneur à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont suivie, encadrée, entourée, aidée, soutenue pendant ces trois ans avec un immense plaisir.

Je tiens à remercier les personnes qui ont accepté de prendre de leur temps pour juger ce travail: aux deux rapporteurs de cette thèse, Mme Frédérique Van Gijsegem et Mr Marc-Henri Lebrun ; et aux autres membres du jury, Mme Isabelle Debeaujon, Mr Matthieu Arlat et Mr David Macherel.

Je voudrais adresser mes remerciements aux personnes qui ont accepté de m'encadrer pendant trois ans. Philippe, mon directeur de thèse, je vous remercie de m'avoir présenté ce sujet de thèse et de m'avoir fait confiance pour que je m'y engage. Vous m'avez toujours suivie de très près depuis mon stage de Master 2, en passant par la rédaction des articles, puis par la correction de ce document sans oublier les nombreuses réunions de travail pour mener au mieux ce travail. Merci de vous être rendu disponible. Julia, ma co-directrice de thèse, vous avez toujours été disponible lors de mes comités de suivi de thèse, pour répondre à la moindre de mes questions, merci à vous. Je continuerai en remerciant mes quatre encadrants qui ont toujours su suivre au plus près ce travail mais également me laisser une liberté non négligeable. Marie Agnès, tu sais allier travail, rigueur et bonne humeur. Nos nombreuses discussions m'ont à chaque fois apporté une autre vision des choses qui me permettait d'avancer au mieux et de progresser dans ma réflexion scientifique, et en ça, je t'en remercie énormément. Merci pour ton investissement dans la correction de ce document. Armelle, tu as toujours fait preuve d'une grande rigueur lors de nos réunions de travail, dans tes corrections de divers documents, merci à toi. Claire, vous m'avez suivie depuis mon stage de Master 1 toujours avec une très grande rigueur et précision. Je pense que cela était nécessaire dans la mise en place de ce travail. Un grand merci pour votre confiance et votre implication dans cette thèse. Thomas, tu as suivi de plus loin la partie pathosystème mais nous avons débuté et travaillé ensemble sur l'histoire « Déhydrines » qui n'a pas été de tout repos, merci d'avoir toujours

gardé le cap. J'ai également fait mes premiers pas dans l'enseignement universitaire à tes côtés. Merci pour tes conseils avertis. Un GRAND merci à tous de m'avoir fait confiance et de m'avoir donnée les moyens de réussir ce travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier l'équipe MAEL (Claudine, Martine, Guillaume, Endrick, Thomas) du LIPM de Toulouse pour m'avoir accueillie très chaleureusement. Merci à Emmanuelle, Laurent et Matthieu pour votre pédagogie et d'avoir pris de votre temps lors de mes trois séjours.

Je poursuivrai ces remerciements en gardant cette philosophie de mixité qui a toujours été le fil rouge de cette thèse... .

Je voudrais commencer par remercier les personnes qui ont mis toute leur énergie pour mener à bien toutes les expérimentations nécessaires à ce travail : je veux bien évidemment parler d'Anne Préveaux, de Benjamin Priol et de Sandrine Pigné. Anne, merci pour ton investissement sans faille. Dans les derniers temps, je t'ai laissé les clés en toute confiance pour finir les dernières expériences concernant le côté *Xanthomonas*. Merci d'avoir toujours fait attention à mon bien-être. Benjamin, tu as rejoint l'aventure en cours de route et tu as réalisé une étude transcriptomique chez *Xanthomonas*. Tu t'es investi pleinement dans ce travail qui était relativement ardu pour définir, par exemple, les meilleurs couples d'amorces de PCR quantitative qui puissent exister... Merci de ta bonne humeur au quotidien. Je te souhaite de trouver une voie qui t'épanouira pleinement. Sandrine, je te remercie également énormément pour ton investissement quotidien dans ces travaux de thèse, pour ta flexibilité, ta rigueur et ta capacité d'adaptation,... Je suis ravie d'avoir pu travailler avec toi dans cette bonne humeur. Je te souhaite une très bonne continuation. Même lors des expérimentations les plus longues et les plus routinières, vous avez toujours fait preuve de patience. Ce fut un réel plaisir de travailler au quotidien avec vous, très sincèrement, merci pour tous ces moments.

Merci à Emmanuel Jaspard d'avoir initié les analyses bioinformatiques sur les déhydrines d'*A. brassicicola*. Je tiens à remercier Sylvain Hanteville, Joël Bénard et Bruno Hamon pour leur aide technique sans faille tout au long de ces trois années de thèse. Sylvain et Joël, vous avez toujours pris soin des nombreuses Arabido qui ont poussé dans les chambres de culture. Bruno, ton sens de l'organisation est un plaisir à partager au quotidien. Merci de ton investissement sans relâche dans la vie quotidienne du laboratoire IRHS-FungiSem. Enfin, merci à Elisabeth de Loménie pour son aide sur le côté administratif, sa rigueur et son efficacité.

Qu'auraient été les études microscopiques de cette thèse sans Marjorie Juchaux? Tu t'es toujours pleinement investie dans ce travail avec ta bonne humeur et ta rigueur habituelle et je t'en remercie énormément. Tu m'as fait découvrir de nombreuses techniques et su mettre en lumière et en image de nombreux aspects de la transmission d'agents pathogènes à la semence. Je tiens également à remercier Fabienne Simoneau et Marie Tellier qui m'ont toujours accueillie sur le plateau IMAC avec le sourire. J'ai également réalisé certaines approches de microscopie au SCIAM. Merci à Sonia Georgeault pour ta minutie et ta patience lors de ces longues phases d'observation en MEB.

Pendant près de deux ans, j'ai partagé mon bureau de l'Université avec deux personnes avec qui j'ai partagé de nombreux moments : Aymeric Joubert et Benoît Calmes. Aymeric, ça fait maintenant plus d'un an que tu as soutenu ta thèse. Je tenais à te remercier de m'avoir fait tant de fois fait partager ta vision des choses. Merci pour ta bonne humeur, ton dynamisme, tous ces moments qui étaient indispensables à notre équilibre quotidien. Merci pour ton investissement même après ton départ du labo (et tu sais de quoi je parle). Même si je sais que cela se déroule au mieux pour toi à l'heure actuelle, je te souhaite une très bonne continuation. Benoît, tu fais encore parti du navire FungiSem. Tu as toujours été un réel personnage dans l'équipe et nous avons partagé également beaucoup de bons moments. Cela a toujours été un réel plaisir de partager ton petit brin de folie au quotidien... Merci de m'avoir fait découvrir des choses dont je ne soupçonnais même pas l'existence à l'image de tes BD, ... Merci à vous deux de m'avoir supportée tous les jours et de m'avoir toujours respectée.

Je voudrais également remercier les autres doctorants de l'INRA, Arnaud Indiana, Céline Rousseau, Thibault Leroy, et Matthieu Gaucher et leur souhaiter une très bonne continuation. Arnaud, j'ai découvert en toi une personne réellement atypique. Tu as tes principes et tes idées que tu suis à la perfection. J'ai réellement apprécié travailler, discuter, et rire avec toi. Je te souhaite une très bonne continuation, et bon courage. Je ne doute pas un instant que tu mèneras à bien tous tes projets... Céline, nous avons été colocataires le temps d'une semaine lors d'un Congrès à Aussois. Ce fut un réel plaisir d'avoir partagé ces longues discussions avec toi. Bon courage pour la fin de ta thèse et pour ton avenir...

Je tenais à remercier tout particulièrement des personnes qui m'ont apporté tout au long ou à un moment précis une aide non négligeable dans cette thèse. Pour les analyses statistiques, en particulier sur le pathosystème fongique, je voudrais remercier Romain Berruyer qui a su nous éclairer de nombreuses fois, merci pour ta patience. La phylogénie

était pour moi un monde très obscur que Sophie Bonneau a su très largement éclaircir grâce à sa pédagogie. Je te remercie du temps que tu as passé sur ces analyses et des réflexions que nous avons pu avoir ensemble pour essayer de décortiquer les arbres phylogénétiques que nous avons construits.

Chaque année est rythmée par l'arrivée de stagiaires au sein des équipes et chaque année j'ai découvert de nouvelles et nombreuses personnalités très intéressantes. Cela a apporté un réel dynamisme qui fut à chaque fois très appréciable. Je commencerai par remercier les stagiaires de Master 2 avec qui j'ai travaillé, discuté, et partagé de nombreux moments très agréables : Xavier Bodi, Emmanuel Terrasson et Erwan Scaon, Edouard Bove, Bertrand Monsimier, Mickaël Gras, Lény Teyssier, Marion Le Cerf, Roxane Raulo et Guillaume N'Guyen (je vous souhaite une bonne continuation dans vos thèses respectives), Camille Li-Marchetti pour ta joie de vivre et tes éclats de rires, Jean-François Guimbaud pour ta gentillesse, ton humour que j'adore, ta simplicité et Samuel Balidas avec qui j'ai partagé ces six derniers mois de thèse car tu as travaillé sur les déhydrines d'*A. brassicicola*. Que de souvenirs partagés autour d'un pH mètre, d'une balance ou d'un gel d'agarose... D'apparence si différents, nous nous sommes retrouvés sur beaucoup de points et ce fut un immense plaisir de travailler avec toi et de te suivre pendant ces six mois. Je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras et de profiter pleinement de tout, Keep in Touch. Je continuerai par remercier la seule apprentie-ingénieur que j'ai croisé durant ces trois années, Agathe Joffre. Pendant de nombreux mois dans le même bureau, nous nous sommes toujours entraïdées. Je te souhaite bon courage pour la fin de rédaction de ton mémoire, et pour ton avenir...

Il y a également eu des stagiaires de M1, L3, L2, BTS, DUT à l'image de Loïc Deblais, Stephen Leite, Jean Philippe Eustache, Adama, Antoine Porquier, Antoine Sainte Luce, Manon Gault, Hélène Péteul, Jocelyn Chéné, Justine Bineau. J'espère très sincèrement n'avoir oublié personne.

J'ai également partagé de nombreux moments, sans forcément travailler avec elles, avec des personnes que je croise quotidiennement dans les couloirs de l'Université ou de l'INRA. A chaque fois, ce sont un sourire, une discussion, une question qui amènent du dynamisme et de la bonne humeur dans une journée de travail. Merci à Isabelle Verdu, Marion Hingant, Caroline Cukier, Antoni Pellizzarro, Houssein Diab, Marie-Laure Gervais, Céline Bourdin, Julien Delahaie, Thibault Clochard, Audrey Lathus. Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de mes deux équipes d'accueil IRHS-EmerSys (Tristan Boureau

Martial Briand, Chrystelle Brin, Sophie Cesbron, Erika Charbit, Perrine David, Karine Durand, Salwa Essakhi, Jacky Guillaumès, Hamed Hajri, Marion Le Saux, Charles Manceau, Nadia Mhebdi-Hajri, Perrine Portier, Leïla, Géraldine Taghouti) et IRHS-FungiSem (Nelly Bataillé-Simoneau, Pascal Poupard, Jérôme Dumur, Béatrice Iacomi-Vasilescu). Enfin, je remercie également toutes les personnes du bâtiment C de l'IRHS (site INRA) et présentes au 2^{ème} étage du bâtiment F de l'Université (Catherine Aubry, Marie-Christine Le Paven, Didier Peltier, Elisabeth Planchet, Jérémy Clotault, Anis Limami, Françoise Sallé-Tourne).

Je finirai par remercier, et c'est je pense plus que des remerciements que je leur dois, toute ma famille proche : mes parents, Guillaume, Valérie et Matthieu. Vous êtes ceux qui croyez le plus en moi et c'est certainement cela qui vous a permis de m'accompagner depuis le début de mes études jusqu'au doctorat. Merci à chacun d'entre vous pour votre patience et votre compréhension au quotidien. Je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Un GRAND merci à tous pour votre contribution aussi diverse soit elle...

LISTE des ABBREVIATIONS

ABA	Acide abscissique	MEB	Microscopie électronique à balayage
ABC	ATP-binding cassette	MFS	Major Facilitator Superfamily
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center	MgCl ₂	Chlorure de magnésium
ADN	Acide désoxyribonucléique	MME	Minimal Medium Elements
AID	Activator Interacting Domain	NaCl	Chlorure de sodium
Al-ITC	Allyl-Isothiocyanates	NaH ₂ PO ₄	Monosodium phosphate
AMV	Alfalfa Mosaic Virus	NASC	European Arabidopsis Stock Centre
ARN	Acide ribonucléique	NH ₄	Ammonium
ARN _m	ARN mesager	PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
ATP	Adénosine triphosphate	PBP	Protein Binding Periplasmic
BSA	Bovine Serine Albumine	PCR	Polymerase chain reaction
CaCl ₂	Chlorure de calcium	PDA	Potato Dextrose Agar
CDB	Core Binding Domain	PDB	Potato Dextrose Broth
cfu	Colonie formant une unité	PEG	Polyéthylène Glycol
Col	Columbia	pH	Potential Hydrogen
CSP	Conserved Signature Pattern	PIP	Plant Inducible Promoter-box
C _T	Cycle Threshold "cycle seuil"	POPP	Protein or Oligonucleotide Probability Profile
CUT	Carbohydrate Utilization containing TBDT loci	PP	Polypropylène
CWI	Cell Wall Integrity	PTI	PAMP-triggered immunity
DHN	Déhydrine	RNU	Relative Nephelometric Unit
dNTP	Déoxyribonucléotides	Rpf	Regulation of Pathogenecity factor
DBD	DNA Binding Domain	RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
DEPC	Pyrocarbonate d'éthyle	RR	Régulateur de réponse
DO	Densité optique	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
DTT	DiThioThréitol	Sf2	San Feliu 2
DSF	Diffusible Signal Factor	SMBV	Virus de la mosaïque du haricot
ECF	ExtracellularFunction	SO ₄	Sulfate
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétra acétique	SSH	Suppression Subtractive Hybridization
EPS	Exopolysaccharide	SST2	Système de sécrétion de type II
ET3	Effecteur de type III	SST3	Système de Sécrétion de Type III
Fe	Fer	SST4	Système de Sécrétion de Type IV
GlcNAc	N-acétylglucosamine	STC	Sorbitol Tris CaCl ₂
GEVES	Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences	STSDC	Système de Transduction du Signal à Deux Composantes
GFP	Green Fluorescent Protein	TAA	Trimeric autotransporter adhesins
HCl	Acide chlorhydrique	TAE	Tris-Acide acétique-EDTA
HOG	High Osmolarity Glycerol	TBDR	Récepteurs TonB-dépendants
Hpa	hrp-associated	TBDT	Transporteurs tonB-dépendant
HR	Réaction hypersensible	TE	Tris EDTA
Hrc	hrp-conserved	TES	Tris EDTA SDS
Hrp	Hypersensitive Reaction and Pathogenicity	TFP	Type Four Pili
HSP	Heat Shock Protein	TPS	Two-partner secretion system
HST	Host-Specific Toxins	Tris	Trishydroxyméthylaméthane
IRHS	Institut de Recherche en Horticulture et Semences	TSA	Tryptone Soja Agar
ITC	Isothiocyanates	TSB	Tryptone Soja Broth
KCl	Chlorure de potassium	UPR	Unfolded Protein Response
KH ₂ PO ₄	Monopotassium phosphate	Ws	Wassilewskija
K ₂ HPO ₄	Dipotassium phosphate	Xop	Xanthomonas Outer Proteins
LB	Luria Bertani	YNB	Yeast Nitrogen Base
LEA	Late Embryogenesis Abundant		
Ler	Landsberg erecta		
LMV	Lettuce mosaic virus		
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase		
MCP	Methyl-accepting Chemotaxis Proteins		

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	2
REMERCIEMENTS	3
LISTE des ABREVIATIONS	8
SOMMAIRE	10
Introduction	14
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	18
Partie 1 : L'espèce hôte et les microorganismes étudiés	18
I. L'hôte : <i>Arabidopsis thaliana</i>, une Brassicaceae sauvage devenue modèle pour l'étude des plantes cultivées	18
1. Description générale	18
2. L'appareil reproducteur d' <i>A. thaliana</i> : mise en place et description	19
II. Les microorganismes phytopathogènes étudiés	20
1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	20
1.1. Caractéristiques générales du genre.....	20
1.2. Le cycle de vie de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	22
1.3. Le pathosystème <i>A. thaliana</i> / <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	23
1.4. Eléments de la biologie de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	24
1.4.1. Le système de sécrétion de type III	24
1.4.2. La formation de biofilms via la synthèse d'exopolysaccharides	27
2. <i>Alternaria brassicicola</i>	29
2.1. Présentation du genre <i>Alternaria</i>	29
2.2. Le cycle de vie d' <i>A. brassicicola</i>	30
2.3. Le pathosystème <i>A. thaliana</i> / <i>A. brassicicola</i>	31
2.4. Eléments de la biologie d' <i>Alternaria brassicicola</i>	32
Partie 2 : La transmission à et par la semence d'organismes phytopathogènes	37
I. La graine, un microenvironnement particulier	37
1. Caractéristiques physiologiques et structurales des graines.....	37
1.1. Caractéristiques physiologiques	37
1.2. Morphologie et structure d'une graine.....	38
2. Localisation des agents pathogènes sur les graines	39
II. Les mécanismes de transmission à et par les semences des organismes phytopathogènes	40
1. La transmission à la semence	40
1.1. Colonisation du système vasculaire	40
1.2. Colonisation des pièces florales	41
1.3. Colonisation des fruits	42
2. La survie en association avec les semences et colonisation de la plantule.....	42
Partie 3. Les déterminants moléculaires impliqués dans la transmission de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> et <i>A. brassicicola</i> à et par la semence d'<i>A. thaliana</i>	44
I. La perception et la régulation de la transduction du signal de stress	44
1. Les systèmes de transduction du signal à deux composantes chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	45
2. Les cascades de transduction du signal chez les champignons et <i>A. brassicicola</i>	45
3. La transduction du signal de stress <i>via</i> les facteurs σ	48
II. La versatilité nutritionnelle de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	49
1. Le système vasculaire végétal.....	49
2. Capacité d'adaptation de <i>Xcc</i> à l'environnement nutritionnel: les Carbohydrate Utilization containing TBBDT loci .	50
3. Utilisation de la paroi végétale lors de la transmission de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> cc à la graine : système d'utilisation du xylane.	52
III. La formation de biofilms bactériens	54
1. Déplacement des bactéries jusqu'à un site favorable d'adhésion.....	54
2. Adhésion des cellules bactériennes, agrégation et formation de la structure tridimensionnelle	54
IV. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant)	56
1. Les protéines LEA : classification et caractéristiques	56
2. Fonctions des protéines LEA chez les plantes	57

3. Les protéines LEA chez les microorganismes	58
3.1. Les protéines LEA chez les bactéries	58
3.2. Les protéines LEA chez les champignons	58
3.3. Les déhydrines chez les microorganismes	58
Enjeux et objectifs de la thèse	63
Chapitre 2 : Matériel & Méthodes	67
I. Matériel	67
1. Matériel microbiologique	67
2. Matériel végétal	68
I. Méthodes	69
1. Méthodes d'analyse des acides nucléiques par biologie moléculaire	69
1.1. Extraction d'acides nucléiques	69
1.1.1. Extraction d'ADN génomique fongique	69
1.1.2. Extraction d'ADN plasmidique	70
1.1.3. Extraction des ARN totaux	71
1.2. Analyse des acides nucléiques	72
1.2.1. Amplification par PCR conventionnelle d'ADN fongique	72
1.2.2. Amplification par PCR conventionnelle d'ADN bactérien	73
1.2.3. Electrophorèse sur gels d'agarose	73
1.2.4. Hydrolyse d'ADN par des endonucléases de restriction	73
1.2.5. Hybridation moléculaire par Southern-blot	73
1.2.6. Reverse transcription	75
1.2.7. Amplification d'ADNc par RT-PCR quantitative en temps réel sur des ADNc d' <i>A. brassicicola</i> et de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	76
1.3. Transformation génétique d' <i>A. brassicicola</i> : mutagenèse dirigée par délétion, fusion d'une protéine cible à la GFP, marquage stable d'un organite.	77
1.3.1. Obtention de la cassette de remplacement	77
1.3.2. Préparation des protoplastes d' <i>A. brassicicola</i> selon Cho <i>et al.</i> (2006)	78
1.3.3. Transformation d' <i>A. brassicicola</i>	78
1.3.4. Régénération des protoplastes	78
1.4. Mutagenèse dirigée par délétion chez <i>Xcc</i> ATCC33913	79
1.4.1. Amplification par PCR des régions amont (5') et aval (3') du gène cible	79
1.4.2. Digestion, ligation et transformation d' <i>E. coli</i>	79
1.4.3. Conjugaison triparentale et recombinaison homologue	80
1.4.4. Sélection et vérification des mutants de délétion	80
1.4.5. Construction d'une souche de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> exprimant constitutivement la GFP	81
1.4.6. Absence d'effet pléiotrope : croissance des mutants de délétion	81
2. Méthodes de phénotypage des mutants <i>in vitro</i>	81
2.1. Survie des bactéries <i>in vitro</i> en microcosmes	81
2.2. Survie des bactéries sur des graines d' <i>A. thaliana</i>	82
2.3. Adhésion des souches bactériennes en plaques de polypropylène	82
2.4. Mesure de la croissance radiale mycélienne	83
2.5. Mesure des phases précoces de croissance d' <i>A. brassicicola</i> par néphélométrie	83
2.6. Conservation des conidies d' <i>A. brassicicola</i> à l'état sec	84
3. Méthodes de phénotypage des mutants <i>in planta</i>	84
3.1. Méthodologie de mise en place du pathosystème fongique	84
3.1.1. Par voie florale	84
3.1.2. Par voie indirecte de contact avec le fruit	84
3.2. Méthodologie de mise en place du pathosystème bactérien	85
3.2.1. Par voie florale	85
3.2.2. Par voie vasculaire	85
3.3. Tests de pouvoir pathogène de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> et ses mutants	86
3.4. Tests de pouvoir pathogène d' <i>A. brassicicola</i>	87
3.5. Tests de réaction d'hypersensibilité sur tabac	87
3.6. Internalisation des mutants de <i>Xcc</i> <i>in planta</i> sur <i>A. thaliana</i>	88
4. Méthodes d'analyse par microscopie	88
4.1. Observations de graines et de valves de siliques en microscopie électronique à balayage	88
4.2. Observations de graines contaminées par <i>A. brassicicola</i> en microscopie photonique à épifluorescence	89
4.3. Observations de graines et de valves de siliques contaminées par <i>A. brassicicola</i> en microscopie confocale à balayage laser	89
4.3.1. Réalisation de coupes de graines contaminées par <i>A. brassicicola</i>	89
4.3.2. Coloration au solophényl et à l'iode de propidium de graines entières et de coupes de graines par microscopie confocale à balayage laser	90
4.4. Observations de hampes florales et de graines contaminées par <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> en microscopie confocale à balayage laser	90

4.5. Observations de biofilms bactériens en microscopie confocale à balayage laser	91
4.6. Etude de la localisation subcellulaire des déhydrines d' <i>A. brassicicola</i> en microscopie confocale à balayage laser	91
4.6.1. Marquage des noyaux	91
4.6.2. Marquage des mitochondries	92
5. Outils d'analyse <i>in silico</i> et statistiques	92
Chapitre 3 : Résultats	95
Partie 1 : Mise en place des pathosystèmes modèles pour étudier la transmission des agents phytopathogènes aux graines des porte-graines.....	95
I. L'inoculation	96
1. Par voie florale	96
2. Par voie vasculaire.....	96
3. Par voie indirecte de contact avec le fruit ou des pailles	97
II. Récolte des organes contaminés	98
III. Détection des organismes phytopathogènes	99
Partie 2. Histologie de la transmission à la graine	101
I. Pathosystème <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> / <i>A. thaliana</i>	101
II. Pathosystème <i>A. brassicicola</i> / <i>A. thaliana</i>	102
Partie 3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission et la survie des agents pathogènes aux et sur les graines.....	104
I. La versatilité nutritionnelle	104
II. La perception et la régulation de la transduction du signal de stress.....	105
1. La perception du signal de stress.....	105
1.1. La perception du signal via une histidine kinase de type III d' <i>A. brassicicola</i> , osmosenseur de la voie de régulation de l'osmolarité cellulaire	105
1.2. Les systèmes de transduction du signal à deux composantes chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	106
2. La transduction du signal de stress.....	107
2.1. Identification des facteurs σ^{54} chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 et analyse de leurs séquences nucléotidiques et protéiques	107
2.2. Analyse phylogénétique des facteurs σ^{54} dans différents genres bactériens	108
2.3. Rôles des facteurs σ^{54} de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 dans la transmission à la graine	109
2.4. Rôles des facteurs σ^{54} de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 dans la survie sur graines	109
2.5. Survie et colonisation de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	113
2.6. Mobilité par nage (swimming) et essaimage ou contraction-rétraction (swarming/twitching) des mutants σ^{54}	114
2.7. Etude du régulon des facteurs σ^{54} par RT-PCR quantitative et semi-quantitative	115
III. Protection face aux stress conférée par des protéines intrinsèquement déstructurées	117
1. Les déhydrin-like chez <i>A. brassicicola</i>	117
1.1. Identification de déhydrines chez <i>A. brassicicola</i>	117
1.2. Analyse structurale des séquences nucléotidiques	117
1.3. Analyse des séquences protéiques	118
1.4. Analyse de l'expression des gènes en conditions de stress abiotiques.....	119
1.5. Expression des gènes <i>dhn</i> d' <i>A. brassicicola</i> dans différents fonds génétiques	122
1.6. Régulation post-transcriptionnelle : cas du gène <i>abdhn2</i>	122
1.7. Localisation subcellulaire des protéines AbdHN1, AbdHN2 et AbdHN3	123
1.8. Approche fonctionnelle par mutagenèse dirigée	124
1.9. Expression hétérologue des déhydrines chez <i>S. cerevisiae</i>	127
1.10. Pouvoir pathogène des mutants <i>abΔdhn</i> au stade végétatif sur feuilles	129
1.11. Capacité des mutants <i>abΔdhn</i> à se transmettre aux graines d' <i>A. thaliana</i>	130
1.12. Capacité des mutants <i>abΔdhn</i> à se conserver à l'état sec <i>in vitro</i>	130
2. La harpine de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	131
2.1. Analyse structurale de la séquence nucléotidique codant une harpine chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	131
2.2. Analyse structurale de la séquence protéique de Hpa1 chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	131
2.3. Analyse fonctionnelle de Hpa1 chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	132
CHAPITRE 4 : Discussion générale	134
Références bibliographiques	156

Introduction

Introduction

Les semences sont des organes issus de la reproduction sexuée (graine et fruit), alors que les plants sont issus de la multiplication végétative (tubercule, bulbe,...). Ces organes permettent à la plante de se multiplier et de se propager dans l'environnement (Maude, 1996). Les semences et plants sont aptes à former une plante complète après semis ou enfouissement, elles répondent à un certain nombre de caractéristiques relatives à leur qualité germinative et sanitaire, assurant à l'utilisateur une germination optimale. La graine est un organe de reproduction et de résistance des plantes, qui assure la reproduction des spermatophytes. Elle résulte exclusivement de l'évolution d'un ovule après fécondation (Raven, 2000). Les graines peuvent être utilisées directement comme nourriture ou utilisées pour produire des cultures qui elles-mêmes seront consommées. Une estimation de Schwinn (1994) indique qu'environ 90% des cultures vivrières mondiales se propagent par l'intermédiaire des semences et plants. Ces derniers constituent le point de départ de tout cycle de culture et, également dans certains cas, le point d'arrivée. C'est par exemple le cas des productions de graines (*via* des porte-graines) destinées entre autre à l'alimentation animale et humaine. Ainsi, la semence est devenue, dans les pays développés, un produit à haute valeur ajoutée vendu par des entreprises spécialisées.

La maîtrise des qualités physique et germinative est primordiale pour assurer une implantation optimale et régulière de la culture. Cependant, une grande qualité sanitaire des lots de semences est également indispensable pour éviter des manques à la levée, des dégâts précoces sur les plantules, et la propagation de certaines maladies. Ces dommages sont causés par des bioagresseurs transmissibles à et par les semences tels que les champignons, les bactéries, les virus et les nématodes. Les semences et plants contaminés constituent un très bon inoculum primaire et leurs semis peuvent alors être à l'origine d'épidémies très importantes. De plus, les microorganismes peuvent également coloniser de nouvelles aires géographiques préalablement indemnes de maladie, principalement *via* les échanges commerciaux mondiaux. Ces épidémies ont des conséquences économiques directes lorsque les jeunes plantules et les produits de récolte sont la cible de l'attaque.

La transmission à et par les semences de leurs plantes hôtes est un trait de vie majeur de nombreux agents phytopathogènes. Cette étape représente une phase critique dans l'écologie et l'épidémiologie des maladies qu'ils occasionnent. Dans un premier temps, ils doivent se transmettre aux graines de la plante hôte et coloniser ces organes. Dans un second temps, ces

microorganismes doivent survivre sur les graines jusqu'au retour de conditions environnementales plus favorables à leur croissance, et en particulier lors de l'émergence des jeunes plantules.

La transmission à et par les semences représente à la fois un goulet d'étranglement dans le cycle de vie d'un pathogène et une protection lui permettant de mieux de se disséminer. Cette phase constitue donc une cible idéale sur laquelle des réflexions quant au positionnement de nouvelles méthodes de lutte durables peuvent être engagées.

« Face aux changements climatiques et à la prolifération attendue des agents pathogènes du fait de la diminution programmée des intrants phytosanitaires, la production de semences de grande qualité constitue un enjeu stratégique et économique majeur pour une zone de multiplication traditionnelle de semences telle que la Région Pays-de-la-Loire. Or, les mécanismes mis en jeu dans les modifications de la qualité germinative et la colonisation des semences par les agents pathogènes sous l'influence de telles variables climatiques et agronomiques sont méconnus. Ce verrou technologique majeur doit être levé en respectant les principes d'une agriculture raisonnée. » (Projet QUALISEM, 2009). Ceci est un extrait du projet QUALISEM, dans le cadre duquel cette thèse a été réalisée. Ce projet est financé sur la période 2009-2013 dans le cadre du programme régional « développement des thématiques structurées et des spécialités scientifiques ». Ce projet de recherche vise à approfondir les connaissances moléculaires sur les déterminismes de la qualité physiologique et sanitaire des semences, deux volets de la qualité rarement étudiés de manière simultanée. L'étude des mécanismes responsables de la transmission des agents pathogènes fongiques et bactériens aux semences et aux plantules sur des plantes hôtes est très novatrice. En effet, aucune équipe concurrente n'est à l'heure actuelle engagée à notre connaissance sur cette même voie de recherche. Dans l'optique de faciliter cette étude, à la fois côté plante et microorganismes, des organismes modèles aux génomes séquencés ont été choisis, en lien avec les thématiques d'étude des équipes IRHS-EmerSys et IRHS-Fungisem. Il s'agit de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et du champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*. Ce travail de thèse vise à mieux identifier et caractériser les mécanismes impliqués dans la qualité sanitaire des graines d'*A. thaliana* et à comprendre le dialogue qui régit la colonisation des semences par les agents pathogènes. Dans un premier temps, il s'agira d'établir, au stade reproductif, les conditions d'infection permettant la transmission aux graines d'*A. thaliana* des deux pathogènes, et ainsi de mettre en place deux pathosystèmes modèles de cette phase précise de leur cycle de vie. Ces deux systèmes modèles permettront

d'étudier le comportement de mutants à la fois chez les agents pathogènes et chez l'hôte afin d'accéder aux déterminants moléculaires qui régissent cette interaction.

Un pathosystème est, dans un écosystème, un sous-ensemble régi par une forme de parasitisme. Dans le cas d'un pathosystème végétal, l'espèce hôte est une plante et le parasite est représenté par un organisme pathogène qui passe une part significative de son cycle de vie sur cette plante hôte afin de tirer profit de celle-ci. Le parasite peut être, par exemple, un insecte, un nématode, un champignon, une bactérie ou encore un virus. La plante hôte devra mettre en place des mécanismes de tolérance et/ou de résistance aux diverses attaques (physiques, enzymatiques,...) du parasite. La principale caractéristique du concept de pathosystème est qu'il repose sur l'étude des interactions entre les deux partenaires. Ainsi, l'étude intégrée du cycle de vie d'un microorganisme en lien avec la plante hôte peut être envisagée grâce à de tels pathosystèmes.

La première partie de ce travail de thèse a nécessité la mise en place de deux pathosystèmes modèles au stade reproductif d'*A. thaliana* avec deux agents pathogènes : *X. campestris* pv. *campestris* et *A. brassicicola*. Ces trois organismes vivants sont considérés, à leur niveau, comme des modèles pour la mise en place d'expérimentations. Un organisme modèle est une espèce qui est étudiée de manière approfondie pour comprendre soit un processus biologique précis, soit des mécanismes biologiques intégrés au sein de cet organisme. Cela suppose que les résultats obtenus puissent être transposés partiellement aux espèces de genres phylogénétiquement proches ou même plus éloignés. L'étude des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'étape de survie des agents pathogènes sur les graines a également été envisagée. L'hypothèse principale de cette seconde partie de ce travail repose sur le fait que les agents pathogènes peuvent activer des mécanismes moléculaires leur permettant de percevoir et de s'adapter aux divers stress lors de la transmission à la semence et lorsqu'ils sont présents sur et/ou dans la graine.

***S**ynthèse bibliographique*

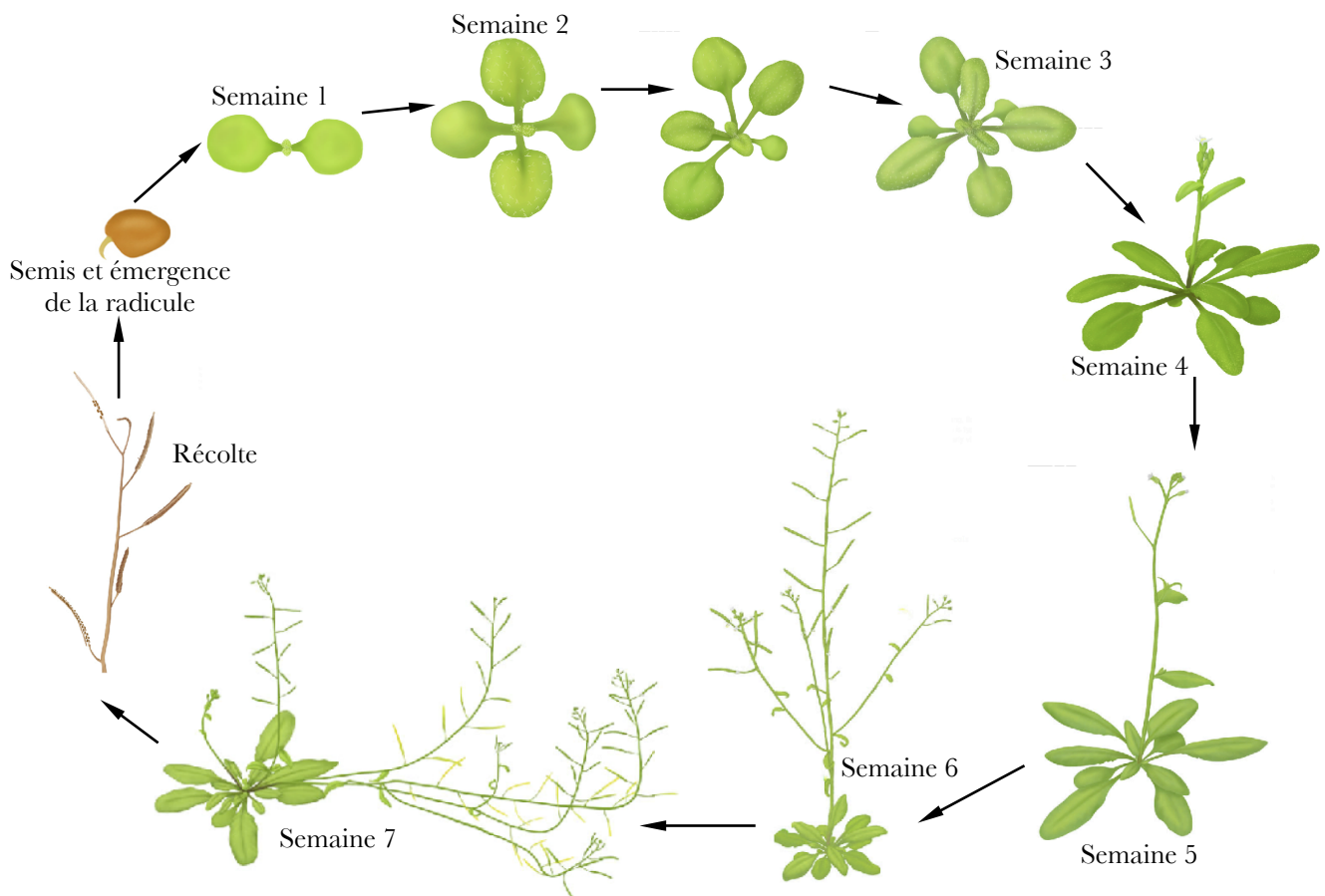


Figure 1. Représentation schématique du cycle de développement de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (photos issues de <http://www.prep.biochem.vt.edu/timeline/>)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie 1 : L'espèce hôte et les microorganismes étudiés

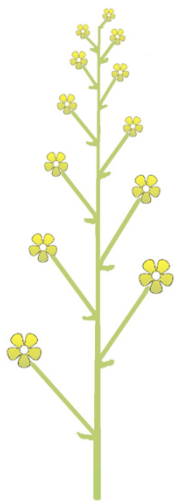
I. L'hôte : *Arabidopsis thaliana*, une *Brassicaceae* sauvage devenue modèle pour l'étude des plantes cultivées

1. Description générale

La famille des *Brassicaceae* (anciennement nommées Crucifères) regroupe de nombreuses espèces végétales cultivées utilisées, entre autres, dans l'alimentation humaine et animale (*Brassica oleracea*, *B. rapa*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*). La majorité des espèces appartenant à cette famille sont des plantes herbacées caractérisées par des fleurs à quatre pétales disposés en croix. *Arabidopsis thaliana*, encore appelée Arabette des dames, est une plante herbacée annuelle appartenant à cette famille botanique. Ses feuilles sont disposées en rosette de laquelle émerge un pédoncule floral portant une inflorescence sous forme d'un racème (**Figure 1**). En conditions naturelles, elle mesure seulement 10 à 15 cm à l'état adulte, alors qu'en conditions contrôlées de développement, elle peut atteindre jusqu'à 40 cm de haut.

D'un point de vue moléculaire, le génome d'*A. thaliana* est réparti sur cinq paires de chromosomes et sa taille a été estimée à 157 millions de paires de bases (Bennett *et al.*, 2003). Un programme international de séquençage de son génome, auquel ont participé des laboratoires du monde entier, dont une trentaine en Europe, a été lancé en 1989. Ce fut le premier génome de plante à être totalement séquencé en 2000 (The Arabidopsis Initiative, 2000). A l'heure actuelle, cette plante est un organisme de référence dans de nombreux domaines de recherche. En effet, elle possède des caractéristiques qui ont conduit la communauté scientifique à faire de cette plante une représentante des végétaux chlorophylliens vasculaires. Cette plante de petite taille au cycle de développement rapide peut être facilement cultivée en laboratoire en grande quantité et sur de petites surfaces. Des manipulations génétiques peuvent être aisément réalisées en transformant ses cellules avec *Agrobacterium tumefaciens*, permettant l'inactivation massive de gènes et la création de mutants surexprimeurs. Enfin, l'absence d'intérêts économiques sur cette espèce de *Brassicaceae* facilite la diffusion des informations entre les différentes équipes scientifiques. Ainsi, l'ensemble des

A.



B.



Figure 2. A. Schéma d'une inflorescence simple en racème. **B.** Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'une fleur de la plante modèle *A. thaliana* (photo issue de <http://www.prep.biochem.vt.edu/timeline/>)

ressources de diverses natures d'*A. thaliana* est répertorié sur des bases de données telles que « The Arabidopsis Information Resource » (<http://www.arabidopsis.org/>) et « l'European Arabidopsis Stock Centre » (<http://arabidopsis.info/>).

Plus de 750 accessions naturelles d'*A. thaliana* ont été collectées à travers le monde dans différents milieux naturels et sont actuellement disponibles dans les deux centres majeurs de stockage mondiaux, l'ABRC et le NASC (<http://www.arabidopsis.org/>). Ces accessions présentent des différences phénotypiques (forme globale de la plante, couleur et pilosité des feuilles) et physiologiques (délai de floraison, résistance aux maladies). Cette diversité naturelle permet d'étudier les interactions génétiques complexes qui régissent, par exemple, l'adaptation de la plante à son environnement par la modification de ses caractéristiques morphologiques. Ainsi, la notion d'écotype peut être définie comme une population d'une espèce donnée qui présente des caractéristiques nouvelles héréditaires adaptées à un type de milieu particulier. A l'heure actuelle, les principaux écotypes utilisés en recherche sont l'écotype Landsberg erecta (*Ler*), Columbia (*Col*) et Wassilewskija (*Ws*).

2. L'appareil reproducteur d'*A. thaliana* : mise en place et description

Les fleurs d'*A. thaliana*, disposées sur une inflorescence simple en racème, ont une morphologie et une anatomie simples (**Figure 2**). Elles sont regroupées en inflorescence, dans laquelle l'axe se termine par un bourgeon terminal, à croissance potentiellement indéfinie. La floraison commence par les fleurs de la base et se poursuit vers le sommet (ordre acropète), ce qui signifie que tous les stades de développement de la fleur sont généralement visibles sur une même plante. L'arabette est une plante strictement autogame : les deux gamètes sont issus du même individu (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010). Ainsi, chaque fleur autofécondée forme un fruit nommé silique. La silique est un fruit sec déhiscent dans lequel les graines sont fixées sur deux placentas pariétaux. Pendant la maturation du fruit, une fausse cloison reliant les deux placentas (appelée replum) se forme et sépare les deux loges. Lors de la déhiscence, les deux valves se soulèvent du bas vers le haut suivant quatre fentes longitudinales, ce qui laisse apparaître le septum et les graines qui en sont solidaires. Chaque silique peut contenir entre 30 et 50 graines. Dans des conditions de croissance non limitantes, le cycle de développement d'*A. thaliana* se déroule en six à huit semaines (Feldmann et Marko, 1987).



B.

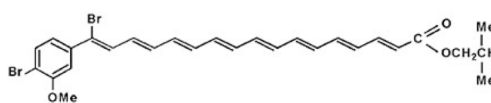


Figure 3. A. Colonies muqueuses et jaunes caractéristiques de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* **B.** Structure chimique d'une molécule de xanthomonadine (d'après Rajagopal *et al.*, 1997).

Les conditions environnementales relatives à la durée du jour (nombre d'heures de jour/nombre d'heures de nuit) et la température peuvent influencer le délai de la floraison. En effet, l'arabette est une plante de jours longs facultative (Koorneef *et al.*, 1998) qui a besoin de jours longs) pour initier sa floraison (Lee, 2009) et de jours courts pour favoriser son développement végétatif. La photopériode optimale de floraison est de 16 heures pour des écotypes tels que Landsberg *erecta* (Ler). Certains écotypes, tels que San Feliu 2 (Sf-2), ont besoin d'une période de vernalisation (20 jours à 4°C après le semis) pour pouvoir fleurir dans des délais optimaux (Sanda *et al.*, 1997).

II. Les microorganismes phytopathogènes étudiés

Les pathosystèmes modèles mis en place avec la plante modèle *A. thaliana* intègrent dans un cas une bactérie, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, et dans l'autre un champignon, *Alternaria brassicicola*. Ce sont des pathosystèmes complémentaires d'un point de vue biologique car ils permettent de confronter deux stratégies de contamination des semences très opposées qui sont respectivement, la contamination par la voie vasculaire et celle par contact avec le fruit.

1. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

1.1. Caractéristiques générales du genre

Les *Xanthomonas* sont des bactéries à Gram négatif appartenant à la classe des γ -protéobactéries, à la famille des *Xanthomonadaceae* et à l'ordre des *Xanthomonadales*. Etymologiquement, le terme « *xanthos* » signifie « jaune ». La couleur jaune des colonies de *Xanthomonas* est due à la synthèse de caroténoïdes liés à la membrane externe bactérienne, les xanthomonadines (**Figure 3**). Un rôle de protection face à la photo-oxydation leur est souvent attribué car des mutants de différentes espèces de *Xanthomonas*, déficients au niveau de ce pigment, sont plus sensibles que le parent sauvage à des stress environnementaux (Jenkins et Starr, 1982 ; Poplawsky *et al.*, 2000). Néanmoins, certains pathovars aux compétences épiphytes connues tels que *X axonopodis* pv. *manihotis* ne produisent pas de xanthomonadine (Kemp *et al.*, 2004 ; Büttner et Bonas, 2010) ; les colonies sont alors blanches. Leur croissance optimale se fait à des températures comprises entre 25 et 30°C (Saddler et Bradbury, 2005).

Ces bactéries sont catalase positive, oxydase négative ou faiblement positive, uréase négative et indole négative ; elles sont incapables de réduire les nitrates (Bradbury, 1984).

Le genre *Xanthomonas* regroupe au moins 27 espèces de bactéries phytopathogènes attaquant plus de 400 plantes hôtes, que ce soit des Monocotylédones et des Dicotylédones, et qui ont parfois un intérêt économique majeur (Leyns *et al.*, 1984). Au sein des *Xanthomonas*, chaque souche bactérienne possède une gamme d'hôte restreinte. Toutes les souches d'une même espèce responsables d'un même type de symptôme et sur une même gamme de plantes hôtes sont regroupées au sein d'un même pathovar (Young *et al.*, 1978). Dans le passé, ce genre fut subdivisé en de nombreuses espèces et pathovars sur la base de leur spectre d'hôtes (Swings *et al.*, 1993). L'augmentation du nombre de données génomiques disponibles a permis d'étudier très largement ce genre d'un point de taxonomique et phylogénétique. De plus, les progrès en génotypage, biologie moléculaire et taxonomie ont permis une reclassification du genre, menant à la création de 20 espèces (Vauterin *et al.*, 1995 ; Vauterin *et al.*, 2000) même si des réarrangements sont encore courants (Rodriguez-R *et al.*, 2012). L'espèce *Xanthomonas campestris* a été subdivisée en 6 pathovars (*aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* et *raphani*) (Vauterin *et al.*, 1995 Vauterin *et al.*, 2000), plus récemment regroupés en 3 pathovars : *campestris*, *incanae* et *raphani* suite à des analyses de pouvoir pathogène (Fargier et Manceau, 2007).

X. campestris pv. *campestris* (*Xcc*), est une bactérie en bâtonnet (0,7 à 1,8 µm de long et 0,4 à 0,7 µm de large), aérobic stricte et pourvue d'un flagelle polaire unique. Sur des milieux de culture standard à 28°C, elle produit des colonies jaunes, convexes et rondes, dites butyreuses (Büttner et Bonas, 2010). L'aspect muqueux est consécutif à la synthèse d'un exopolysaccharide, le xanthane. La production de cet exopolysaccharide est exploitée dans les industries cosmétiques, alimentaires et dans le bâtiment pour ses propriétés d'agent viscosant et stabilisant (Sutherland, 1993). Le xanthane est à la fois indispensable à la survie épiphyte de *Xcc* (Dunger et Relling, 2007) et à la mise en place du pouvoir pathogène. En effet, cet exopolysaccharide est, par exemple, nécessaire à la colonisation du système vasculaire par les bactéries dites « vasculaires » (Roper *et al.*, 2007).

Les génomes de trois souches de *X. campestris* pv. *campestris* ont été entièrement séquencés et sont disponibles en ligne. Il s'agit de la souche ATCC33913 séquencée au Brésil (da Silva *et al.*, 2002), de la souche 8004 séquencée en Chine (Qian *et al.*, 2005) et de la souche B100 séquencée en Allemagne (Vorholter *et al.*, 2008). La taille des génomes est respectivement de 5 076 187 pb, 5 148 708 pb et 5 079 002 pb. Ces trois génomes se présentent sous la forme d'un seul chromosome, avec un pourcentage en GC d'environ 65% et sont riches en éléments

transposables. Si le degré de conservation de séquence entre les génomes des souches ATCC33913 et 8004 est très fort, des réarrangements génomiques significatifs (translocations, inversions, insertions et délétions) différencient les deux souches. De plus, il semble que ces deux souches présentent de légères différences dans leur pouvoir pathogène sur différentes plantes : la souche ATCC33913 serait légèrement moins agressive sur certains cultivars de choux et de radis (Qian *et al.*, 2005). Excepté pour une petite région inversée, le chromosome de la souche B100 est colinéaire avec celui de la souche 8004. En revanche, ces 2 souches diffèrent de la souche ATCC33913 par une inversion d'un énorme fragment chromosomique (Vorholter *et al.*, 2008).

1.2. Le cycle de vie de *X. campestris* pv. *campestris*

Même si *X. campestris* pv. *campestris* est capable de coloniser les tissus végétatifs de la plante en pénétrant par des blessures ou les stomates, ces sites d'infection ne constituent pas les points d'entrée privilégiés de cette bactérie. Des travaux récents montrent que *X. campestris* pv. *campestris* est capable de contrôler l'ouverture des stomates d'*A. thaliana* par la sécrétion d'une petite molécule dont la production est contrôlée par le cluster de gènes appelé *rpf*/DSF (Diffusible Signal Factor) (Gudesblat *et al.*, 2009). Chez ses plantes hôtes, *X. campestris* pv. *campestris* est principalement capable de pénétrer à l'intérieur des tissus végétaux par des structures aqueuses particulières situées en marge des feuilles, à l'aboutissement des vaisseaux du xylème, appelées hydathodes (Hugouvieux *et al.*, 1998). Dans des conditions d'humidité élevée, et notamment très tôt le matin, les hydathodes exsudent des gouttelettes d'eau visibles en marge des feuilles ; c'est le phénomène de guttation. Les bactéries épiphytes sont alors incorporées dans ces gouttelettes et pénètrent dans les tissus vasculaires lorsque les gouttes sont réabsorbées. Après pénétration par les hydathodes, *Xcc* envahit les vaisseaux du xylème et déclenche les symptômes caractéristiques de la maladie, la nervation noire des *Brassicaceae* (encore appelée « black-rot ») (Bretschneider *et al.*, 1989). Une température et une humidité élevées favorisent le développement de la nervation noire. Une forte population bactérienne associée au xanthane obstrue partiellement le système vasculaire, ce qui a pour conséquence de réduire le flux d'eau et d'éléments nutritifs dans la plante. Les symptômes caractéristiques de cette maladie sont la formation de lésions jaunes en forme de « V » devenant brunes et nécrosées au fil de la progression des bactéries dans le système vasculaire. Les feuilles gravement infectées se dessèchent entièrement et peuvent alors tomber. Entre deux cycles d'infection, *Xcc* est capable de survivre pendant plusieurs années sur des débris végétaux et

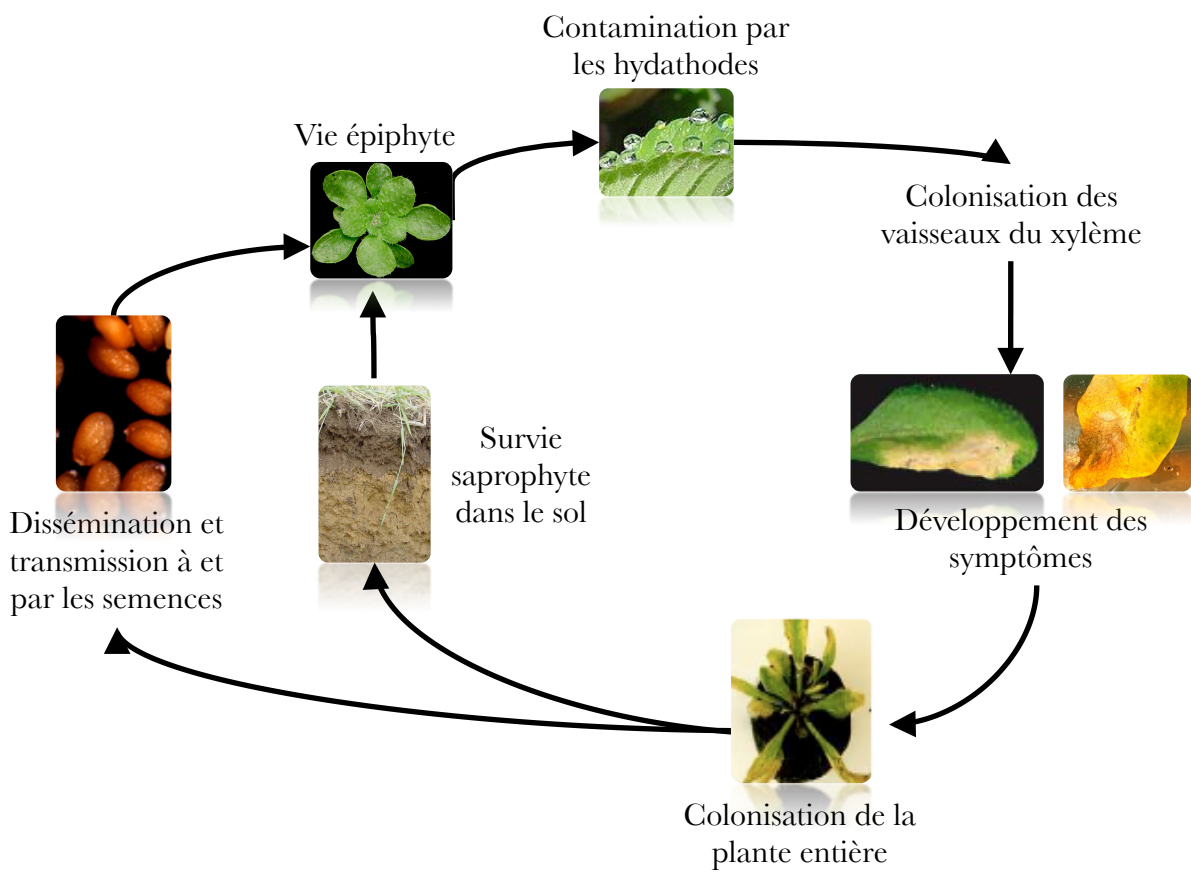


Figure 4. Représentation schématique du cycle de vie de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), ici dans le cas d'une interaction avec la plante modèle *A. thaliana*.

dans le sol (**Figure 4**). Une des caractéristiques de cette bactérie est qu'elle est capable de se transmettre à et par les semences de ses plantes hôtes (Schultz et Gabrielson, 1986). Les graines contaminées deviennent alors une source considérable d'inoculum primaire dès la germination de la graine et la croissance de la plantule. De plus, *Xcc* a été détectée dans des lots commerciaux de semences datant de plus de trois ans, mettant ainsi en évidence l'importance de cette source d'inoculum et de la capacité de survie de cette bactérie (Schultz et Gabrielson, 1986). Cette bactérie a été également détectée sur des graines de plantes hôtes alternatives appartenant à la famille des *Brassicaceae*, telles que *Lepidium virginicum*, *Coronopus didymus*, *Cardaria pubescens*, *Raphanus sativus*,... (Schaad et Dianese, 1981). Bien que la pluie, le vent et les insectes contribuent à la dispersion de la maladie dans l'environnement, la source majeure d'inoculum reste encore les semences contaminées. L'usage de semences indemnes de ce pathogène est donc la principale méthode prophylactique recommandée pour lutter contre la pourriture noire des crucifères. Cela doit être combiné à la mise en place de bonnes pratiques culturales, en évitant notamment l'irrigation par aspersion. L'amélioration des méthodes de lutte nécessite une connaissance approfondie des étapes du cycle épidémiologique des maladies.

1.3. Le pathosystème *A. thaliana*/*X. campestris* pv. *campestris*

X. campestris pv. *campestris* regroupe l'ensemble des bactéries capables d'induire la nervation noire sur une large gamme de *Brassicaceae* d'intérêt agronomique (*Brassica oleracea* tels que le chou, le chou de Bruxelles, le chou-fleur, le brocoli ; *Brassica napá* ; *Brassica napus* ; *Raphanus sativus* ; *Sinapis alba* ; sauf certains cultivars de *R. sativus* et de *B. oleracea* qui sont moins facilement infectés) ainsi que la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette dernière constitue un modèle de choix en phytopathologie pour étudier les bases moléculaires de l'interaction entre la plante et la bactérie. En effet, les génomes de ces deux organismes étant séquencés (Arabidopsis, 2000; da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2008), ce pathosystème est bien caractérisé à différents niveaux. Une des premières descriptions de la mise en évidence de l'interaction entre *A. thaliana* et *Xcc* a été effectuée par Simpson et Johnson (1990). Une réponse différentielle d'*A. thaliana* face à différentes souches de *Xcc* a été mise en évidence par l'identification d'interactions compatibles et incompatibles ce qui suggère qu'il existe une reconnaissance spécifique entre cette bactérie et l'hôte (Lummerzheim *et al.*, 1993). Enfin, la mise en place d'une méthodologie d'observation de l'interaction *A. thaliana* et *Xcc* grâce à l'analyse de la luminescence d'une souche marquée avec l'opéron *lux*

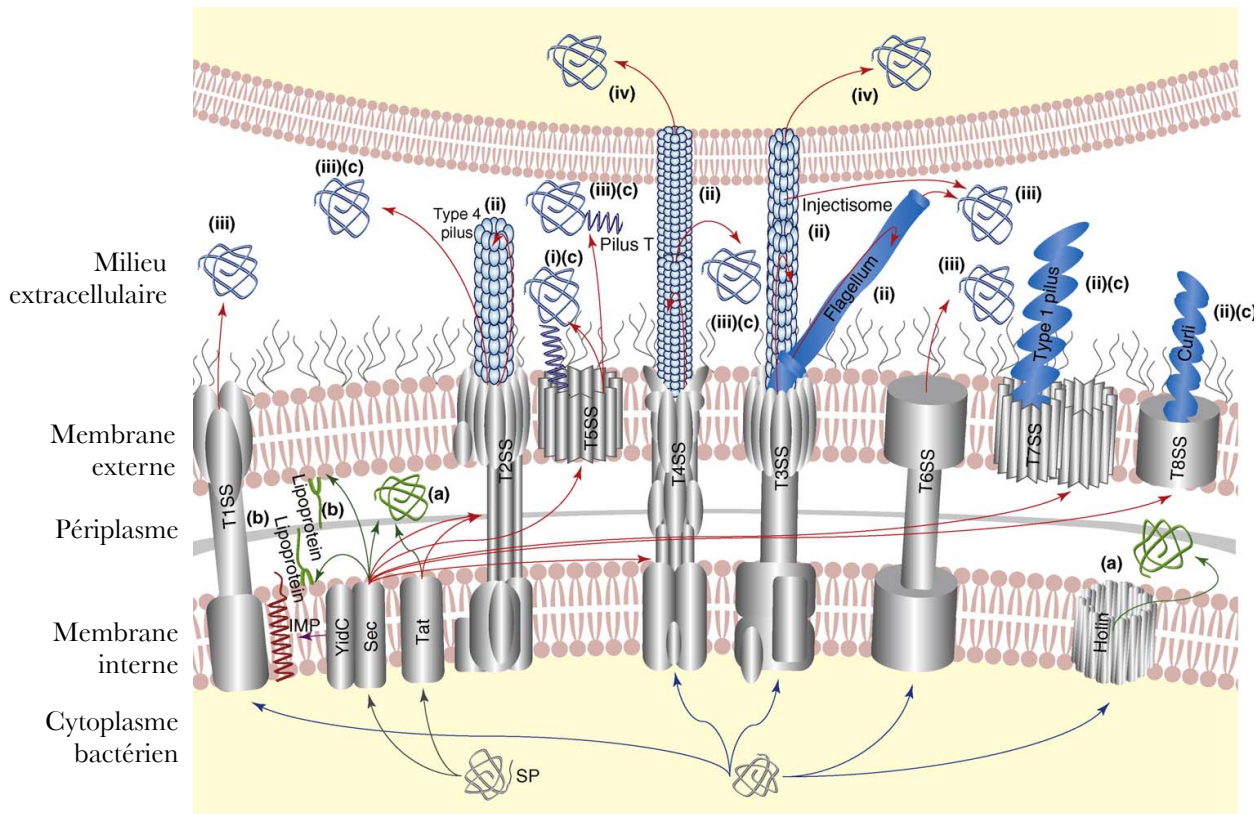


Figure 5. Représentation schématique de la localisation subcellulaire finale des différentes protéines sécrétées chez les bactéries pour les différents systèmes de sécrétion identifiés à ce jour (d'après Desvaux *et al.*, 2009). Les flèches noires indiquent les différentes voies suivies par les protéines dirigées vers la membrane interne alors que les bleues représentent le devenir des protéines ne possédant pas de peptide signal dans leur région N-terminale. Les effecteurs sont dans certains cas ancrés au niveau de la membrane externe (i) comme tel est le cas des protéines du T5SS; (ii) dans d'autres impliqués dans la structure de pili (T3SS, T2SS, pilus T *via* un T4SS, pilus de type I *via* le T7SS (chaperone–usher pathway) ou curli *via* le T8SS (extracellular nucleation-precipitation pathway)); (iii) relargués dans le milieu extracellulaire ou (iv) directement injectés dans un autre organisme (bactérien ou eucaryote) *via* un T3SS ou un T4SS. Les flèches rouges sont associées aux voies de sécrétion, les violettes liées à l'intégration des protéines membranaires (IMP). Les vertes enfin se limitent aux voies d'export. Les protéines sécrétées sont représentées en bleu et celles exportées en vert.

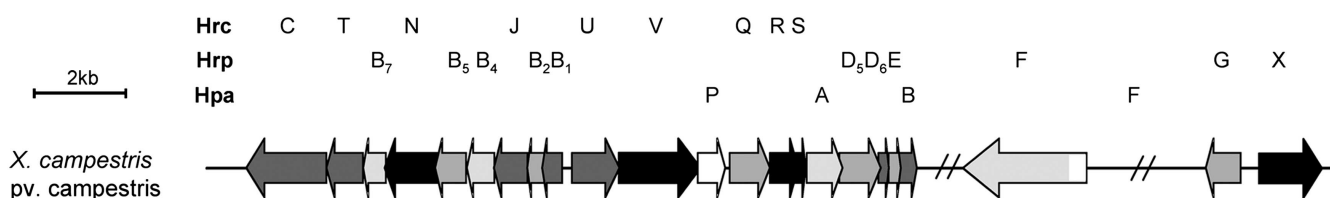


Figure 6. Représentation schématique de l'organisation des gènes *hrp* dans le génome de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. (d'après Darsonval *et al.*, 2008).

a permis d'optimiser de manière quantitative ce pathosystème au stade végétatif. Cette méthode permet de compléter l'observation de différences phénotypiques dues à la mutation d'un gène chez la bactérie ou au changement d'écotypes d'*A. thaliana* (Meyer *et al.*, 2005).

Bien que la compréhension de la transmission de bactéries phytopathogènes, telle que *Xcc*, à et par les semences soit un enjeu majeur de la maîtrise de leur qualité sanitaire, aucune étude moléculaire intégrée n'existe à notre connaissance sur ce type de pathosystème.

1.4. Eléments de la biologie de *X. campestris* pv. *campestris*

1.4.1. Le système de sécrétion de type III

Les protéines sécrétées (telles que les enzymes de dégradation des parois végétales et autres facteurs de virulence) sont des outils performants qui permettent aux bactéries d'interagir avec leur environnement proche. Plusieurs systèmes de sécrétion sont à l'heure actuelle connus et décrits chez les bactéries (**Figure 5**) et leur permettent de sécréter des toxines dans le milieu extracellulaire ou dans la plante hôte, des effecteurs, des adhésines, ... (Desvaux *et al.*, 2009).

Les bactéries pathogènes interagissent avec les cellules eucaryotes essentiellement *via* le système de sécrétion de type trois (SST3). Dans le cas particulier des interactions avec une cellule végétale, c'est le SST3 de type *hrp* (« hypersensitive reaction and pathogenicity ») qui intervient. Les gènes *hrc* (*hrp* conserved) et *hrp* codent la machinerie du système de sécrétion impliqué dans l'interaction plante/bactérie, tandis que les *xanthomonas* outer proteins (*xop*) codent des protéines, encore appelées « effecteurs de type III », qui transitent à travers ce système et déterminent en partie la spécificité parasitaire (Cornelis, 2006 ; Gürlebeck *et al.*, 2006). Les gènes *hrp* ont été découverts chez *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Lindgren *et al.*, 1986). Des mutants dans les gènes *hrp* sont incapables d'induire la réaction hypersensible sur des plantes hôtes résistantes ou sur des plantes non-hôtes, et sont également incapables de déclencher la maladie sur des plantes sensibles (Lindgren, 1997). L'expression des gènes *hrp* est induite *in planta*. En règle générale, les gènes *hrp* sont chromosomiques chez les bactéries des genres *Xanthomonas*, *Erwinia* et *Pseudomonas*, mais ils sont portés par un mégaplasmide chez les bactéries du genre *Ralstonia* (Boucher *et al.*, 2001). Ils sont regroupés dans une région (de 22 à 35 kb) contenant plus de 20 gènes organisés en 6 à 8 opérons (**Figure 6**). Parmi ces gènes *hrp*, neuf ont été renommés *hrc* (hrp conserved) car ils sont conservés chez toutes les bactéries pathogènes qui possèdent un SST3. Il existe également les gènes *hpa* (hrp-proteins associated)

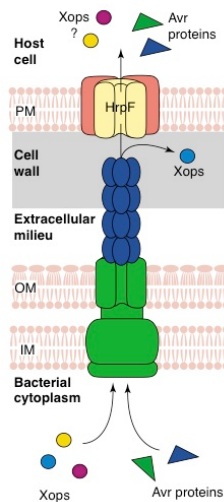


Figure 7. Représentation schématique du système de sécrétion de type III de la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *vesicatoria* (d'après Büttner et Bonas, 2002b).

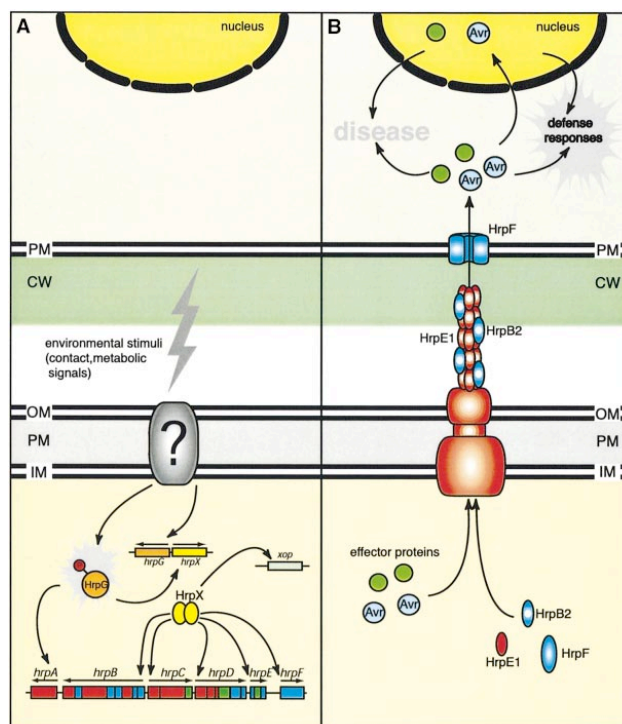


Figure 8. Modèle de régulation des gènes *hrp* et plus largement du système de sécrétion de type III chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (d'après Büttner et Bonas, 2002a). **A.** HrpG active l'expression d'HrpA, via HrpX, l'expression de *hrpB-hrpF* et de nombreux gènes *xop*. **B.** L'expression des gènes *hrp* est essentielle à la formation de l'appareil de sécrétion de type III qui traverse les deux membranes bactériennes et gouverne la sécrétion des protéines effectrices et Hrp. L'appareil de sécrétion est associé au pilus hrp qui traverse probablement la paroi. La sous unité majeure de ce pilus est la HrpE1. CW Cell wall, IM, inner membrane, OM, outer membrane, PM, plasma membrane.

qui ne sont pas essentiels pour le pouvoir pathogène de la bactérie. Ils contribuent néanmoins à la réussite de l'interaction avec la plante hôte (Huguet *et al.*, 1998 ; Büttner et Bonas, 2002a). C'est par exemple le cas des protéines de type harpines qui ne sont pas impliquées dans la structure de l'appareil de sécrétion. Elles sont dirigées vers la paroi externe des cellules de l'hôte et participent au transport des effecteurs de type 3 dans les cellules de la plante hôte (Vivian et Arnold, 2000). Les harpines ont la capacité d'éliciter une HR lorsqu'elles sont inoculées individuellement à la surface des plantes (Galan et Collmer, 1999 ; Büttner et Bonas, 2003; Grant *et al.*, 2006). Le terme d'effecteur de type 3 (ET3) a été proposé afin d'englober toutes les protéines qui transitent vers la plante via le système *hrp* (**Figure 7**), où ils fonctionnent en tant qu'éliciteurs ou facteurs de virulence (van Dijk *et al.*, 1999).

Le SST3 est un système *sec* - indépendant, c'est-à-dire que la sécrétion des protéines par l'appareil est réalisée sans que celles-ci ne présentent un signal d'exportation en N-terminal comme c'est le cas pour les SST2 et SST4 dits *sec* - dépendants. L'activation du système de sécrétion nécessite un contact de la bactérie avec la cellule végétale et il n'est pas spécifique d'un agent pathogène pour une plante hôte donnée. Le stimulus est perçu par un système à deux composantes qui transduit le signal jusqu'à la protéine HrpG (**Figure 8**). Le gène *hrpG* joue un rôle clé dans l'activation transcriptionnelle des gènes de pathogénie *hrp*. Il code un régulateur de réponse d'un système de transduction du signal à deux composantes. L'expression de ce gène est faible dans un milieu riche et nécessite des conditions *hrp*-inductrices (mimant la composition chimique de l'apoplasme des cellules végétales) pour l'activation des gènes qu'il régule (Wengelnik *et al.*, 1996). HrpG active ensuite l'expression, *via* HrpX, des gènes *hrpB* à *hrpF* et celle de nombreux autres gènes *xop* grâce à la reconnaissance d'une PIP-Box (Plant Inducible Promoter-box avec la séquence consensus TTCGC-N₁₅-TTCGC), d'une *hrpII*-box (motif dérivé de la PIP-box, avec la séquence consensus TTCG-N₁₆-TTCG) ou d'une -10 box (Koebnik *et al.*, 2006 ; Wengelnik and Bonas, 1996). L'expression des gènes *hrp* est essentielle pour la formation de l'appareil du système de sécrétion de type III qui passe à travers les deux membranes bactériennes et permet la sécrétion de protéines chaperonnes (de type Hpa, Hrp associated proteins) (Alfano et Collmer, 2004) et des effecteurs de type III (pour revue, Zhou et Chai, 2008). Cet appareil de sécrétion est associé au pilus Hrp constitué majoritairement de la protéine HrpE1 (Weber *et al.*, 2005) synthétisé grâce à HrpB2 (Hartman *et al.*, 2012). La translocation des effecteurs à travers la membrane plasmique végétale nécessite l'intervention de la protéine HrpF, qui pourrait former un pore dans cette dernière (Rossier *et al.*, 2000). La sécrétion de nombreuses protéines effectrices requiert l'intervention de protéines chaperonnes. Même si elles peuvent être

spécifiques d'un effecteur donné, elles peuvent également jouer un rôle général dans la sécrétion de plusieurs protéines, comme cela a été décrit pour la protéine HpaB de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Büttner *et al.*, 2004). Ces protéines chaperonnes confèrent une stabilité de conformation et donc la fonction biochimique des effecteurs dans la cellule bactérienne. En effet, les effecteurs adoptent leur conformation définitive dans la cellule eucaryote. Il est donc souvent proposé que ces chaperonnes du SST3 puissent empêcher les « misfolding » et par conséquent, leur dégradation dans la cellule bactérienne (Büttner et He, 2009).

Les effecteurs de type III (ET3) sont des protéines transloquées dans la cellule végétale où elles interfèrent avec les protéines de défense de l'hôte et/ou facilitent l'acquisition de nutriments (Büttner et He, 2009). Les ET3 constituent un large groupe diversifié de protéines de virulence qui miment la structure et la fonction des protéines eucaryotes. Une de leurs caractéristiques essentielles est leur architecture modulaire qui comprend des domaines ou des motifs leur conférant un large champ d'action dans la cellule eucaryote. Ces domaines et motifs offrent des perspectives d'études et constituent un répertoire de déterminants moléculaires ayant un rôle important lors de l'interaction. (Dean, 2011). Dans le genre *Xanthomonas*, le nombre de candidats et d'effecteurs connus s'élève à 40 (White *et al.*, 2009). Plusieurs effecteurs de ce genre bactérien sont connus pour supprimer les réponses PTI (PAMP [Pathogen-associated molecular pattern]-triggered immunity). Ce type de défense est suffisant pour empêcher la croissance des bactéries non-pathogènes dans les plantes. La protéine XopD supprime l'expression de gènes relatifs à la sénescence et à la défense chez la tomate et est donc associé à de faibles teneurs en acide abscissique et à un retard de l'apparition des symptômes des tissus infectés (Kim *et al.*, 2008). Un autre effecteur XopN, est capable d'inhiber l'expression de gènes impliqués dans la mise en place d'une réponse de défense chez la plante. Dans un système hétérologue, cette protéine supprime le dépôt de callose, constituant une défense physique contre les pathogènes, à la fois chez la tomate et *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2009).

Des travaux antérieurs menés dans l'équipe IRHS-EmerSys ont permis de démontrer qu'un SST3 fonctionnel est nécessaire pour une transmission efficace de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* à la semence de *Phaseolus vulgaris* par voie florale (Darsonval *et al.*, 2008). Les mutants altérés au niveau des protéines HrpG et HrpX, se transmettent moins fréquemment aux graines de haricot par la voie florale par rapport à la souche de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Or, ces deux mutants sont incapables de coloniser la phyllosphère suggérant que la nature

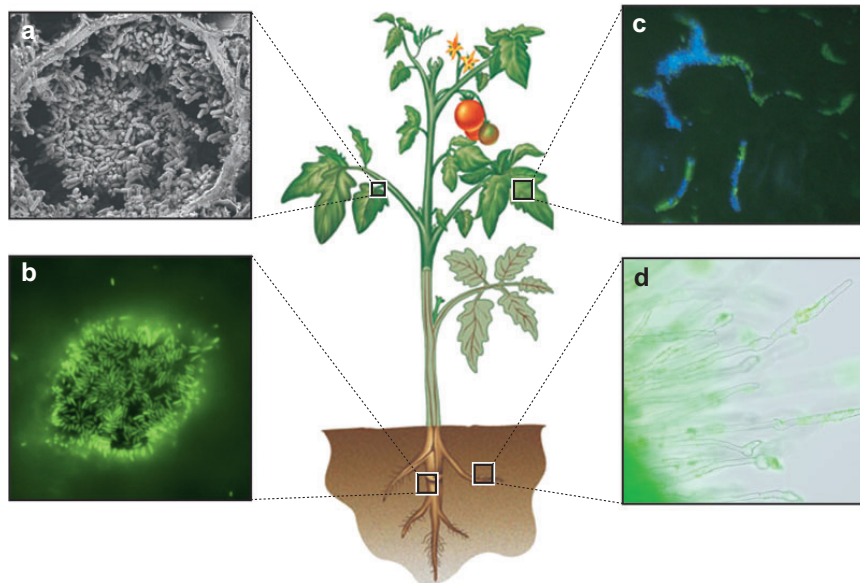


Figure 9. Biofilms microbiens à la surface (épiphyte) et à l'intérieur (endophyte) d'une plante (d'après Danhorn et Fuqua, 2007). (a) Photographie de biofilms de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* observés au microscope électronique à transmission dans les vaisseaux du xylème de maïs ; (b) Photographie de microcolonies d'*Agrobacterium tumefaciens* observées au microscope à fluorescence ; (c) Photographie d'une feuille de haricot observée au microscope à fluorescence présentant des agrégats multi-espèces avec *Pseudomonas syringae* et *Pantoea agglomerans* exprimant la GFP et CFP ; (d) Photographie de *Sinorhizobium meliloti* exprimant la GFP observée au microscope optique et à fluorescence.

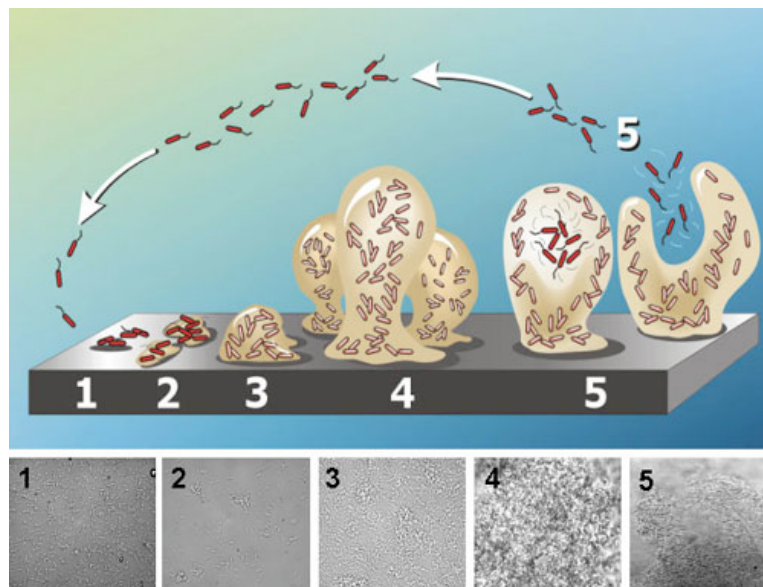


Figure 10. Représentation des cinq étapes de développement d'un biofilm (d'après Stoodley *et al.*, 2002). Etape 1 : Attachement initial des cellules aux surfaces ; Etape 2 : Production d'EPS favorisant l'attachement irréversible des bactéries ; Etape 3 : Développement précoce du biofilm ; Etape 4 : Maturation du biofilm ; Etape 5 : Dispersion de cellules isolés du biofilm mature. Les photographies représentent chaque étape du développement d'un biofilm sur une lame de verre observées au microscope électronique à transmission chez *Pseudomonas aeruginosa*.

physique et chimique de la phyllosphère et des boutons floraux est très différente. Ces mêmes mutants sont incapables de se transmettre par voie vasculaire, suggérant qu'un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante, est engagé lors de cette phase. Des mutants affectés au niveau de la structure du SST3, incapables de synthétiser les protéines HrcJ, HrcR, HrcT, HrcV ou HrpB2, présentent des fréquences de transmission intermédiaires entre les mutants déficients dans la production de HrpG ou HrpX et la souche sauvage de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Cela suggère que les produits des gènes *hrpG* et *hrpX* interviennent dans la régulation d'autres mécanismes moléculaires nécessaires à la transmission par voie florale de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* aux graines de haricot (Darsonval *et al.*, 2008).

1.4.2. La formation de biofilms via la synthèse d'exopolysaccharides

Dans la plupart des environnements, l'adhésion des bactéries à une surface dans une structure de type biofilm est le principal mode de vie microbien (**Figure 9**) (Danhorn et Fuqua, 2007). Les pathogènes vasculaires présents dans le xylème des plantes forment très souvent des biofilms à l'intérieur des vaisseaux et produisent de grandes quantités d'exopolysaccharides (EPS). Cette matrice de sucres conduit à l'obstruction des vaisseaux endommageant les tissus végétaux à proximité.

Les biofilms sont définis comme un assemblage de cellules adhérentes entre elles et à une surface biotique ou inerte, englobé dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) (Costerton *et al.*, 1999). L'ensemble est constitué d'une superposition de cellules bactériennes conduisant à la formation d'une réelle barrière physique et à l'établissement de gradients chimiques (Morris *et al.*, 1997). Les biofilms associés aux plantes contiennent généralement plusieurs espèces bactériennes favorisant ainsi les échanges génétiques et métaboliques. La formation d'un biofilm mono ou multi-espèces est un processus très régulé et complexe nécessitant un comportement collectif de coordination, d'interaction et de communication (Danhorn et Fuqua, 2007). Les bactéries se déplacent sur la surface à la recherche d'un site favorable à l'association en biofilms. La formation d'un biofilm peut ensuite être décrite en cinq étapes (**Figure 10**). Les bactéries s'attachent dans un premier temps à la surface foliaire ou aux cellules bactériennes préalablement fixées (Craig *et al.*, 2004; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). L'adhésion des bactéries entre elles devient ensuite stable lors de la seconde étape et des microcolonies se forment lors d'une troisième étape. Le biofilm entre alors dans une phase de maturation pendant laquelle les bactéries se multiplient, forment de nouvelles microcolonies et vont produire des exopolysaccharides afin de stabiliser la structure qui devient

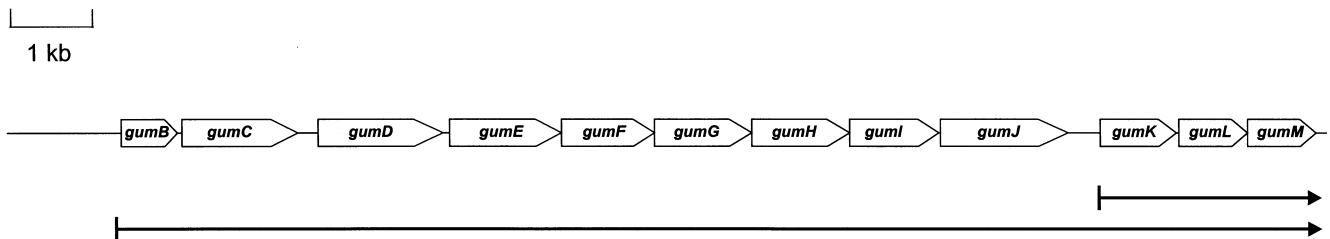


Figure 11. Organisation génétique du cluster *gum* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* montrant l'agencement des gènes entre eux (d'après Becker *et al.*, 1998).

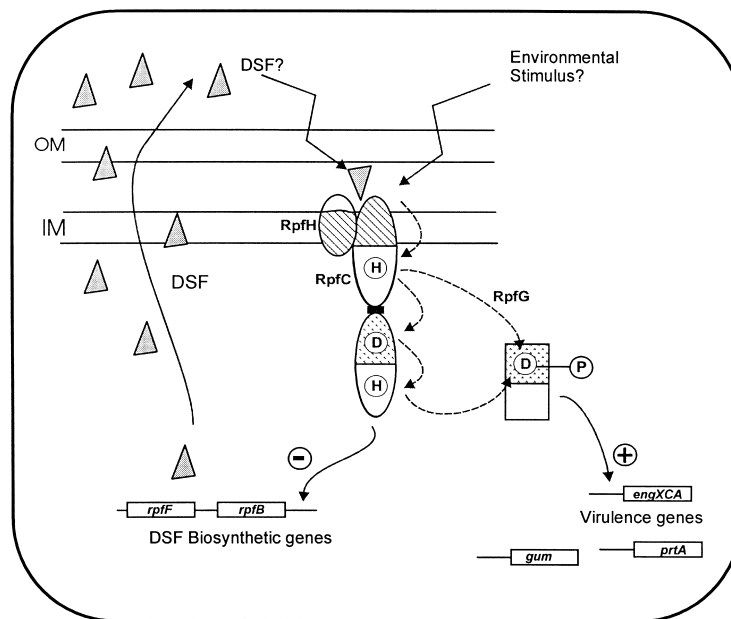


Figure 12. Modèle indiquant le rôle respectif des gènes *rpfC*, *rpfH* et *rpfG* dans la régulation de l'expression des facteurs de pathogénie (d'après Slater *et al.*, 2000).

tridimensionnelle (Watnick et Kolter, 2000). Une matrice d'EPS englobe alors le biofilm, ce qui lui confère une résistance face à divers stress environnementaux de type physiques, chimiques ou biologiques (Danhorn et Fuqua, 2007). Cette matrice d'exopolysaccharides peut également avoir un rôle dans l'agressivité de la bactérie en obstruant le système vasculaire et en empêchant ainsi le passage de la sève brute (Roper *et al.*, 2007). La dernière étape se traduit par une libération de cellules bactériennes qui reprennent leur forme planctonique, assurant ainsi la propagation de la maladie dans une plante par exemple.

La formation de biofilms, processus finement régulé génétiquement, est une structure tridimensionnelle indispensable à la colonisation d'une plante. L'étude du comportement de mutants altérés dans une des étapes nécessaires à la formation de biofilms pourrait permettre d'identifier des déterminants clés de la transmission à et par les graines de *Xcc*. En effet, l'implication de structures adhésives, telles que les adhésines PilA, FhaB1 et FhaB2, a été démontrée dans la transmission de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* à la semence de haricot par voie vasculaire et ultérieurement dans la phase d'adhésion de la bactérie à la graine (Darsonval *et al.*, 2009). Un mutant, altéré au niveau de la production de l'hémagglutinine filamenteuse YapH, se transmet de manière aussi efficace que la souche sauvage aux graines par voie vasculaire, alors que sa capacité d'adhérer sur des graines est clairement altérée.

La biosynthèse du xanthane est assurée par un cluster de 12 gènes (*gumB* à *gumM*), communément appelé « cluster *gum* » (**Figure 11**). Ces 12 gènes codent pour des protéines responsables de l'assemblage des unités pentasaccharidiques, de la polymérisation et de l'exportation de cet exopolysaccharide (Crossman *et al.*, 2004). La synthèse du xanthane est régulée entre autre par un cluster de 9 gènes (*rpfA* à *rpfI*), nommé *rpf* pour « regulation of pathogenicity factors ». Les gènes *rpfC* et *rpfG* codent pour un système de transduction du signal à deux composantes dans lequel RpfC est le domaine senseur et RpfG, le domaine régulateur. D'après la **figure 12**, la perception d'un signal environnemental de type DSF (Diffusible Signaling Factor) par le domaine senseur entraîne la phosphorylation de RpfC. La protéine RpfH joue un rôle accessoire lors de la fixation des ligands. L'autophosphorylation de RpfC entraîne la phosphorylation du régulateur de réponse RpfG. Cet événement régule positivement l'expression des gènes impliqués dans la virulence (endoglucanase et protéase) et le cluster *gum*. Le mécanisme par lequel RpfG exerce son effet régulateur est encore méconnu. RpfC, quant à lui, régule négativement *rpfF* et *rpfB* qui sont impliqués dans la biosynthèse de DSF (Slater *et al.*, 2000).

Les DSF (acide *cis*-11-méthyl-2-dodecenoïque) sont des dérivés d'acide gras. Ces molécules signal s'accumulent dans le milieu avec l'augmentation de la population et régulent

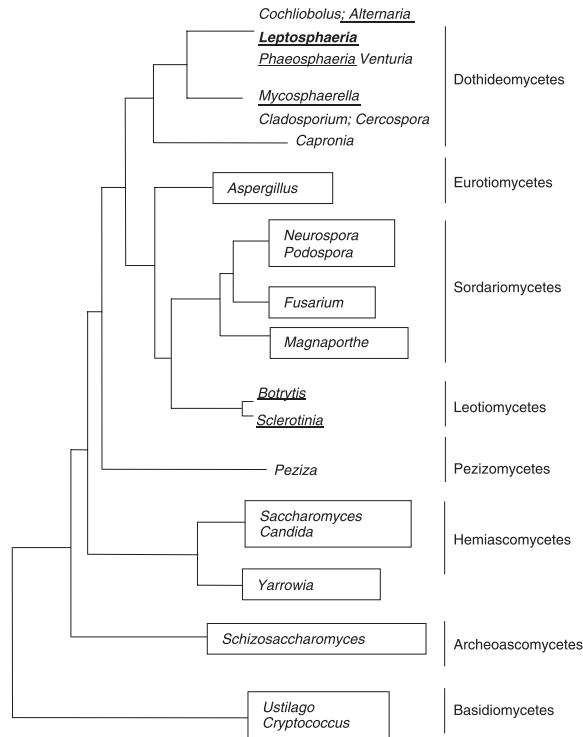


Figure 13. Arbre phylogénétique des Ascomycètes enraciné avec les espèces de Basidiomycètes (d'après Rouxel et Balesdent, 2005).

l'expression des gènes *via* des récepteurs protéiques. Ce mécanisme de communication entre les bactéries, taille de population-dépendant, est nommé « quorum sensing ». La découverte de ces molécules a eu lieu lors d'expériences de génétique moléculaire visant à identifier les facteurs responsables de la régulation de la synthèse d'enzymes de dégradation extracellulaires et d'exopolysaccharides extracellulaires (EPS). Cela permis de mettre en lumière le cluster *rpf*, cité précédemment. La synthèse de DSF a longtemps été considérée comme propre au genre *Xanthomonas* mais de nouvelles molécules proches des DSF ont été découvertes chez d'autres bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*. La signalisation via les DSF influence l'expression de gènes impliqués dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la résistance à des composés toxiques, la tolérance aux stress en général, la synthèse d'enzymes extracellulaires, la mobilité, le chimiotactisme, la synthèse d'adhésines, la synthèse d'EPS... (Ryan and Dow, 2011).

2. *Alternaria brassicicola*

2.1. Présentation du genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* renferme des espèces fongiques majoritairement saprophytes extrêmement répandues notamment dans les sols, sur les plantes, dans les aliments ou dans l'air (Thomma, 2003). Quelques espèces sont pathogènes des plantes et causent une large gamme de maladies sur de nombreuses plantes cultivées telles que les céréales, les espèces ornementales et légumières. Ces champignons peuvent également causer des dégâts sur les produits après la récolte empêchant ainsi leur commercialisation.

En 1817, Nees décrit pour la première fois un champignon présentant des spores en chaînettes possédant des becs filiformes, qu'il nomme *Alternaria tenuis*. En raison de l'absence d'observation d'un état sexué chez une grande majorité d'espèces d'*Alternaria*, ce genre fut placé dans la classe des champignons imparfaits, les Deutéromycètes. Par la suite, la complexité taxonomique des *Alternaria* liée à leur diversité et leur hétérogénéité a généré de nombreuses classifications. L'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques, a abouti au classement du genre parmi les Ascomycètes au sein de la classe des Dothideomycètes (**Figure 13**) (Rouxel et Balesdent, 2005).

Les champignons appartenant au genre *Alternaria* se multiplient de manière asexuée à partir de filaments spécialisés appelés conidiophores où vont être différenciées des conidies (ou

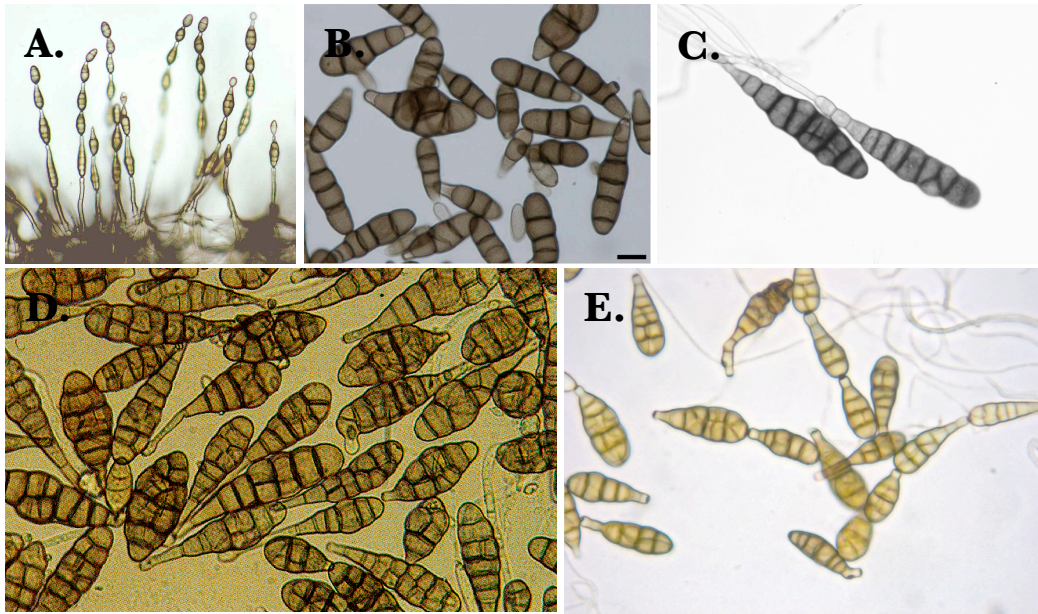


Figure 14. Représentation de la diversité morphologique des conidies du genre *Alternaria*. **A.** Conidies d'*A. alternata*. **B.** Conidies d'*A. brassicicola*. **C.** Conidies d'*A. dauci*. **D.** Conidies d'*A. triticina* et **E.** Conidies d'*A. tenuissima*.

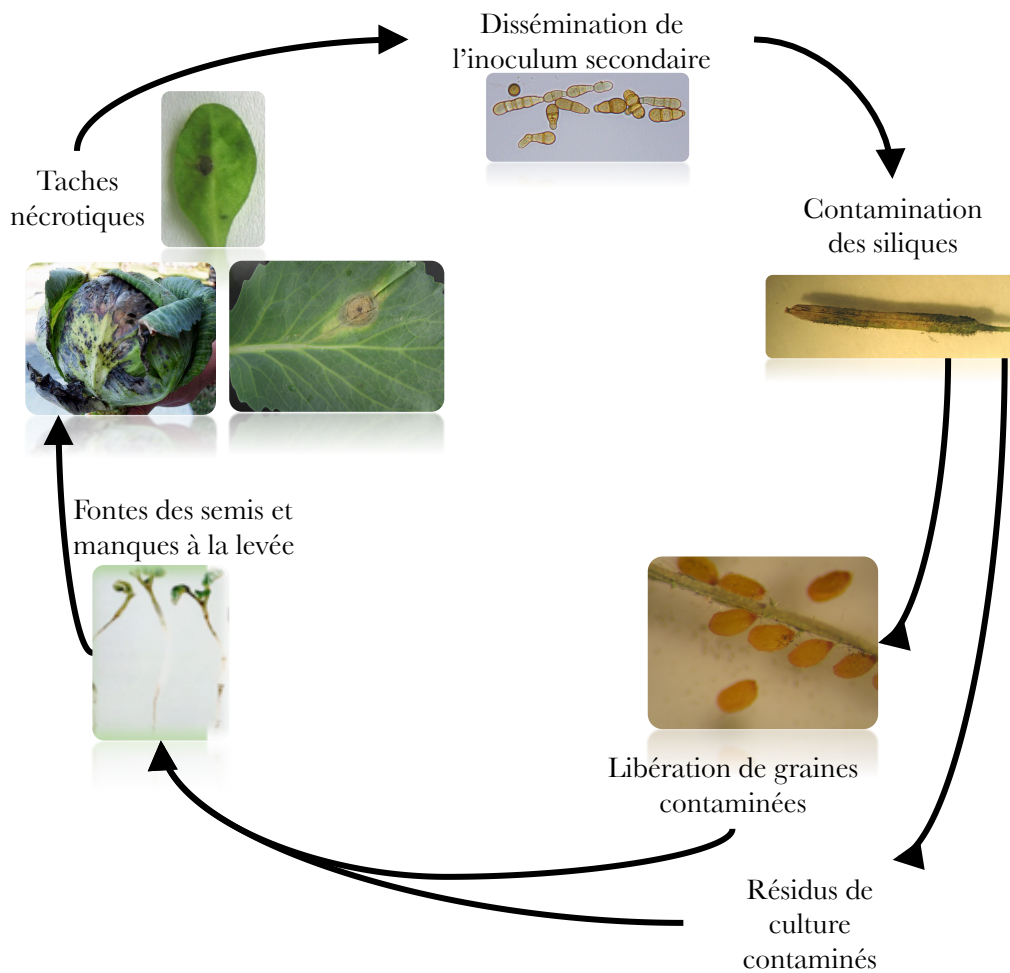


Figure 15. Représentation schématique du cycle de vie d'*Alternaria brassicicola*.

spores), brunes, très caractéristiques du genre, organisées en chaînette. Ce sont des dictyospores : conidies piriformes (forme d'une massue), à la base élargie avec des *septa* transversaux, obliques et longitudinaux en nombre variable (Thomma, 2003). Leur extrémité est constituée d'une partie rétrécie plus ou moins longue appelée le «bec». Elles mesurent entre 50-100 µm de long et 3-16 µm de large. Une grande diversité de formes est observable selon les espèces d'*Alternaria* (**Figure 14**). Une classification effectuée au sein du genre par Neergard (1945) se base sur la taille des conidies et sur la longueur des chaînettes qu'elles constituent. Les *Longi-catenae* présentent des chaînes comprenant un grand nombre de petites spores, les *Brevi-catenae* possédant des spores plus volumineuses, une réduction de la longueur des chaînes et un cloisonnement plus élaboré et les *Non-catenae* produisant de grosses spores isolées au cloisonnement complexe et dont le bec persiste sous forme d'un filament.

2.2. Le cycle de vie d'*A. brassicicola*

A. brassicicola est l'une des trois espèces fongiques répertoriées au sein du genre *Alternaria* pour leur capacité à provoquer une maladie très préjudiciable sur de nombreuses plantes cultivées de la famille des *Brassicaceae* (*Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Raphanus sativus*,...). L'alternariose, encore appelée « maladie des taches noires » (ou « blackspot ») se caractérise par des taches nécrotiques brunes à noires, arrondies et entourées d'un halo chlorotique plus clair. Le cycle de développement de cette maladie est représenté sur la **Figure 15**. De par sa capacité à se transmettre à et par les semences, *A. brassicicola* peut engendrer des manques à la levée en inhibant la germination. Si toutefois la graine germe, la maladie peut se déclarer sur les plantules et entraîner une fonte des semis. La maladie peut également se développer sur tous les organes végétatifs aériens de la plante où les symptômes typiques de l'alternariose sont clairement visibles (**Figure 15**) (Rotem, 1994). La zone nécrotique du symptôme est le lieu de production des conidies, organes de dissémination asexuée d'*A. brassicicola*, qui vont assurer la propagation de la maladie sur d'autres plantes hôtes environnantes. L'apparition de symptômes sur les tiges et les siliques de la même plante ou sur des plantes voisines peut alors être visible. De plus, la contamination d'inflorescences telles que les pommes ou têtes de choux rend le produit impropre à la commercialisation. La contamination des siliques et des graines permet d'amorcer un nouveau cycle infectieux. Une attaque sévère d'*A. brassicicola* caractérisée par la présence de nombreuses nécroses sur les siliques provoque leur ouverture prématurée et une chute des graines. Enfin, les résidus de culture peuvent également être une source d'inoculum car le champignon a la capacité de rester à l'état latent sur ces débris (Köhl

et al., 2010).

Il existe différentes méthodes de lutte pour limiter les dégâts occasionnés par l'alternariose. La première solution est l'application de fongicides de la famille des dicarboximides et des phénylpyrroles, ou encore des triazoles (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004). Cependant, l'apparition d'isolats d'*A. brassicicola*, hautement résistants aux fongicides de type dicarboximide et phénylpyrrole, a pu être constatée et pourrait être due à une utilisation régulière et non raisonnée de ces matières actives en traitement de cultures (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004; Avenot *et al.*, 2005). Aucune variété de *Brassica* résistante à l'alternariose n'est à l'heure actuelle disponible. D'autres méthodes de lutte doivent alors être envisagées telles que la lutte biologique et la sélection sanitaire des lots de semences. Même s'il n'existe pas de seuil officiel, cette dernière méthode préventive permet de prévenir une apparition très précoce de la maladie. En effet, la présence de ce microorganisme, considéré comme un pathogène de qualité, doit être impérativement maîtrisée dans le but de répondre au mieux aux règles commerciales imposées par le marché.

2.3. Le pathosystème *A. thaliana*/*A. brassicicola*

A. brassicicola est pathogène sur les plantes de la famille des *Brassicaceae* cultivées mais également sur la plante modèle *A. thaliana*. Parmi les nombreux pathosystèmes qui ont été développés ces dernières années avec *Arabidopsis* pour comprendre les mécanismes moléculaires de la virulence des bioagresseurs et de la résistance des plantes, l'interaction d'*A. thaliana* avec *A. brassicicola* occupe une place de choix en tant que modèle de l'interaction nécrotrophe au stade végétatif. Des études pionnières sur ce pathosystème ont permis de montrer le rôle clé de la phytoalexine camalexine dans la tolérance de la plante à *A. brassicicola*. L'inactivation du gène *pad3* d'*A. thaliana* altère en effet significativement la résistance à ce champignon suggérant le rôle primordial de ce métabolite dans le contrôle de l'agent pathogène par la plante lors de l'interaction (Thomma *et al.*, 1999). Des études plus récentes ont mis en évidence des différences de sensibilités entre écotypes d'*A. thaliana* (Mukherjee *et al.*, 2009) et caractérisé le protéome de cette plante infectée par *A. brassicicola* (Mukherjee *et al.*, 2010). De nombreuses études, menées sur l'interaction et les mécanismes moléculaires mis en jeu, ont fait l'objet de publications ces dernières années. Parmi celles-ci, de récents travaux ont montré la mise en place d'une réponse adaptative d'*A. brassicicola* face aux métabolites de défense de la plante hôte (Sellam *et al.*, 2007 ; Joubert *et al.*, 2011a, b) et identifié des facteurs impliqués dans la tolérance à ce pathogène chez *A. thaliana* (Oh *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2006).

Des travaux ont ainsi permis de mettre en corrélation la teneur de la plante en phytoalexine camalexine avec la tolérance à *A. brassicicola*. L'inactivation du gène *pad3* d'*A. thaliana* altère significativement la résistance à ce champignon suggérant le rôle primordial de ce métabolite dans le contrôle de l'agent pathogène par la plante lors de l'interaction (Thomma *et al.*, 1999).

Bien que ce pathosystème soit considéré comme un modèle de l'interaction nécrotrophe, l'absence d'étude de l'interaction au stade reproducteur constitue une carence à combler pour mieux comprendre le cycle de développement de la maladie dans son intégralité.

2.4. Eléments de la biologie d'*Alternaria brassicicola*

2.4.1. Enzymes lytiques d'*A. brassicicola*

Les champignons phytopathogènes se heurtent pour leur pénétration dans les tissus hôtes aux barrières physiques de la plante. Il s'agit principalement de la cuticule qui constitue une barrière naturelle. *A. brassicicola* peut profiter des ouvertures naturelles (stomates ou blessures) pour envahir les tissus végétaux. Une autre stratégie consiste à pénétrer grâce à la production d'enzymes lytiques (Walton, 1994 ; Idnurm et Howlett, 2001). Ces enzymes correspondent souvent à des pectinases, des cutinases, des cellulases, des xylanases, des phospholipases et des protéases (Walton, 1994). Leur rôle va être de dégrader les parois cellulaires et d'autres barrières comme la cuticule qui constituent une défense physique constitutive des plantes. Cependant, l'implication de ces enzymes dans la pathogénie fongique n'est pas évidente à établir, puisque la plupart de ces enzymes sont codées par des familles multigéniques (Lebeda *et al.*, 2001). L'inactivation d'un gène est alors souvent sans effet sur le pouvoir pathogène du champignon, conséquence d'une redondance fonctionnelle. Comme c'est le cas de plusieurs champignons phytopathogènes (Knogge, 1996), *A. brassicicola* semble produire un mélange de plusieurs enzymes lytiques (cutinases et lipases) afin de franchir les barrières physiques des tissus des plantes hôtes. Le rôle de plusieurs lipases de type sérine estérase dans la pénétration et/ou l'adhésion d'*A. brassicicola* a été clairement établi. Certaines sont détectées précocement au niveau du site d'infection, dès le contact des conidies avec les tissus hôtes, et l'addition d'anticorps anti-lipase ou d'un inhibiteur chimique de l'activité sérine hydrolase a pour effet de réduire considérablement l'apparition des symptômes (Berto *et al.*, 1997, 1999). La disruption d'un gène codant une cutinase chez *A. brassicicola* a un effet drastique sur la capacité du champignon à utiliser les produits de dégradation de la cutine comme source carbonée, mais cette mutation n'entraîne cependant pas de diminution de

l'agressivité (Yao et Köller, 1995).

La sécrétion de ces enzymes est dépendante de plusieurs mécanismes moléculaires bien distincts. Chez *A. brassicicola*, la voie de signalisation gouvernée par la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Fus3 semble contrôler la production de plusieurs enzymes hydrolytiques (Cho *et al.*, 2007). Des études récentes indiquent que des facteurs de transcription, tels que AbVf19 et Hac1, impliqués respectivement dans l'expression de facteurs de virulence et dans la régulation de l'UPR (Unfolded Protein Response), interviennent dans l'expression et la sécrétion d'enzymes chez ce pathogène (Srivastava *et al.*, 2012 ; Joubert *et al.*, 2011b).

2.4.2. Toxines d'*A. brassicicola*

Le genre *Alternaria* renferme une dizaine d'espèces pathogènes productrices de HST (Host-Specific Toxins) (Otani *et al.*, 1995 ; Akamatsu *et al.*, 1999). Les HSTs sont définies comme des effecteurs qui induisent une toxicité et la maladie uniquement chez des génotypes de l'hôte exprimant, de manière spécifique, un gène de sensibilité (Friesen *et al.*, 2008). Peu de données sont disponibles concernant les toxines d'*A. brassicicola*. La toxine AB est une toxine HST de nature vraisemblablement protéique, qui est produite uniquement au niveau du site d'infection et dont l'activité est sensible à la chaleur et à la protéinase K (Otani *et al.*, 1998). Des études plus récentes ont démontré que la production de la toxine AB est induite par des oligosaccharides provenant de la dégradation des tissus des plantes hôtes (Oka *et al.*, 2005). Cependant, le gène codant cette protéine n'a jamais été caractérisé jusqu'à maintenant. Plus récemment, Pedras et collaborateurs (2009) font état d'une phytotoxine qui semble être la HST majeure d'*A. brassicicola* : la brassicoline A. Responsable de la chlorose et de la nécrose des tissus végétaux, elle apparaît comme la plus phytotoxique autant pour les *Brassicaceae* sensibles à l'alternariose comme *B. juncea* que les plus tolérantes comme *B. napus*. L'étude de sa structure révèle que ce serait un isocyanide, dérivé du mannitol entièrement acétylé associé à plusieurs groupements chimiques (Gloer *et al.*, 1988). Une étude récente menée dans le laboratoire IRHS-Fungisem a cependant montré que cette toxine était présente dans les filtrats de culture de souches déficientes pour deux enzymes clés du métabolisme du mannitol (Teyssier, 2012).

2.4.3. Protection d'*A. brassicicola* contre les défenses de l'hôte

Au cours de l'infection, le champignon est confronté aux défenses physiques et chimiques de la plante. Parmi elles, des composés issus du métabolisme secondaire des *Brassicaceae* aux activités antimicrobiennes peuvent constituer une barrière chimique contre une large gamme de parasites tels que les bactéries, les insectes, les nématodes ou les champignons (Kliebenstein, 2004). Ces composés peuvent être accumulés de manière constitutive dans les tissus de la plante et sont alors appelés phytoanticipines. Une deuxième catégorie peut être synthétisée *de novo* lorsqu'une agression parasitaire est détectée ou lors d'une élicitation : il s'agit des phytoalexines.

2.4.3.1. Les phytoanticipines des Brassicaceae

Les principales phytoanticipines des *Brassicaceae* sont les glucosinolates (Halkier *et al.*, 2006), hétérosides dérivés d'acides aminés ; ils sont riches en soufre. Lors d'une rupture de l'intégrité cellulaire, conséquence d'une agression par un parasite par exemple, les compartiments cellulaires sont rompus et les glucosinolates accumulés sont transformés par des thioglucosidases endogènes par des enzymes stockées initialement dans les vacuoles. Ces enzymes, appelées myrosinases, clivent le groupement glucose des glucosinolates, il en résulte entre autre des composés à forte activité biologique : les isothiocyanates (ITC). Certains des produits issus de cette dégradation sont connus pour inhiber la croissance des micro-organismes *in vitro* et *in planta* (Tierens *et al.*, 2001 ; Sellam *et al.*, 2007).

2.4.3.2. Les phytoalexines

Les phytoalexines ont été décrites pour la première fois en 1940 dans le cadre de l'interaction *Phytophthora infestans*/*Solanum tuberosum* (Müller, 1940). Depuis, plus de 40 phytoalexines indoliques ont été isolées et étudiées chez les *Brassicaceae*. Leur accumulation résulte d'une activation génique spécifique et d'une synthèse *de novo* d'ARNm et de protéines, en réponse à un stress biotique ou à des stimuli abiotiques. Elles sont issues du métabolisme du tryptophane, un acide aminé à la base de la synthèse de nombreuses molécules de défense des *Brassicaceae* (Zhao *et al.*, 1998). Leur accumulation pourrait provoquer l'arrêt du développement de l'agent pathogène, voire du processus nécrotique au niveau foliaire.

Les deux phytoalexines majeures étudiées chez les *Brassicaceae* sont la brassinine (phytoalexine majeure des *Brassicaceae* cultivées) et la camalexine (phytoalexine majeure d'*A. thaliana*). Le rôle de la brassinine est double dans la mesure où elle sert à la fois de composé antifongique mais aussi de précurseur à la biosynthèse d'autres phytoalexines. Il est décrit que la brassinine dispose d'un pouvoir antifongique moins prononcé que d'autres phytoalexines (Pedras *et al.*, 2007; Sellam *et al.*, 2007). Elle serait par contre un précurseur d'autres phytoalexines à action fongitoxique plus élevée (Pedras *et al.*, 2007) comme la spirobrassinine, la cyclobrassinine ou encore la brassilexine, qui présentent des activités antifongiques nettement plus prononcées notamment sur la croissance d'*A. brassicicola* ou *Botrytis cinerea* (Pedras *et al.*, 2011). La camalexine a été découverte chez *Camelina sativa* suite à l'infection par *Alternaria brassicae* (Browne, 1991). L'inactivation du gène *pad3* d'*A. thaliana*, codant la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de cette molécule, altère significativement la résistance face à *A. brassicicola*.

2.4.3.3. Les mécanismes de protection fongiques

Face à ces molécules de défense, le champignon doit mettre en place différentes stratégies pour se protéger ou diminuer leur charge toxique et ainsi continuer son cycle infectieux. Il existe trois stratégies majoritaires qui sont la détoxification, l'exportation des molécules et la mise en place d'un mécanisme de type compensatoire au niveau pariétal.

- **La détoxification cellulaire**

La détoxification consiste à dégrader les molécules toxiques en composés moins toxiques ou plus tolérables pour le champignon. La détoxification de la camalexine a été mise en évidence chez *Sclerotinia sclerotiorum* (Pedras *et al.*, 2004). Aucune enzyme de détoxification de la camalexine n'a été, à ce jour, identifiée chez *A. brassicicola*. Concernant la brassinine, trois enzymes de détoxification ont été mises en évidence. Tout d'abord, une brassinine oxydase et une brassinine hydrolase ont été identifiées chez *L. maculans*, puis une brassinine glucosyltransférase a été décrite chez *S. sclerotiorum* (Pedras *et al.*, 2010). Une brassinine hydrolase (BH) a été récemment découverte chez *A. brassicicola* et est capable de transformer le groupement dithiocarbamate en indolyl-3-methanamine (Pedras *et al.*, 2009). Des travaux récents conduits dans l'équipe IRHS-FungiSem ont montré que des mutants d'*A. brassicicola* déficients pour cette enzyme étaient significativement plus sensibles à la brassinine que la

souche sauvage d'origine (Teyssier, 2012).

- **L'exportation des molécules de défense**

L'exportation des molécules de défense en dehors de la cellule consiste en la surexpression de systèmes d'efflux empêchant l'accumulation de métabolites potentiellement antifongiques à des niveaux toxiques au niveau cellulaire. Dans ce cas, l'efflux est assurée par des transporteurs membranaires de type ATP-binding cassette (ABC) et les «Major Facilitator Superfamily» (MFS). Le lien entre l'aptitude à contourner les effets toxiques des métabolites antimicrobiens produits par les plantes hôtes *via* ce mécanisme d'efflux et le pouvoir pathogène a été clairement établi chez certains champignons comme *Botrytis cinerea* (Schoonbeek *et al.*, 2002) et *Magnaporthe grisea* (Urban *et al.*, 1999). En particulier il a été montré qu'un tel mécanisme d'efflux médié par l'ABC transporteur BcAtrB constituait un mécanisme clé de protection de *B. cinerea* contre les effets toxiques de la camalexine lors de l'interaction avec *A. thaliana* (Stefanato *et al.*, 2009)

- **Le mécanisme compensatoire**

Sellam et collaborateurs (2007), ont émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une troisième stratégie de protection de la cellule fongique par l'intermédiaire d'un mécanisme compensatoire visant à renforcer l'intégrité cellulaire et pariétale face à la phytoalexine camalexine (Sellam *et al.*, 2007). Cette réponse adaptative se traduit par l'activation de voies métaboliques impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire par renforcement de la paroi ou/et de la membrane pour limiter la pénétration des xénobiotiques ou réparer leurs dommages. Des travaux récents menés au sein de l'équipe IRHS-Fungisem ont permis de confirmer qu'*A. brassicicola* est capable, *in planta*, de tolérer la charge fongitoxique de la brassinine ou de la camalexine notamment par la mise en place d'un mécanisme compensatoire. Leurs résultats montrent que les voies de signalisation de l'intégrité cellulaire (Cell Wall Integrity), de l'osmolarité cellulaire (High Osmolarity Glycerol) et de l'Unfolded Protein Response (UPR) ont un rôle central dans la mise en place de ce mécanisme compensatoire de renforcement pariétal.

Partie 2 : La transmission à et par la semence d'organismes phytopathogènes

I. La graine, un microenvironnement particulier

La graine est un organe qui assure la reproduction des végétaux supérieurs. Elle provient exclusivement de l'évolution de l'ovule après fécondation (Côme *et al.*, 1982) et est donc la structure qui contient et protège l'embryon végétal.

1. Caractéristiques physiologiques et structurales des graines

1.1. Caractéristiques physiologiques

Les graines peuvent être scindées en deux catégories liées à leur aptitude à la dessiccation. Les graines orthodoxes, telles que celles d'*A. thaliana* ou plus largement des *Brassicaceae* cultivées, ont une teneur en eau très faible (de l'ordre de 10 à 15%) et peuvent ainsi résister à une complète dessiccation et survivre à l'état sec pendant de longues périodes de temps (Buitink et Leprince, 2008). Cependant, il existe des graines orthodoxes partiellement humides telles que les graines de tomate ou de concombre contenues dans les fruits charnus. La plupart supporte donc parfaitement une période de dessiccation. Cette classe regroupe une grande majorité d'espèces horticoles et cultivées. La longévité de ces graines est fonction de plusieurs paramètres tels que des facteurs génétiques (effet du génotype) et environnementaux (la durée de conservation, la température et le taux d'humidité lors de la conservation). Les conditions de stockage optimales varient selon les espèces mais requièrent des températures basses et des valeurs d'humidité relative entre 11 et 35% (Vertucci *et al.*, 1994). La température a une influence sur la longévité des graines ; plus basse est la température, meilleure sera la conservation. Ceci est dû au fait que des températures basses diminuent la vitesse des processus physiologiques liés à la détérioration. L'humidité relative influence sur l'activité de l'eau (noté a_w), qui est fonction de l'humidité relative de l'environnement. En d'autres termes, si cette dernière est égale à 70% à un temps t , l'activité de l'eau sera égale à $a_w(t) = 0,7$. L'activité de l'eau illustre le statut de l'énergie de l'eau et, par conséquent, son degré de disponibilité et sa mobilité dans un corps (Vertucci et Leopold, 1987).

D'autre part, il existe des graines récalcitrantes à la dessiccation qui possèdent une teneur en eau élevée. Cette classe regroupe principalement des espèces non-pionières de forêts tropicales. À l'inverse des graines orthodoxes, le taux de détérioration de ces graines est plus

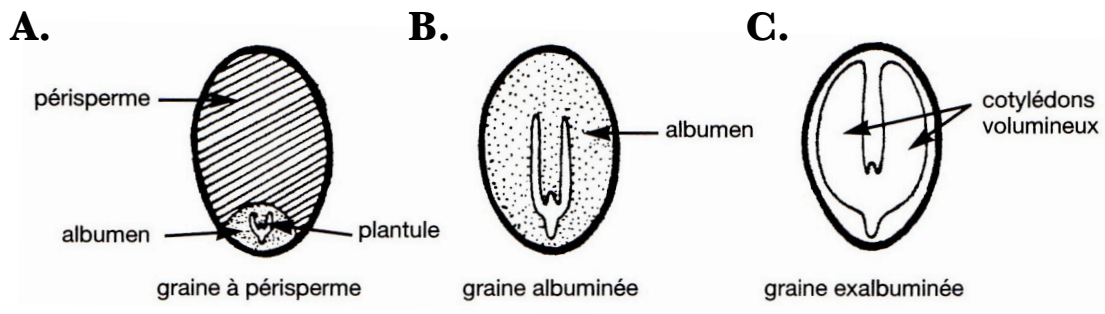


Figure 16. Schémas de coupes de graines à péricarpe (A.) albuminée (B.) et exalbuminée (C.) (d'après Lafon *et al.*, 1996).

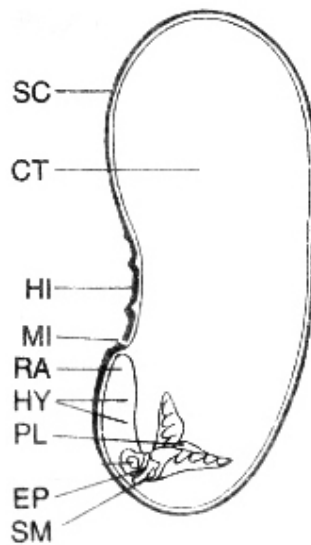


Figure 17. Représentation schématique de l'anatomie d'une graine de Dicotylédones (haricot). N, nucelle ; IN(SC), tégument de la graine ; EC(EM), cellule œuf (embryon de la plante) ; MI, micropyle ; VT, vaisseau vasculaire ; FU(FS), funicule (cicatrice du funicule : hile) ; RA, radicule ; CT, cotylédon ; HI, hile ; HY, hypocotyle ; PL, plumule ou tige ; EP, épicotyle ; SM, méristème de la tige. (d'après Maude, 1996)

difficile à contrôler car elles sont très vite endommagées par une dessiccation. Elles ne peuvent pas être conservées à des températures inférieures à 0°C car leur structure très hydratée (20 à 50 % du poids frais) serait immédiatement endommagée par la formation de glace. Les conditions de stockage restent néanmoins spécifiques à chaque type d'espèce. Ainsi, une température minimale de conservation de 15°C associée à une humidité relative élevée est une règle à respecter pour la conservation des graines récalcitrantes (Cromarty *et al.*, 1990). Cependant, ces conditions sont également favorables au développement des micro-organismes et au démarrage prématuré de la germination. La conservation optimale de ces graines constitue donc un réel défi.

La nature physiologique de la graine, liée principalement à sa teneur en eau à la récolte, va influencer les capacités de survie des microorganismes transmissibles par les semences. En effet, ces derniers seront confrontés à des teneurs en eau variables nécessitant la mise en place ou non de mécanismes d'adaptation (Baker et Smith, 1966).

1.2. Morphologie et structure d'une graine

Lorsque la double fécondation de l'ovule a eu lieu, les deux zygotes se développent et ont une destinée différente : le zygote principal donnera l'embryon de la graine et le zygote accessoire donne un tissu plus ou moins développé selon la graine, l'albumen (Lafon *et al.*, 1996). Selon le développement de l'albumen, trois types de graines peuvent être distingués : la graine albuminée, la graine exalbuminée et la graine à périsperme (**Figure 16**). Chez certaines espèces, l'albumen se développe considérablement aux dépens du nucelle (contenu de l'ovule après la fécondation) qui disparaît. Les graines albuminées (les céréales, le ricin) contiennent alors un albumen volumineux riche en réserves et un embryon de petite taille. Dans d'autres cas, l'albumen se développe toujours aux dépens du nucelle mais l'embryon finit par digérer l'albumen. A maturité, les graines exalbuminées (*Brassicaceae*, *Fabaceae*) contiennent un embryon à cotylédons volumineux, riches en réserves (**Figure 17**). Enfin, dans le cas des graines à périsperme, une partie du nucelle persiste dans la graine mature et forme le périsperme. Les réserves sont alors localisées à la fois dans le périsperme et l'albumen (betterave,...).

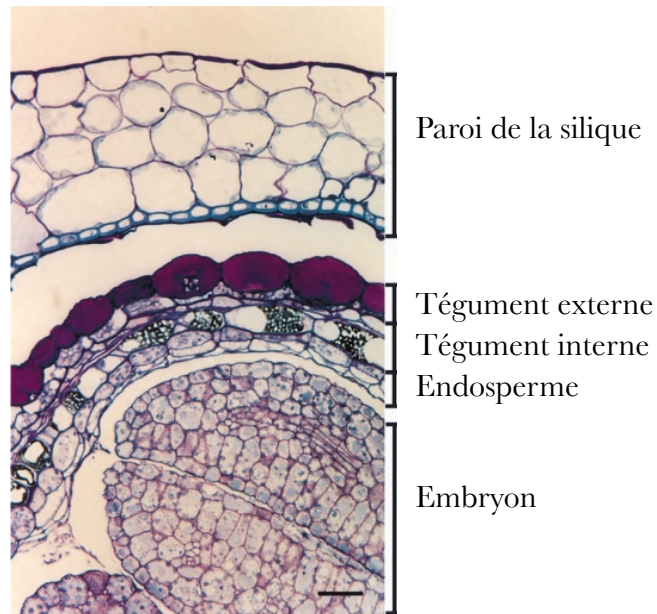


Figure 18. Coupe longitudinale d'une graine d'*A. thaliana* dans une silique et colorée au bleu de Toluidine. Echelle = 20 μm (d'après Windsor *et al.*, 2000).

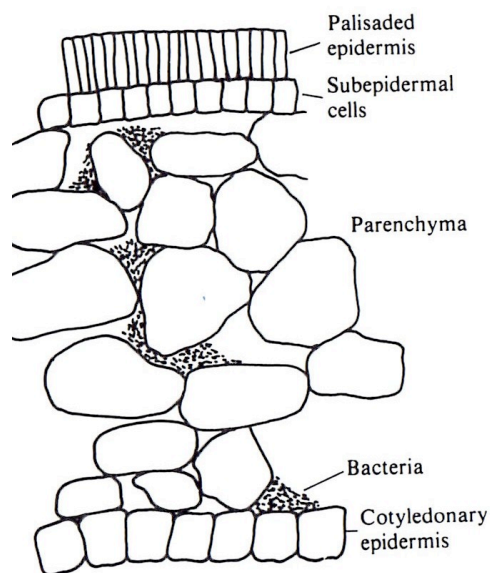


Figure 19. Diagramme d'une coupe longitudinale d'une enveloppe de graine de haricot illustrant la localisation caractéristique de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (d'après Maude, 1996)

2. Localisation des agents pathogènes sur les graines

Le tégument constitue l'enveloppe externe de la graine et protège les tissus internes. Il protège également des microorganismes, tels que les bactéries et les champignons transmissibles par les semences, des contraintes environnementales extérieures. Le tégument de la graine de certaines semences de céréales, des pois et de *Brassicaceae* présente un aspect lisse et intact à l'œil nu, mais l'observation de leur surface en microscopie électronique montre que la surface de ce tissu présente des microfissures qui peuvent constituer de nombreux habitats protecteurs pour ces agents pathogènes (Maude, 1996). Dans la graine d'*A. thaliana* mature, le tégument est composé de quatre couches cellulaires d'origine maternelle : les cellules produisant le mucilage, une couche de cellule avec une paroi fine, des cellules parenchymateuses et l'endothélium (**Figure 18**).

Les bactéries et les champignons nécrotrophes se retrouvent généralement dans les craquelures des téguments voire sous les téguments, au niveau des espaces intercellulaires et du parenchyme (**Figure 19**). Une pénétration plus profonde dans les tissus de réserve est plus rare pour cette classe de pathogènes. Elle résulte souvent d'une infection sévère. A l'inverse, les microorganismes biotrophes, tels que les virus et certains champignons comme par exemple *Ustilago* spp., peuvent être très souvent localisés dans l'embryon (Maude, 1996).

Des études antérieures à 1990 (Knox-Davies, 1979 ; Maude and Humpherson, 1980) et citées plus récemment, notamment par Köhl et ses collaborateurs en 2005, suggèrent qu'*A. brassicicola* est localisé à la surface de la graine ou dans les téguments. Ces études ont principalement été menées sur des graines issues de plantes hôtes cultivées. Les organes fongiques sont alors protégés des conditions environnementales défavorables et des traitements physiques des graines. Le hile est la cicatrice que porte une graine au point où elle était attachée à la plante. C'est souvent la zone la plus contaminée par le champignon, ce qui peut s'expliquer par le fait que la croissance mycélienne s'effectue à travers le replum de la silique et le funicule (Maude, 1996). Il peut être également présent dans l'endosperme, et plus en profondeur dans l'embryon lors d'attaques sévères (Maude et Humpherson-Jones, 1980). Des auteurs ont pu corrélérer le nombre de spores à la surface de la graine et le degré de contamination interne. Les inocula externes et internes peuvent survivre plusieurs années sur ou dans la graine (Maude et Humpherson-Jones, 1980).

Peu voire pas d'étude récente existe concernant la localisation des bactéries phytopathogènes, et particulièrement de *X. campestris* pv. *campestris*, sur les graines. Il est communément admis que les cellules bactériennes se situent de manière superficielle sur les graines voire de manière sous-tégumentaire (Maude, 1996). Cependant, des études menées sur

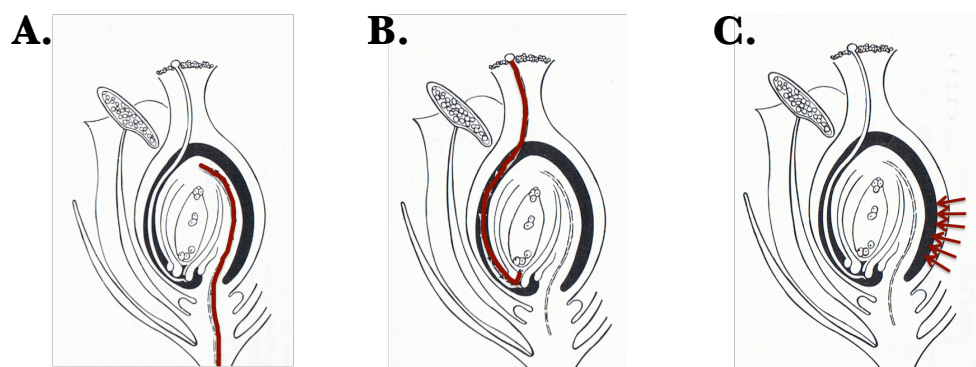


Figure 20. Les différentes voies de transmission des agents pathogènes à la semence (d'après Maude, 1996). **A.** Transmission *via* le xylème de la plante mère. **B.** Transmission *via* le stigmate et le style jusqu'à l'embryon. **C.** Transmission par pénétration des tissus externes de l'ovule.

la localisation de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* dans les graines de haricot ont permis de montrer que la bactérie peut se situer de manière intercellulaire dans les tissus du parenchyme des téguments. Elles peuvent parfois se situer autour des tissus cotylédonaire sans pour autant se situer dans l'embryon (Taylor *et al.*, 1979). Des études conduites sur arabette avec deux pathogènes humains (*Escherichia coli* O157 :H7 et *Salmonella enterica*) ont permis de montrer que ces microorganismes sont capables de se multiplier et de coloniser les tissus végétaux qu'ils soient racinaires ou aériens (Cooley *et al.*, 2003). Dans certaines conditions, *S. typhimurium* pourrait même proliférer dans des compartiments intracellulaires (Schikora *et al.*, 2008). La transmission de *E. coli* O157 :H7 et *S. enterica* par les graines de l'arabette semble très rare en système ouvert, montrant sans doute la faible compétitivité de ces pathogènes dans cet environnement (Cooley *et al.*, 2003). Suite à une contamination artificielle des graines et pailles de récolte, la décontamination par un traitement chloré ou des lavages ne permet pas une désinfection totale ce qui suggère que ces pathogènes sont situés dans des replis du tégument et/ou sous l'enveloppe de la graine (Cooley *et al.*, 2003).

II. Les mécanismes de transmission à et par les semences des organismes phytopathogènes

1. La transmission à la semence

Il existe trois voies de contamination des graines par des microorganismes tels que les virus, les champignons et les bactéries (**Figure 20**). La voie de contamination détermine la localisation future de l'agent pathogène et ainsi sa capacité de survie en association avec cet organe (Baker et Smith, 1966).

1.1. Colonisation du système vasculaire

La première voie est une contamination *via* les tissus conducteurs de la plante mère (**Figure 20A**). Plusieurs virus (AMV : virus de la mosaïque de la luzerne ; SMBV : virus de la mosaïque du haricot du Sud ; LMV : virus de la mosaïque de la laitue), quelques champignons (*Tilletia tritici*, *Verticillium* et *Fusarium* spp.), et très peu de bactéries (par exemple *X. campestris* pv. *campestris* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli*) sont transmis directement par cette voie de contamination aux graines de leurs plantes-hôtes. Des travaux menés sur la transmission de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* à la graine de haricot ont permis de mettre en évidence qu'un SST3 fonctionnel est indispensable à la colonisation du système vasculaire par la bactérie (Darsonval

et al., 2008). A l'inverse, les structures adhésives de types adhésines fibrillaires ou non fibrillaires ne sont pas indispensables mais interviennent en limitant ou facilitant cette contamination par voie vasculaire de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* aux semences. Un mutant, affecté au niveau de la production d'une hémagglutinine filamenteuse (YapH), se transmet plus fréquemment aux graines de haricot par voie vasculaire (Darsonval *et al.*, 2009). Ce mutant incapable de former des biofilms et d'adhérer est par ailleurs hypervirulent. Globalement, cela pourrait indiquer que chez la souche sauvage, la formation de biofilms limiterait la colonisation du système vasculaire en confinant la bactérie dans certains vaisseaux, comme cela a été montré chez *Xyllela fastidiosa* et la vigne (Guilhabert and Kirkpatrick 2005).

1.2. Colonisation des pièces florales

La deuxième possibilité est une contamination *via* le stigmate de la fleur (**Figure 20B**). Il s'agit d'une infection par l'intermédiaire du style de la plante. Ce type de contamination survient lorsque des pathogènes provenant d'inflorescences infectées sont transportés *via* des insectes ou des gouttelettes de pluie et contaminent d'autres fleurs et finalement des graines issues de plantes saines au stade végétatif. Des grains de pollen contaminés par un virus peuvent être également la cause d'une contamination des graines (Walkey, 1991). La source d'inoculum peut également provenir de la phyllosphère de la même plante ou de plantes voisines. Des champignons, tels que *Ustilago segetum* var. *tritici* et *Botrytis anthophila*, respectivement biotrophe et nécrotrophe, sont connus pour contaminer les graines *via* le stigmate. Les hyphes envahissent les tissus du stigmate et pénètrent dans le style entre les cellules. Elles peuvent ensuite contaminer les jeunes graines à travers le micropyle ou, s'il est fermé, à travers les téguments. Des bactéries phytopathogènes telles que *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, sont capables de contaminer par cette voie respectivement les graines de haricot et de pastèque de manière totalement asymptomatique (Darsonval *et al.*, 2008 ; Walcott *et al.*, 2003). Les bactéries pourraient alors bénéficier de la germination du tube pollinique dans le style comme voie de pénétration jusqu'à l'ovule fécondé. Cependant, il est souvent considéré que les bactéries ne peuvent pas pénétrer dans les tissus embryonnaires. Ce dogme mériterait d'être soutenu par des études histologiques complémentaires. Les bactéries peuvent également coloniser l'ovaire par l'intermédiaire du pistil et se situer par la suite sur et/ou dans les tissus de surface de l'ovaire qui constituera la graine. Ainsi, les bactéries se retrouveraient de manière plus ou moins interne dans la graine en fin de développement.

1.3. Colonisation des fruits

Le troisième mode de contamination des semences s'effectue par contact entre les téguments de la graine et des fruits qui présentent des symptômes (**Figure 20C**) (Maude, 1996) ou des pailles contaminées lors des étapes de récolte (battage) et stockage (Weller et Saettler, 1980). Des semences contaminées par *X. phaseoli* ont été identifiées en présence d'un fort inoculum qui est associé à la présence de symptômes sur les plantes (Weller et Saettler, 1980). De la même manière, cette voie de contamination des semences a été décrite dans le pathosystème *P. syringae* pv. *phaseolicola*/haricot où la bactérie était capable de provoquer des symptômes sur les graines en raison de la forte charge bactérienne (Taylor *et al.*, 1979). Cette bactérie est capable de pénétrer dans la gousse de haricot par la suture dorsale de la gousse pour atteindre le funicule, le hile et plus rarement le micropyle (Skoric, 1927). C'est également le cas de champignons nécrotrophes, tels qu'*A. brassicicola* ou *Ascochyta pisi*, qui attaquent les pièces florales et les siliques, et envahissent les graines par l'intermédiaire du funicule et du micropyle (Maude, 1996). Ce mode de colonisation résulte le plus souvent d'une pollution par contact entre des symptômes présents sur les fruits et les graines saines. Par conséquent, les microorganismes se trouvent le plus souvent à la surface de la graine et doivent mettre en place des mécanismes de résistance pour survivre à moyen ou long terme.

2. La survie en association avec les semences et colonisation de la plantule

Pendant des décennies, l'agriculture des Etats-Unis s'est fondée sur la production de graines apparemment saines car produites dans les états où le climat frais et sec devait limiter le développement des maladies bactériennes au sein des cultures (Maude, 1996). Des résurgences continues et inexplicables de maladies ont néanmoins laissé supposer que les graines produites dans ces secteurs pouvaient tout de même être infectées par des bactéries phytopathogènes. Un exemple emblématique est la pourriture noire des *Brassicaceae* provoquée par *X. campestris* pv. *campestris* (Schaad et Dianese, 1981). Les bactéries sont capables de persister à la fois dans l'environnement et de contaminer ultérieurement les nouvelles cultures de leur plante hôte en survivant entre autres sur les graines pendant plusieurs années (Schaad et Dianese, 1981; Schultz et Gabrielson, 1986). Les exsudats bactériens, à l'image du xanthane chez *X. campestris* pv. *campestris*, augmentent généralement la longévité de conservation.

Neergaard (1977) a divisé les champignons en cinq groupes selon des critères morphologiques pouvant influencer leur capacité à survivre sur les graines. Ce sont les champignons présentant un mycélium et des spores les plus pigmentés qui se conservent le plus longtemps (jusqu'à 15 ans dans le cas des Ustilaginales) sur les graines (Maude, 1996). La longévité de survie des agents pathogènes fongiques est très liée au groupe taxonomique, à la sévérité de la contamination, à la morphologie des propagules contaminant et à l'environnement externe (les conditions de stockage et la microflore de la graine) (Maude, 1996). Maude et Humpherson-Jones (1980) ont montré qu'une diminution de la viabilité de spores et de mycélium d'*A. brassicicola* sur des graines de chou, provoquée par une désinfection de surface des graines, diminue la transmission de la maladie.

La germination des graines contaminées par des agents pathogènes est la cause directe du début d'un nouveau cycle de maladie d'autant plus qu'une graine qui germe relargue une quantité importante de substances (Powell et Matthews, 1978; Powell et Matthews, 1981) favorisant la multiplication des agents pathogènes. La spermosphère apparaît donc comme un habitat riche en source d'énergie mais également extrêmement compétitif. Les *Pseudomonas syringae* sont capables de se développer rapidement sur la plantule et de coloniser ensuite les feuilles en formation (Hirano *et al.*, 1997). Des charges bactériennes très importantes peuvent entraîner l'avortement des plantules. Cependant une charge minimale est également nécessaire à la colonisation des plantules. Il a été montré qu'au moins 1×10^2 ufc de *X. fuscans* subsp. *fuscans* par semence sont nécessaires pour que cette bactérie colonise les plantules de haricot (Darrasse *et al.*, 2007). Les bactéries colonisent l'hypocotyle de manière superficielle et pénètrent éventuellement dans le système vasculaire ou les parenchymes à partir des cotylédons (Maude, 1996).

La transmission de la maladie par des graines contaminées avec des champignons nécrotrophes s'effectue souvent par contact entre des parties de la graine contaminées et les cotylédons lors de la germination. C'est par exemple le cas des graines épigées de chou contaminées avec *A. brassicicola* (Maude, 1996). L'enveloppe de la graine peut également rester attachée aux cotylédons ou être déposée sur le sol. Dans ce dernier cas, les spores et le mycélium peuvent contaminer les tissus de l'hypocotyle et être la cause d'un nouveau cycle infectieux.

Partie 3. Les déterminants moléculaires impliqués dans la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* et *A. brassicicola* à et par la semence d'*A. thaliana*

De nombreuses hypothèses quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des pathogènes à et par les semences peuvent être émises. Dans un souci de concision, seuls certains d'entre eux seront présentés dans cette synthèse bibliographique. Ces mécanismes peuvent intervenir à la fois lors de la transmission à la semence et dans la survie des agents pathogènes sur les graines et permettent, principalement, aux microorganismes de coloniser les tissus de la plante hôte et de résister aux différents stress abiotiques qu'ils rencontrent lors de leurs cycles de vie.

I. La perception et la régulation de la transduction du signal de stress

La capacité d'adaptation d'un microorganisme aux stimuli environnementaux dépend de sa faculté à les percevoir et à mettre en place une réponse adéquate et rapide. Des protéines impliquées dans la transduction du signal interviennent entre autres dans la mise en place d'un programme génétique finement régulé.

La majorité des organismes, procaryotes et eucaryotes, possèdent des systèmes de transduction du signal à deux composants (STSDC) qui leur permettent de réguler le fonctionnement de nombreux processus essentiels (Perry *et al.*, 2011). Les systèmes de transduction du signal à deux composants sont constitués d'un domaine senseur membranaire et d'un domaine régulateur cytoplasmique. Le domaine senseur est composé d'un site de reconnaissance du signal (appelé «input domain») couplé à un domaine autokinase. La perception d'un signal active le domaine autokinase, impliquant une hydrolyse de l'ATP et la phosphorylation d'une histidine située sur le sous-domaine phosphotransférase de l'autokinase. Ce sous-domaine phosphotransférase transfère ensuite son groupement phosphorylé au domaine régulateur qui est ainsi phosphorylé sur un résidu d'acide aspartique. En conditions normales, le domaine régulateur inhibe la partie libérable (appelée «output domain») du régulateur de réponse. La phosphorylation du domaine aspartique lève cette inhibition, libérant ainsi l'«output domain». Sa principale fonction est d'activer et de moduler la

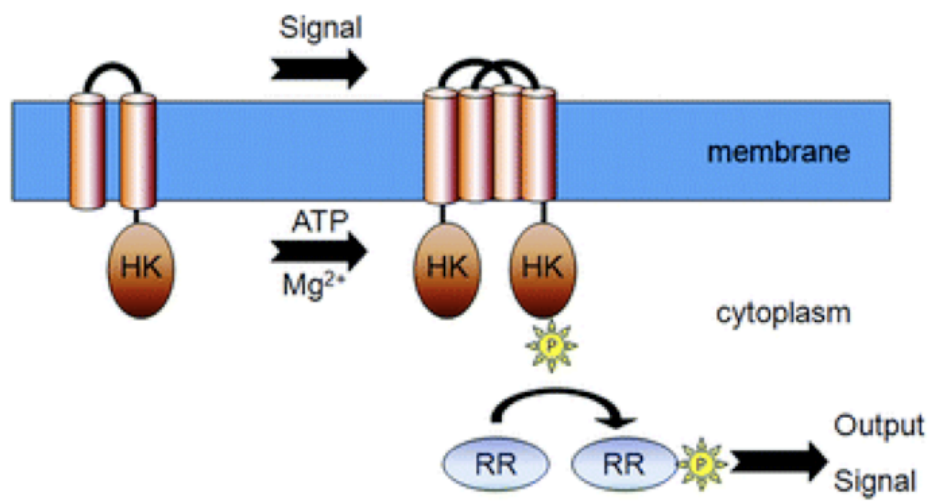


Figure 21. Structure des domaines d'un système de transduction du signal à deux composantes (d'après Perry *et al.*, 2011).

transcription de gènes impliqués dans la mise en place d'une réponse adaptative (Hoch *et al.*, 2000) (**Figure 21**).

1. Les systèmes de transduction du signal à deux composants chez *X. campestris* pv. *campestris*

L'analyse du génome de la souche de *Xcc* ATCC33913 a permis de prédire que 106 gènes codent pour des protéines STSDC (Qian *et al.*, 2008b). Ces gènes sont situés uniquement sur la partie chromosomique du génome. La transduction du signal par le système de régulation à deux composants se base sur une cascade de réactions de phosphorylation comme c'est d'ailleurs le cas de la voie de signalisation chimiotactique (Galperin, 2005). Plusieurs fonctions importantes comme la mobilité et celles liées au pouvoir pathogène des bactéries, sont régulées par des systèmes de régulation à deux composants. Chez les *Xanthomonas* spp., les principaux systèmes régulateurs étudiés sont RpfC/RpfG, RavS/RavR et ColS/ColR mais aussi le couple régulateur HrpG/HrpX (Qian *et al.*, 2008b; Whitworth et Cock, 2009). Les gènes codant les différents composants du système de régulation (senseurs et régulateurs) sont généralement organisés en opéron (Lavín *et al.*, 2007). Ceci reflète la nécessité qu'ont les bactéries de s'adapter rapidement à divers environnements rencontrés lors de leur multiplication dans la phyllosphère, la colonisation de la plante hôte et éventuellement lors du processus infectieux.

Une étude menée par Qian et ses collaborateurs (2008a) a consisté à inactiver certains gènes codant des régulateurs de réponse (RR) dans le génome de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 et ont ainsi généré 51 mutants viables. Ils ont caractérisé le phénotype de chacun des mutants face à des stress osmotiques, salins et thermiques. D'après leur analyse, certains mutants apparaissent, soit plus sensibles, soit plus résistants face à ces stress abiotiques suggérant un rôle prépondérant de ce type de mécanisme moléculaire dans la transduction du signal de stress.

2. Les cascades de transduction du signal chez les champignons et *A. brassicicola*

Les champignons ont la capacité de percevoir et de s'adapter à leur environnement proche, de la même manière que les bactéries, par l'intermédiaire de système de transduction du signal à deux composants (constituées de protéines kinases) et de cascades de régulation

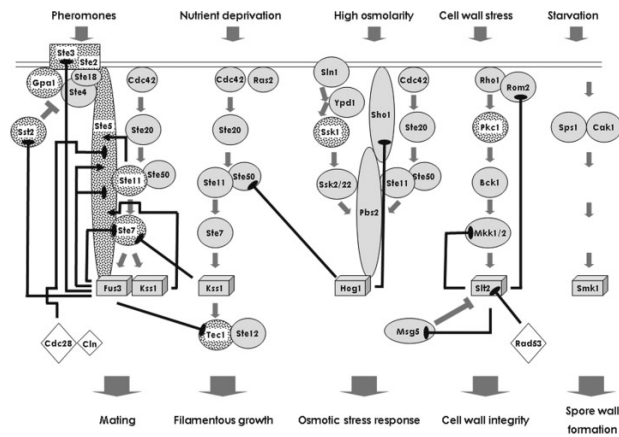


Figure 22. Représentation schématique des cinq voies de signalisation régulées par des MAPK décrites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Molina *et al.*, 2010).

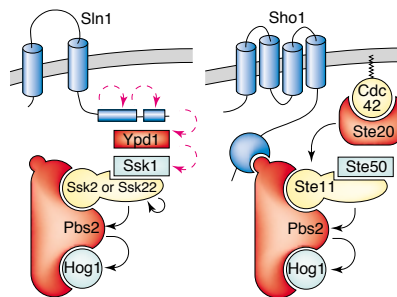


Figure 23. Représentation des deux branches en aval de la voie de signalisation Hog qui peuvent chacune activer Pbs2 et Hog1. Les flèches noires indiquent des événements de phosphorylation en présence de fortes osmolarités. Les flèches en tiret rose indiquent des phosphotransferts lors d'une osmolarité constante (d'après O'Rourke *et al.*, 2002).

orchestrées, entre autre, par des protéines de type MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Les voies de signalisation médiées par des cascades de MAP kinases sont constituées par une série de trois protéines kinases (une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), une MAP kinase kinase (MAPKK) et une MAP kinase (MAPK)) qui sont successivement activées par phosphorylation (Cobb et Goldsmith, 1995; Cooper, 1994). La phosphorylation se fait sur les résidus aminés tyrosine et thréonine situés dans le domaine très conservé des MAP kinases (May *et al.*, 2005). Après activation de la MAP kinase, le signal est ensuite transféré à des effecteurs, généralement des facteurs de transcription, qui vont réguler les gènes cibles correspondants. Ces voies peuvent ainsi agir sur une large gamme de processus cellulaires. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cinq voies de transduction de signal MAPK ont été identifiées et agissent en particulier au niveau de la régulation sexuelle, la croissance des hyphes, la réponse au stress osmotique, le maintien de l'intégrité cellulaire et la formation des ascospores (Molina *et al.*, 2010) (**Figure 22**). Des voies homologues ont été identifiées chez des champignons filamenteux, même si des différences dans la constitution des voies ont été rapportées.

Une des cascades de régulation, faisant intervenir la MAP kinase Hog1, intervient en réponse à un stress osmotique (Hohmann *et al.*, 2007). Son activation permet la synthèse et la mobilisation du glycérol pour maintenir la cellule dans des conditions physiologiques favorables (Attfield, 1997), mais également l'activation par phosphorylation des transporteurs membranaires d'ions qui participent ainsi à l'homéostasie cellulaire (Proft et Struhl, 2004). Chez *S. cerevisiae*, il y a deux osmo-senseurs membranaires Sln1 et Sho1 (O'Rourke *et al.*, 2002) capables d'activer deux branches qui convergent ensuite vers la MAP kinase kinase Pbs2. La protéine Sln1 est transmembranaire et présente la même structure que les systèmes de transduction du signal à deux composants bactériens. Elle est considérée comme un composant majeur de cette voie. Son degré de phosphorylation varie en réponse à un changement de pression osmotique. Les faibles pressions osmotiques provoquent l'autophosphorylation de la protéine et régule négativement la voie Hog alors que de fortes pressions osmotiques inactivent la protéine (**Figure 23**) (Saito et Tatebayashi, 2004). La protéine Sln1 est la seule histidine kinase (HK) de *S. cerevisiae* et appartient au groupe VI des HKs et l'inactivation de cette protéine est létale pour la levure. Les champignons filamenteux possèdent de multiples HKs qui peuvent être classées dans 11 groupes selon leurs domaines conservés chez les Ascomycètes (Catlett *et al.*, 2003). Le champignon *A. brassicicola* possède un ou plusieurs représentant(s) dans chacune des classes à l'exception de la classe VII (J. Dumur, communication personnelle). Certaines protéines sont très conservées au sein des Ascomycètes

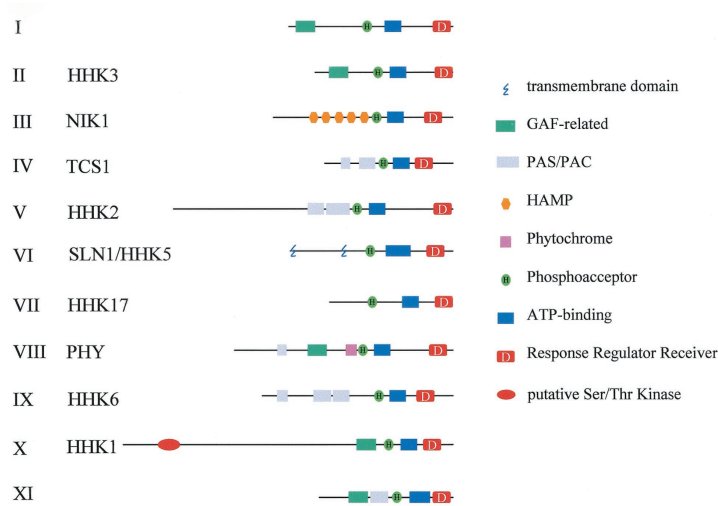


Figure 24. Représentation schématique des domaines structuraux contenus dans chacune des 11 familles des histidine kinase chez les Ascomycètes (d'après Catlett *et al.*, 2003).

alors que d'autres présentent de faibles homologies entre les genres. Cette hétérogénéité suggère que certaines HKs soient impliquées dans des fonctions basiques partagées par la plupart des Ascomycètes telles que l'osmorégulation, alors que d'autres pourraient être impliquées dans l'adaptation à des conditions spécifiques au cycle de vie des pathogènes (Catlett *et al.*, 2003).

Les HKs du groupe III sont ubiquitaires chez les champignons et constituent l'une des classes les plus étudiées. Le principal représentant de cette famille est la protéine Nik1 qui est hautement conservée parmi les Ascomycètes (Catlett *et al.*, 2003). Ces protéines ont un domaine unique en N-terminal qui est constitué de répétitions de domaines HAMP. Les domaines HAMP sont retrouvés dans des protéines liées à la signalisation telles que les histidine kinases, les adénylyl cyclases, les Methyl-accepting Chemotaxis Proteins et les phosphatases (Aravind et Ponting, 1999). La fonction de ces domaines reste méconnue mais leur mutation chez la protéine Nik1 est responsable d'une hypersensibilité au stress osmotique et d'une résistance aux fongicides de type dicarboximides (Catlett *et al.*, 2003). Les HKs du groupe III ne possèdent pas de domaine transmembranaire et ont vraisemblablement une localisation cytoplasmique. Elles sont connues pour être impliquées en tant qu'osmosenseurs de la voie de régulation de l'osmolarité cellulaire (impliquant la MAP kinase Hog1). Jusqu'à maintenant, leur fonction en tant qu'osmosenseur de la cascade de régulation Hog et leur lien fonctionnel par rapport aux orthologues de Sln1 chez les champignons filamenteux reste encore malcomprise. Cependant, des études récentes menées par expression hétérologue chez *S. cerevisiae* suggèrent qu'une HK de type III de la levure *Debaryomyces hansenii* peut compléter le phénotype induit par une mutation Sln1 de *S. cerevisiae* (Meena *et al.*, 2010) et fonctionner comme osmosenseur.

Les protéines du groupe III des HK sont connues pour être des régulateurs positifs de la cascade de signalisation Hog (**Figure 24**) (Yoshimi *et al.*, 2005). Le suivi de l'état de phosphorylation de la protéine BmHog1p de *Cochliobolus heterostrophus* dans une souche sauvage et un mutant *dic1* (déficient dans la production de la protéine ChNik1p) révèle que la protéine Hog est phosphorylée uniquement dans le fond sauvage suite à une exposition aux fongicides (Yoshimi *et al.*, 2005). Les mêmes profils de phosphorylation ont été observés chez *A. brassicicola* en réponse à des composés antifongiques (Dongo *et al.*, 2009).

Les histidine kinases de groupe III sont également impliquées dans la formation de conidies, la virulence chez certaines espèces de champignons filamenteux (Viaud *et al.*, 2006). Les histidine kinases de groupe III sont la cible de plusieurs matières actives antifongiques utilisées en agriculture et en traitement pharmaceutique. En protection des cultures,

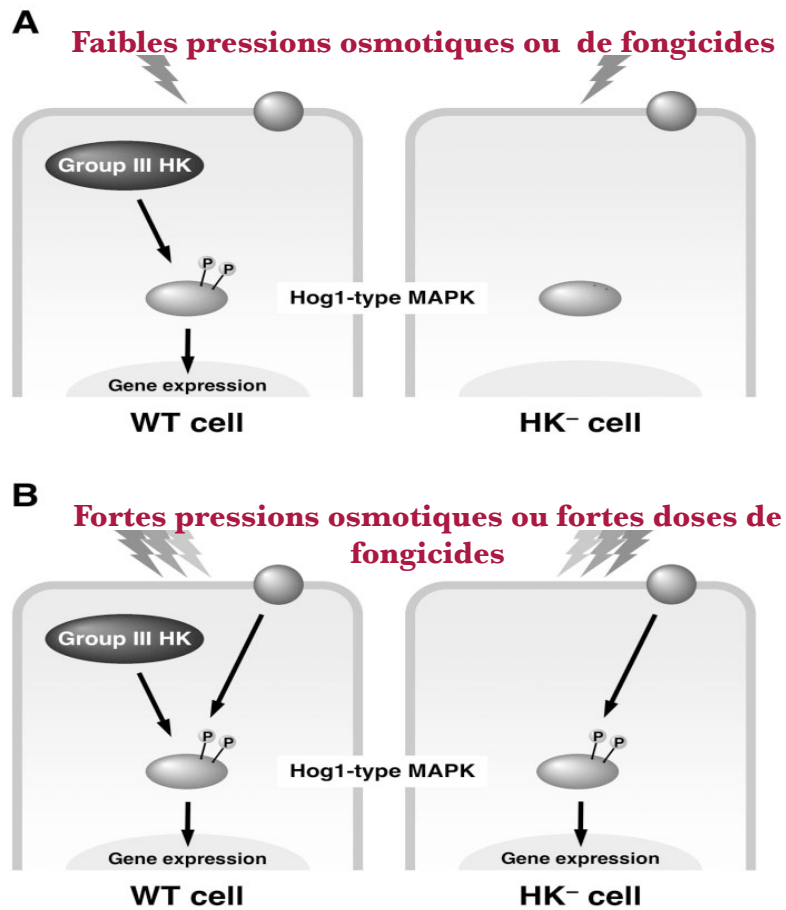


Figure 25. Modèle de phosphorylation de la MAPK Hog1. **A.** Profils de phosphorylation de Hog chez une souche sauvage et chez un mutant d'une HK du groupe III en présence de faibles pressions osmotiques ou de faibles doses de fongicides. **B.** Profils de phosphorylation de Hog chez une souche sauvage et chez un mutant d'une HK du groupe III en présence de fortes pressions osmotiques ou de fortes doses de fongicides (d'après Yoshimi *et al.*, 2005).

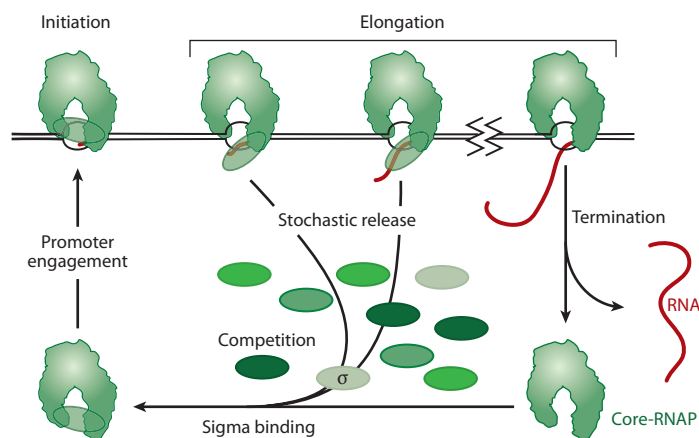


Figure 26. Représentation schématique du cycle de transcription dans lequel les facteurs sigma entrent en compétition pour s'associer avec le cœur de l'ARN polymérase et diriger l'holoenzyme vers les promoteurs ciblés (d'après Österberg *et al.*, 2011).

l'apparition de mutants spontanés de terrain, mutés au niveau des gènes codant ces protéines et résistants au fludioxonil et à l'iprodione (fongicides appartenant respectivement aux classes des phénylpyrroles et des dicarboximides), est régulièrement observée. Ainsi, chez *A. brassicicola*, l'implication de l'histidine kinase de groupe III AbNIK1, dans la sensibilité aux fongicides de type dicarboximides et phénylpyrroles a également été démontrée. En effet, des souches de terrain, possédant une mutation au niveau de ce gène, présentent une résistance accrue à ces molécules antifongiques (Avenot *et al.*, 2005) et la délétion du gène *AbNIK1* par mutagenèse ciblée se traduit par l'acquisition d'une insensibilité des souches mutantes au fludioxonil et à l'ambruticine (polykétide bactérien en cours de développement pour le traitement des mycoses humaines) (Dongo *et al.*, 2009). De plus, lors d'expérimentations de transmission aux semences menées au champ, il a été constaté que des mutants nuls ne produisant plus cette protéine se transmettent moins efficacement aux graines de radis par rapport à la souche sauvage (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2008). Une hypersensibilité accrue du mutant *nik3Δ1* aux stress oxydatif et osmotique a également été observée *in vitro* (**Figure 25**).

3. La transduction du signal de stress *via* les facteurs σ

La mise en place d'une réponse biologique finement régulée passe tout d'abord par la perception du signal, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, mais également par l'activation de la transcription de gènes intervenant dans la réponse adaptative. Une des étapes prédominantes de cette régulation est l'initiation de la transcription pour laquelle l'ARN polymérase, machinerie catalytique constituée de cinq sous unités protéiques, est l'enzyme clé. Elle est responsable de la synthèse d'ARN à partir d'ADN. Les quatre sous unités (deux sous unités α , une sous-unité β et une sous-unité β') forment l'enzyme cœur à laquelle un facteur sigma (σ) peut s'associer de façon réversible pour former l'holoenzyme (Browning and Busby, 2004) (**Figure 26**). La reconnaissance des séquences promotrices se fait directement par la sous unité σ . Il y a alors formation d'un complexe fermé, puis d'un complexe ouvert permettant à l'ARN polymérase de commencer la synthèse de petits ARN de 2 à 12 bases. Une fois la sous unité σ libérée, l'ARN polymérase va se mouvoir le long de l'ADN et synthétiser l'ARN.

Il existe deux groupes phylogénétiques distincts de facteurs σ : les facteurs σ^{70} et les facteurs σ^{54} . Les facteurs σ^{54} (codé par *rpoN* chez *Escherichia coli*) sont généralement impliqués dans la régulation du métabolisme azoté, la virulence et la réponse à de multiples stress

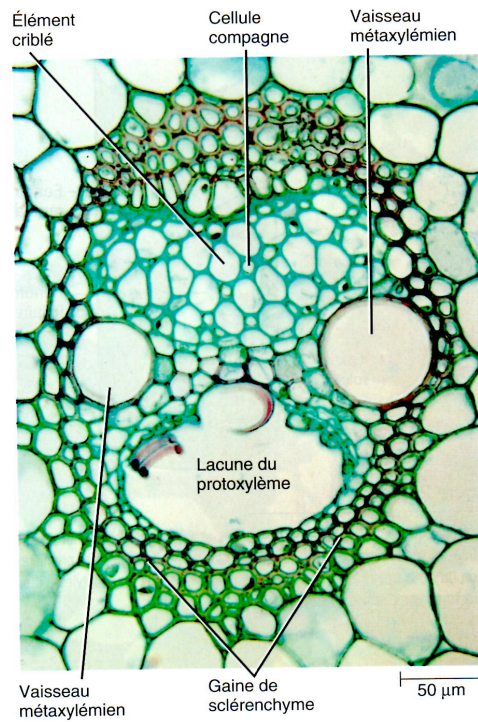


Figure 27. Coupe transversale d'une tige de de maïs où est visible un faisceau conducteur différencié entouré d'une gaine de cellules sclérenchymateuses à parois épaissies. La partie du faisceau occupée auparavant par les éléments du protoxylème est maintenant occupée par un vaste espace intercellulaire, la lacune protoxylémienne (d'après Raven *et al.*, 2000).

(Ouyang *et al.*, 2011). Récemment, une implication de ces protéines dans la régulation de la transcription du cluster de gènes du système de sécrétion de type VI a été démontrée (Bernard *et al.*, 2011). La famille des facteurs σ^{70} chez les Eubactéries est divisée en plusieurs sous-groupes fonctionnels et structuraux. Il y a tout d'abord les facteurs σ primaires qui sont des protéines essentielles à la survie de la cellule en phase exponentielle de croissance, responsables de l'expression des gènes de « ménage » de la bactérie. Ensuite, il existe les facteurs σ non essentiels pour la phase exponentielle de croissance. Le facteur σ^S , un régulateur général de stress d'*E. coli*, est un des membres les plus étudiés de ce groupe. Enfin, les facteurs dits alternatifs, plus éloignés au niveau de leur séquence des autres facteurs σ^{70} , sont subdivisés en plusieurs catégories dont les facteurs ECF (ExtraCellular Function) régulant des processus relatifs à l'enveloppe bactérienne. Suite au séquençage du génome de *X. campestris pv. campestris* ATCC33913, 15 gènes codant des facteurs σ ont été identifiés : deux gènes codant des facteurs σ^{54} , *Xcc1935* et *Xcc2802*, et 13 gènes appartenant au groupe des facteurs σ^{70} ont été recensés.

II. La versatilité nutritionnelle de *X. campestris pv. campestris*

Xcc est une bactérie phytopathogène principalement vasculaire (Hugouvieux *et al.*, 1998). La contamination des semences par la voie vasculaire implique que la bactérie va être confrontée à une succession de microenvironnements (les parenchymes, la lumière des vaisseaux du xylème, l'apoplaste des différents organes rencontrés) auxquels elle va devoir s'adapter impérativement pour pouvoir réussir cette étape de son cycle de vie. Ainsi, l'activation de gènes permettant de mettre en place des systèmes consacrés à l'optimisation de l'exploitation des nutriments présents dans ces niches est donc indispensable.

1. Le système vasculaire végétal

Avec le phloème, le xylème forme un système continu de tissu conducteur réparti dans toute la plante. Les principaux éléments xylémiens sont les trachéides constituant le protoxylème et les éléments de vaisseaux qui forment le métaxylème (**Figure 27**). Ces deux types cellulaires possèdent une paroi secondaire et sont dépourvus de protoplastes à maturité : ils perdent leur noyau et leur contenu cellulaire lors du processus de différenciation des tissus

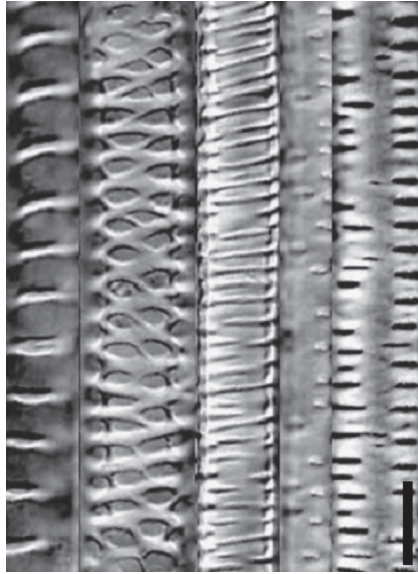


Figure 28. Illustrations d'ornementations des parois secondaires existantes dans les vaisseaux du xylème d'*A. thaliana*. La barre d'échelles correspond à 10 μ m. (d'après Oda et Fukuda, 2012).

de la tige. Leur paroi peut comporter des ponctuations. Contrairement aux trachéides, les éléments de vaisseaux possèdent des perforations : ce sont de véritables trous dans la paroi dépourvus de parois primaires et secondaires. Elles permettent le transport de l'eau de vaisseau à vaisseau et jouent un rôle primordial dans la conductivité hydraulique. Elles assurent le lien entre l'absorption de l'eau par le système racinaire jusqu'à la transpiration par le système foliaire (Jansen *et al.*, 2007). Cet ensemble de vaisseaux, trachéides et fibres, communiquant entre eux, véhicule la sève brute depuis les racines jusqu'à l'ensemble de la plante (Raven *et al.*, 2000) (**Figure 28**).

La sève brute est constituée principalement d'eau et d'éléments nutritifs mais également de composés inorganiques de faible poids moléculaire et de composés organiques tels que des phytohormones, des acides aminés, des sucres, des oligo et polysaccharides et des protéines (Sato, 2006). Cette composition peut fluctuer selon les conditions climatiques ou les stress abiotiques appliqués aux plantes. La teneur en acides aminés de la sève brute dans le tournesol augmente d'autant plus que la teneur en eau du sol diminue, alors que les concentrations en ions nitrate et phosphate diminuent (Gollan *et al.*, 1992).

Ces tissus vasculaires contenant de la sève, dont la composition peut fluctuer au cours du temps, constituent différentes niches nutritionnelles dans lesquelles *X. campestris* pv. *campestris* évolue lors de la colonisation de la hampe florale. En effet, le système vasculaire conduisant la sève ascendante est composé de différents types cellulaires. La bactérie peut alors se retrouver soit dans l'apoplaste, le protoxylème, le métaxylème et les parenchymes associés.

2. Capacité d'adaptation de *Xcc* à l'environnement nutritionnel: les Carbohydrate Utilization containing TBDT loci

Les différents nutriments et autres molécules nécessaires à la croissance de *X. campestris* pv. *campestris* doivent pouvoir pénétrer dans la cellule en traversant les membranes plasmiques et externes de la cellule des bactéries à Gram négatif. La membrane externe possède différents types de porines permettant le transport passif de petites molécules (de taille inférieure ou égale à 600 Da). Pour les molécules les plus grosses et/ou la diffusion de molécules contre un gradient de concentration, un transport actif est mis en place avec des composants des membranes externe et interne mais aussi de l'espace périplasmique. Les transporteurs TonB-dépendants (TBDTs) (précédemment appelés TBDRs pour « Récepteurs TonB-dépendants ») ancrés au niveau de la membrane externe se chargent de ce type de transport (Schauer *et al.*, 2008). Ces transporteurs fixent les substrats avec une haute affinité (de l'ordre du nanomolaire

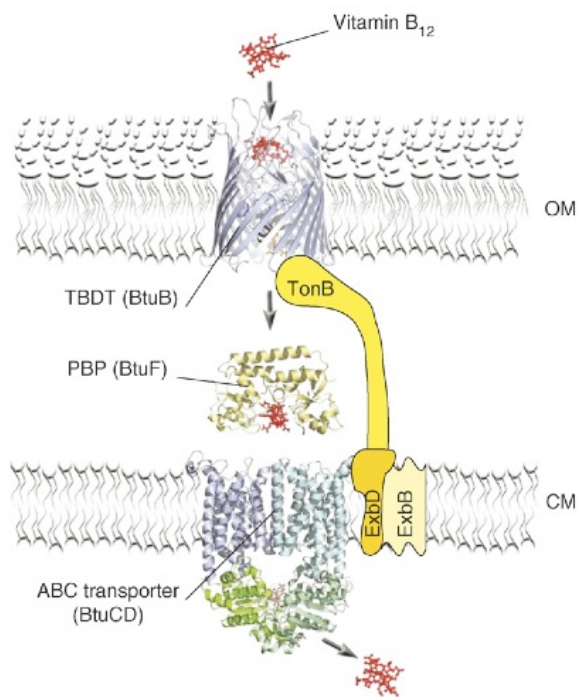


Figure 29. Représentation du fonctionnement d'un TBDT spécifique de la vitamine B12 (d'après Schauer *et al.*, 2008). Dans les bactéries à Gram négatif, la machinerie TonB dépendante assure le transport de substrats à travers la membrane externe (OM). La vitamine B12 (rouge) se fixe spécifiquement au TBDT BtuB (bleu). Le complexe TonB-ExbB-ExbD (jaune) transduit la gradient de protons de la membrane externe pour induire un changement de conformation du TBDT. La vitamine B12 est alors relâchée dans l'espace périplasmique. Le transport de la molécule à travers la membrane interne (CM) est ensuite assurée par un transport ATP-dépendant.

et du subnanomolaire), ce qui provoque un changement de conformation du TBDT puis une augmentation de l'affinité du transporteur avec la protéine TonB, située dans la membrane interne. Cette interaction est permise grâce à la présence d'une « boîte *Ton* » située en partie N-terminale du TBDT (Wiener *et al.*, 2005). L'action de TonB est accompagnée de celle de deux autres protéines, ExbB et ExbD, également localisées dans la membrane interne. Le complexe TonB, ExbB et ExbD exploite la force « proton-motrice » de la membrane interne pour apporter l'énergie nécessaire au TBDT. Cela permet le transport du substrat à travers le transporteur et la membrane. A son « arrivée » dans l'espace périplasmique, le substrat est pris en charge par une protéine soluble du périplasma (PBP, Protein Binding Periplasmic), puis, transite à travers une perméase de la membrane interne (souvent un transporteur de type ABC) (Schauer *et al.*, 2008) (**Figure 29**).

Une analyse du génome de *X. campestris* pv. *campestris* a permis de prédire l'existence de 72 gènes codant potentiellement des TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007). L'étude approfondie du génome de *X. campestris* pv. *campestris* a montré que parmi les gènes codant des TBDTs, certains d'entre eux sont présents au sein de clusters potentiellement impliqués dans le transport et la dégradation de molécules végétales. Une étude détaillée de l'acquisition du saccharose chez *X. campestris* pv. *campestris* a montré la fonctionnalité d'un tel locus, définissant ainsi un nouveau concept, celui de « CUT locus » (Blanvillain *et al.*, 2007). Un exemple est illustré par ces auteurs avec le cas du TBDR *Xcc3358*, un transporteur de saccharose, pour lequel un mutant voit son pouvoir pathogène diminué. Celui-ci est situé dans un locus d'utilisation des carbohydrates impliqué dans l'entrée et l'utilisation du saccharose dans les cellules de *Xcc*. Ce locus contient 4 gènes, *suxA* (*Xcc3358*), *suxB* (*Xcc3359*), *suxC* (*Xcc3357*) et *suxR* (*Xcc3356*) codant, respectivement, un TBDR, une amylosucrase, un transporteur de sucre situé dans la membrane interne et une protéine régulatrice. Cette même équipe a également caractérisé une nouvelle voie d'utilisation du *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) chez *X. campestris* pv. *campestris* (Boulangier *et al.*, 2010) faisant intervenir un transporteur de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily), pour le passage à travers la membrane interne, et deux glucokinases pour la phosphorylation du GlcNAc. De plus, les enzymes NagA et NagB-II, impliquées dans le catabolisme du GlcNAc, ont identifiées ainsi que les gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du GlcNAc. Ces gènes sont sous le contrôle de deux régulateurs, NagQ et NagR. Ce travail suggère donc l'existence d'un CUT système impliqué dans l'utilisation de molécules complexes contenant du GlcNAc.

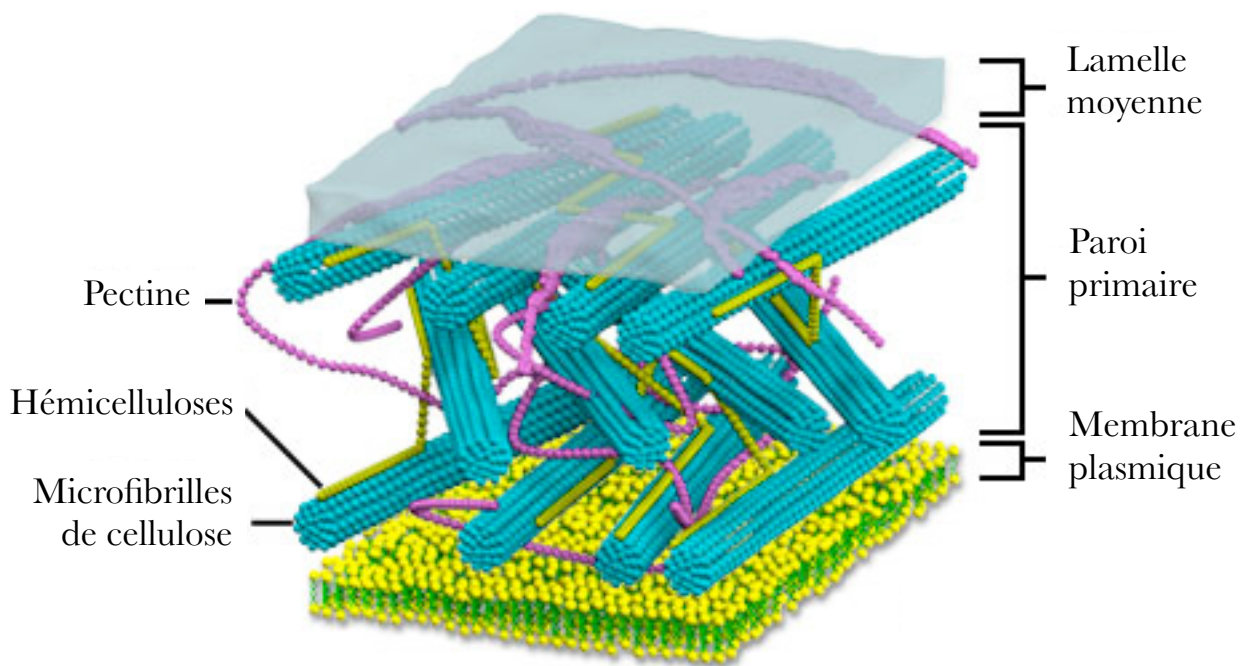


Figure 30. Modèle simplifié de la paroi primaire végétale. Elle consiste en un réseau complexe de fibres de cellulose, de pectine et d'hémicellulose. La zone de contact entre deux cellules est appelée lamelle moyenne. (<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>)

3. Utilisation de la paroi végétale lors de la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* cc à la graine : système d'utilisation du xylane.

Longtemps considérée simplement comme une structure externe et inactive, les fonctions de la paroi cellulaire végétale sont aujourd'hui bien connues. Elle constitue entre autres une barrière physique qui peut jouer un rôle actif de défense contre les pathogènes bactériens et fongiques. La plante pourra alors répondre en synthétisant des molécules de défense. Par exemple, lors d'une attaque d'un pathogène, la plante peut présenter des dépôts de callose au niveau des sites de pénétration du pathogène, accumuler des composés phénoliques et plusieurs toxines dans la paroi et synthétiser des polymères «lignin-like» pour la renforcer (Huckelhoven, 2007). Cependant, la paroi constitue une source non négligeable de nutriments pour ces pathogènes. Ces derniers sont capables de synthétiser des enzymes de dégradation de la paroi dans le but de détériorer cette barrière physique et de bénéficier du pouvoir nutritionnel des produits de dégradation des constituants pariétaux.

Les parois cellulaires végétales ont une constitution et une épaisseur très variables selon le type et l'âge des cellules. De l'extérieur vers l'intérieur, il y a trois niveaux principaux : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (**Figure 30**). En effet, le protoplaste produit sa paroi à partir de l'intérieur. Les premières assises cellulaires produites représentent la paroi primaire. Très souvent, les cellules déposent ensuite des assises pariétales supplémentaires qui constituent la paroi secondaire. Cette dernière ne sera présente que dans certains types cellulaires : les cellules conductrices de sève (vaisseaux du xylème) et différents tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège). La paroi primaire végétale, tout comme la paroi secondaire, est constituée d'un réseau de cellulose enrobé dans une matrice interconnectée. Celle-ci est composée d'hémicellulose, de pectines et de protéines de structure telles que les glycoprotéines (Mc Neil *et al.*, 1984). La paroi secondaire contient en plus des composés phénoliques tels que la lignine, qui rigidifie la paroi, la cutine et la subérine qui l'imperméabilisent.

Les macromolécules de cellulose s'associent entre elles pour former des microfibrilles, elles-mêmes associées à des hémicelluloses et des pectines (Cosgrove, 2005). Les pectines sont des polysaccharides qui forment un gel aqueux dans la paroi et sont les principaux constituants de la lamelle moyenne. Elles représentent des composants importants responsables de la porosité pariétale et de l'épaisseur de la paroi. De plus, elles permettent, entre autres, de lier les cellules entre elles grâce à la lamelle moyenne. Ce sont les premiers éléments de la paroi visés par des attaques de microorganismes pathogènes (Cosgrove, 2005 ;

Harholt *et al.*, 2010). Les hémicelluloses constituent un groupe diversifié de polysaccharides qui interagissent généralement avec les microfibrilles de cellulose. Elles contribuent à la rigidité de la paroi en lien avec la cellulose et, parfois, la lignine (Cosgrove, 2005). Les principales hémicelluloses sont le xyloglucane, le xylane, le mannane, le glucomannane et le β -(1,3 et 1,4)glucane (Scheller et Ulvskov, 2010). Des différences de composition au niveau des teneurs en xylanes et xyloglucanes existent entre les parois des Monocotylédones et les Dicotylédones. Classiquement, la teneur en xyloglucanes est très faible dans la paroi primaire des Monocotylédones (1 à 5%) comparée aux Dicotylédones (20%). Les xylanes sont présents en très faible proportion dans la paroi primaire des dicotylédones et le glucuronoxylane est majoritaire (20 à 30%) dans les parois secondaires. Ces données structurales peuvent fournir des clés importantes de compréhension de l'écologie microbienne au sein des pathogènes de plante en étudiant leurs enzymes de dégradation de la paroi végétale.

De nombreux microorganismes sont capables de dégrader ce substrat hémicellulosique en monomères de xylose grâce à des enzymes de dégradation spécifiques telles que les endoglucanases, les exoglucanases, les xylanases (pour revue, Lynd *et al.*, 2002). De telles enzymes ont déjà été décrites comme intervenant dans le contrôle de la virulence de bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* (Rajeshwari *et al.*, 2005), en particulier dans la dégradation du xylane. Le xylane est un composant structural majeur des parois végétales et le second polysaccharide végétal le plus abondant dans la nature après la cellulose (Dodd and Cann, 2009). L'utilisation du xylane par les microorganismes nécessite l'action coordonnée de plusieurs enzymes afin de dépolymériser ce polysaccharide. De plus, l'utilisation optimale des produits de dégradation enzymatique nécessite un transport de ces éléments nutritifs dans la cellule bactérienne. Dans une étude menée par Blanvillain *et al.* (2007), l'induction de l'expression de deux gènes, *Xcc2828* et *Xcc4120*, a été démontrée en présence de xylane et de xylose. Cela pourrait laisser supposer qu'ils soient impliqués dans l'utilisation du xylane. Les gènes *Xcc2828* (*xytA*) et *Xcc4120* (*xytB*) codent des transporteurs TonB-dépendants, respectivement situés dans les locus *xytA* et *xytB*. Une étude de mesure de dynamique de populations de ces mutants *in planta*, en situation compatible, a permis de démontrer que ces loci étaient nécessaires à la croissance épiphyte de *X. campestris* pv. *campestris* sur des feuilles (Dejean, 2011). Il semble donc intéressant d'envisager d'étudier le comportement de ces mutants lors de la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* aux graines d'*A. thaliana*.

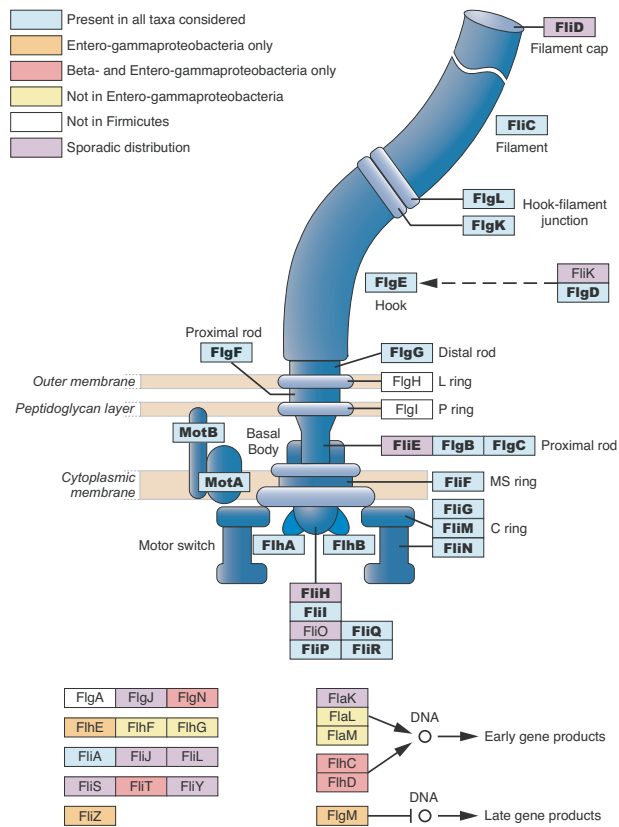


Figure 31. Organisation du système flagellaire et distribution des protéines flagellaires parmi les espèces bactériennes qui possèdent un système flagellaire (d'après Liu et Ochman, 2007). Les protéines qui constituent le « core » du flagelle sont notées en gras.

III. La formation de biofilms bactériens

Les biofilms microbiens constituent un mode de croissance protégé permettant la survie dans des environnements hostiles tels que la phyllosphère ou la graine (Morris *et al.*, 1997; Jacques *et al.*, 2005) où règnent des stress physiques, hydriques... . Il semble donc intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires régulant la formation de ces structures qui peuvent avoir un rôle indéniable dans la survie des bactéries sur les semences. Les différentes étapes de formation, décrites précédemment, mettent en jeu des mécanismes moléculaires spécifiques.

1. Déplacement des bactéries jusqu'à un site favorable d'adhésion

La détection d'un environnement favorable est suivie de l'adhésion des bactéries entre elles et au support. Le déplacement des bactéries dans leur milieu est assuré par le changement du sens de la rotation de leur flagelle (Hazelbauer *et al.*, 2007). Le flagelle se présente sous la forme d'un long filament hélicoïdal ancré au niveau de la membrane cellulaire par un crochet flexible et un corps basal (**Figure 31**) (Liu et Ochman, 2007). Le filament flagellaire est un tube composé d'environ 20 000 copies d'une unique protéine, la flagelline, polymérisée en une hélice complexe (Tans-Kerten *et al.*, 2001). *X. campestris* pv. *campestris* possède un flagelle polaire unique qui va lui permettre de se déplacer dans son milieu en utilisant des signaux du chimiotactisme perçus par des senseurs nommés Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCP). La rotation de son flagelle lui permet de se mouvoir par une forme de nage (appelée swimming). Ce phénomène est facilement observable, *in vitro*, dans des milieux semi-liquide (maximum 0,4 % d'agar) par un trouble circulaire dans le milieu à partir du point de dépôt d'inoculum. Une seconde forme de mobilité qui nécessite également la présence d'un flagelle est l'essaimage (le swarming). Ce type de déplacement s'effectue sur des milieux plus riches en agar (Kearns, 2010). Une étude récente démontre qu'un des deux facteurs σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (également appelé *rpoN2*) et l'un de ses activateurs contrôle l'expression d'un second facteur sigma alternatif (σ^{28}) qui est indispensable pour l'expression du gène *fliC*, codant la flagelline (Yang *et al.*, 2009).

2. Adhésion des cellules bactériennes, agrégation et formation de la structure tridimensionnelle

L'adhésion des cellules bactériennes à une surface biotique ou abiotique et l'agrégation sont permises grâce à l'action combinée d'adhésines fibrillaires et non fibrillaires.

Les adhésines non fibrillaires appartiennent à une famille très large de mono- ou d'oligomères qui sont pour la plupart présentes à la surface de la cellule, certaines d'entre elles n'étant plus liées à la cellule. Trois types de transport à travers la membrane externe ont été identifiés et sont constitués des adhésines en elles-mêmes : les autotransporteurs monomériques clivés à la surface de la cellule (Dautin and Bernstein, 2007), les autotransporteurs trimériques (TAA : trimeric autotransporter adhesins) (Cotter *et al.*, 2005), et les systèmes de sécrétion à deux partenaires (TPS : two-partner secretion system ou type Vb) comme les hémagglutinines filamenteuses telles que YapH (Mazar and Cotter, 2006).

Les adhésines fibrillaires ou pili de type IV ou TFP (Type Four Pili) sont des facteurs essentiels à l'adhésion des cellules aux surfaces mais également à la construction de la structure tridimensionnelle du biofilm. Les TFP sont formés par assemblage de sous-unités d'une protéine unique : la piline. Ils permettent également à la bactérie de se mouvoir selon un mécanisme d'extension-rétraction du pilus (appelé « twitching motility »). Ce mouvement est composé de phases d'extension, d'accrochage à la surface et de rétraction du pilus faisant avancer la cellule de façon saccadée à une vitesse de 0.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Skerker et Berg, 2001). L'extension (assemblage de la piline) se fait grâce à PilB, tandis que la rétraction (désassemblage de la piline) se fait par PilT à une vitesse autour de 1000-1500 sous-unités de piline par seconde (Mattick, 2002). L'expression des gènes clés de la voie de biosynthèse des TFP (*pilA* et *pilD*) est sous le contrôle d'un facteur σ^{54} *rpoN* (da Silva Neto *et al.*, 2008). L'implication des facteurs σ dans la mise en place de mécanismes d'adaptation, tels que la formation de biofilms, a récemment été démontrée chez *Burkholderia cenocepacia*, *Vibrio fischeri* et *Xylella fastidiosa* (Saldias *et al.*, 2008; Wolfe *et al.*, 2004; da Silva Neto *et al.*, 2008). Ces études ont révélé qu'un gène *rpoN* fonctionnel est nécessaire pour la formation de biofilms chez *B. cenocepacia* K56-2 et *V. fischeri*. En effet, des mutants *rpoN* sont altérés dans leur capacité à former des biofilms ou forment des biofilms différents par rapport à leur souche sauvage respective (Saldias *et al.*, 2008; Wolfe *et al.*, 2004). A l'inverse, le gène codant le σ^{54} chez *X. fastidiosa* semble contrôler négativement l'adhésion de cette souche à des surfaces abiotiques et l'agrégation de cellules à cellules. Ainsi, des mutants *rpoN* forment approximativement quatre fois plus de biofilms que la souche sauvage (Silva Neto *et al.*, 2008). Ces phénotypes opposés peuvent être expliqués par le fait que le nombre et la nature des σ^{54} varient selon les espèces bactériennes.

IV. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant)

Même si notre attention s'est portée sur les protéines LEA chez les microorganismes, ce sont des protéines décrites initialement dans le règne végétal. Une présentation de leurs caractéristiques et fonctions chez les plantes permet de mieux appréhender leur rôle putatif chez les microorganismes.

1. Les protéines LEA : classification et caractéristiques

Les premières protéines LEA ont été découvertes dans des semences de coton (*Gossypium hirsutum*) et correspondaient à des protéines qui s'accumulaient fortement au cours des phases tardives de la maturation (Dure *et al.*, 1981; Galau *et al.*, 1986). Par la suite, elles ont été retrouvées dans des semences de diverses espèces végétales mais également dans des organes végétatifs, et plus particulièrement dans des conditions de stress telles que le froid, la sécheresse et de fortes salinités (Thomashow *et al.*, 1992; Ramanjulu et Bartels, 1996). De plus, certaines d'entre elles ont également été détectées dans les tissus végétatifs de plusieurs espèces de plantes reviviscentes (Piatkowski *et al.*, 1990).

Le regroupement des protéines dans la famille LEA ne s'est basé sur aucun des fondements traditionnels de classification des protéines. L'objectif de cette classification a été de leur trouver des caractéristiques communes, basées sur leur séquence protéique, en l'absence de toute caractérisation fonctionnelle. Plusieurs classifications se sont succédé au fil des années depuis leur découverte. La première classification de Dure et collaborateurs (1989) a été modifiée de nombreuses fois (Bray, 1993 ; Dure, 1993) et proposait de classer ces protéines selon des alignements de séquences primaires. Cette classification a évolué rapidement grâce aux identifications de nouvelles protéines LEA chez de nombreuses espèces. Wise (2003) propose une classification basée sur une analyse bioinformatique et statistique (POPP : Protein or Oligonucleotide Probability Profile) qui répartit les protéines LEA en six grandes classes.

Une caractéristique commune à l'ensemble des protéines LEA est la faible représentation, voire même l'absence, des résidus cystéine et tryptophane. En revanche, elles sont aussi caractérisées par une richesse en acides aminés chargés (R, D, E, H et K) et polaires (R, N, D, E, Q, H, K, S et T) (Battaglia *et al.*, 2008). De cela résulte une forte hydrophilie partagée par toutes les protéines LEA qui pourraient alors être assimilées aux hydrophilines (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Ces dernières se caractérisent par un pourcentage en résidus

glycine (G) supérieur à 6% et une hydrophilie supérieure à 1. Cependant, ces deux spécificités ne caractérisent pas l'ensemble des protéines LEA. Ainsi, ces dernières sont seulement considérées comme un sous-groupe des hydrophilines (Battaglia *et al.*, 2008). Grâce à leur hydrophilie, les protéines LEA vont pouvoir rester solubles après un chauffage à 95°C pendant 10 minutes. Cette propriété est exploitée pour la purification de certaines protéines LEA recombinantes à partir d'*E. coli* (Jepson and Close, 1995). De plus, même si certains programmes de prédiction de structure suggèrent que certaines protéines LEA ont des structures secondaires définies, la plupart des protéines LEA sont considérées comme des protéines majoritairement déstructurées (Mouillon *et al.*, 2006).

2. Fonctions des protéines LEA chez les plantes

Les protéines LEA sont fortement accumulées pendant les dernières étapes de formation de la graine (lorsqu'une dessiccation naturelle intervient dans les tissus) et pendant des périodes de stress hydrique dans les organes végétatifs (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). La quantité de ces protéines décline très rapidement lors de l'imbibition et de la germination. Ce déclin coïncide également avec la perte de la tolérance à la dessiccation (Blackman *et al.*, 1991). Afin d'élucider leurs fonctions, des études *in vitro* sur des enzymes ou des liposomes et *in vivo* par des approches de transgénèse ont été réalisées. Ainsi, des formes recombinantes de protéines des groupes 1 à 4 sont capables de protéger l'activité enzymatique de la citrate synthase en limitant l'agrégation causée par un stress hydrique (Goyal *et al.*, 2005).

Ces différentes données suggèrent que les protéines LEA sont impliquées, chez les plantes, dans la tolérance à la dessiccation et plus largement aux stress abiotiques (hydriques, thermiques, salins, froid/gel). Cependant, malgré le grand nombre de protéines LEA identifiées et le nombre d'études menées, leurs fonctions moléculaires en relation avec la tolérance à la dessiccation sont encore assez peu connues même si plusieurs hypothèses sont avancées. Un premier rôle de chaperonne moléculaire est souvent suggéré. En effet, elles permettraient d'éviter une agrégation inappropriée des protéines lors d'une déshydratation en formant des complexes protéine-protéine de manière transitoire. De plus, elles pourraient également assurer l'activité de certaines enzymes, lors d'un stress hydrique, en maintenant une quantité d'eau suffisante à leur fonctionnement dans leur environnement cellulaire proche (Tunnacliffe et Wise, 2007).

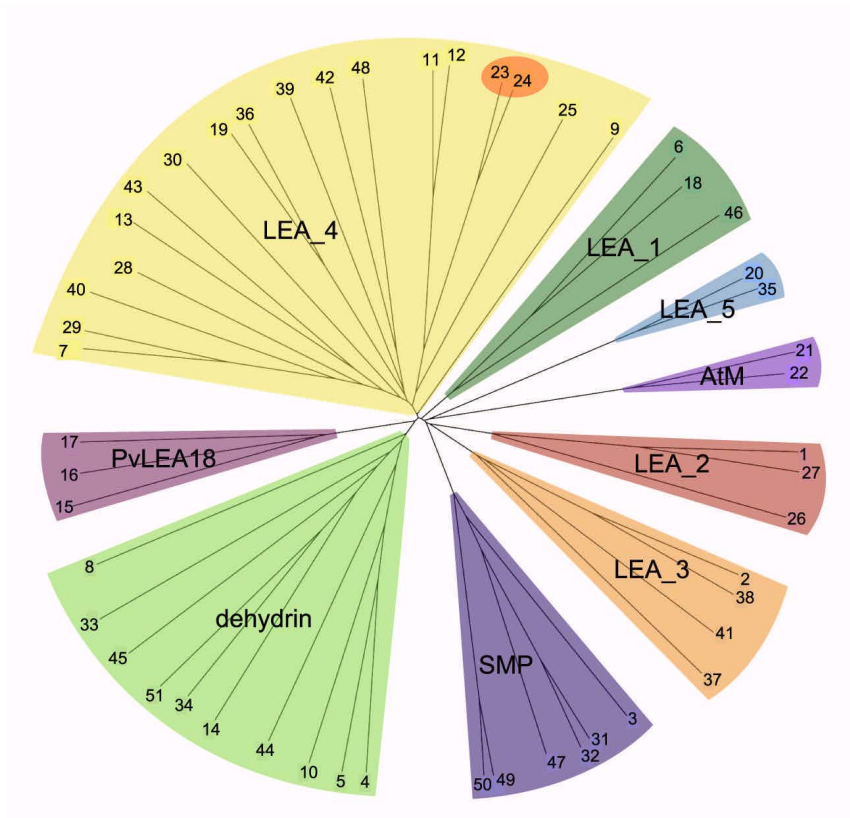


Figure 32. Dendrogramme non enraciné représentant l'ensemble des gènes codant des protéines LEA chez *A. thaliana* (d'après Hundertmark et Hincha, 2008).

3. Les protéines LEA chez les microorganismes

Les protéines LEA ont été considérées comme spécifiques des plantes pendant plusieurs années. Récemment, des homologues aux protéines LEA ont été découverts chez divers organismes tels que les bactéries, les animaux invertébrés et les champignons.

3.1. Les protéines LEA chez les bactéries

La protéine GsiB chez *Bacillus subtilis* est induite en présence de différents stress tels qu'un choc thermique (Volker *et al.*, 1994). Sa séquence protéique présente des similarités de séquence avec un motif de 20 acides aminés caractéristique des protéines LEA du groupe 1 (Stacy et Aalen, 1998). La bactérie extrêmophile, *Deinococcus radiodurans*, possède une protéine homologue au groupe 3 des protéines LEA qui est indispensable dans la tolérance à la dessiccation (Battista *et al.*, 2001). Cependant, cette protéine ne semble pas intervenir dans la mise en place d'une protection face aux radiations ionisantes chez cette espèce bactérienne.

3.2. Les protéines LEA chez les champignons

La première étude sur une protéine fongique de type LEA a été menée par Mtwisha et ses collaborateurs (1998). Ils suggèrent que la protéine HSP12 de *Saccharomyces cerevisiae* pouvait être considérée comme une protéine de type LEA sur la base de son profil d'expression et de sa composition en acides aminés. Par la suite, un rôle de protection de l'intégrité des membranes lui a été attribué pour protéger la levure de la dessiccation (Sales *et al.*, 2000). Les protéines GRE1 et CON6 sont deux autres protéines, qui peuvent être attribuées à la famille des LEA. Elles ont été identifiées respectivement chez *S. cerevisiae* (Garay-Arroyo *et al.*, 1999) et *Neurospora crassa* (Springer et Yanofsky, 1992) et présentent de fortes teneurs en acides aminés hydrophiles. De plus, les transcrits correspondants sont accumulés respectivement en réponse à une situation hyper-osmotique et à la dessiccation.

3.3. Les déhydrines chez les microorganismes

3.3.1. Définition et caractéristiques des déhydrines

Les déhydrines (« dehydration-induced proteins ») sont des protéines appartenant à la classe 2 des protéines LEA (ou « D-11 ») (**Figure 32**). Les déhydrines du règne végétal possèdent généralement des segments riches en acides aminés de type lysine (K), tyrosine (Y)

et sérine (S). Le rôle du segment riche en S a été le plus étudié. Ce motif à l'état phosphorylé permettrait la fixation d'ions calcium chez la plupart des déhydrines étudiées. Cependant, cette fixation d'ions Ca^{2+} n'est pas observée chez toutes les déhydrines phosphorylées. Les rôles physiologiques de la phosphorylation avec ou sans fixation de calcium restent encore à élucider (Hundertmark et Hinch, 2008). Les déhydrines interviendraient à des niveaux d'hydratation intermédiaire des tissus. Des études d'activités de l' α -amylase, soumise ou non à un faible potentiel hydrique (solution de PEG à 20%), montrent une augmentation de celles-ci en présence d'une déhydrine de bouleau (Rinne *et al.*, 1999). Certaines déhydrines sont également capables de protéger des enzymes contre le gel. Par exemple, la déhydrine PCA60 du pêcher montre une activité cryoprotectrice sur la lactate déshydrogénase après neuf cycles de congélation/décongélation (Wisniewski *et al.*, 1999). Une diminution des effets toxiques des ions lors de stress salins est attribuée à certaines déhydrines acides (riches en acide glutamique). Chez *A. thaliana*, la protéine ERD14 séquestre *in vitro* les ions calcium Ca^{2+} lorsqu'elle est phosphorylée (Alsheikh *et al.*, 2005). L'analyse fonctionnelle des protéines LEA est également envisageable par des techniques de transgénèse en testant la tolérance d'organismes transgéniques face à des stress de type thermique, hydrique et salin. De cette manière, la surexpression de la protéine HVA1 d'orge (*Hordeum vulgare*) chez le riz (*Oryza sativa*) accroît la tolérance des plantules au stress hydrique et aux fortes concentrations salines (Xu *et al.*, 1996).

3.3.2. Les déhydrines chez les champignons

La première déhydrine fongique, TbdHN1, a été mise en évidence chez le champignon ectomycorhizien *Tuber borchii*. Ces auteurs ont identifié un motif consensus et conservé (« Conserved Signature Pattern », CSP) parmi des déhydrines homologues au gène *Tbdhn1* provenant d'autres Ascomycètes filamenteux : $[GRK]-[PV]-H-x-[ST]-x-x-x-N-[nonpolar\ amino\ acid]-[nonpolar\ amino\ acid]-D-P-[RTP]-V-D-[SN]$. Cette signature peut être répétée de 1 à 9 fois dans chaque protéine et présenter quelques dégénérescences. Le gène *Tbdhn1* est surexprimé dans les organes reproducteurs par rapport au mycélium. De plus, la quantité d'ARN messagers augmente immédiatement après un transfert sur un milieu contenant du NaCl pendant 30 minutes. Ces quantités reviennent à un niveau basal quand le mycélium est replacé un milieu contrôle. De la même manière, une accumulation de messagers est aussi observée après un traitement de 48 heures au froid (Abba *et al.*, 2006).

La caractérisation de trois « dehydrin-like » chez *Aspergillus fumigatus*, DprA, DprB (Wong Sak Hoi *et al.*, 2011) et DprC (Wong Sak Hoi *et al.*, 2012) a permis d'accroître la

compréhension des rôles des déhydrines fongiques. En effet, ces deux études indiquent un rôle spécifique mais différentiel de ces protéines dans la réponse à des stress de type oxydatif, osmotique, affectant le pH, et thermique (-20°C). De plus, l'expression de ces gènes semble spécifique à un type d'organe en particulier. En effet, le niveau des transcrits des gènes *DprA*, *DprB* et *DprC* chute brutalement lorsque des conidies dormantes entrent en phase de germination. Une déhydrine a également été identifiée chez *Aspergillus nidulans* et semble être impliquée dans la réponse à des stress de type oxydatif, osmotique et thermique (Wartenberg *et al.*, 2012).

3.3.3. Les déhydrines chez les bactéries

Aucune description d'une déhydrine bactérienne n'a encore été effectuée à notre connaissance. Cependant, des protéines bactériennes, telles que les harpines, présentent de similitudes structurales et physico-chimiques avec les déhydrines.

La première harpine HrpN a été isolée chez *Erwinia amylovora*. Depuis d'autres harpines ont été identifiées chez de nombreuses bactéries phytopathogènes qui possèdent un SST3. Parmi ces harpines identifiées, on peut citer PopA de *R. solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994) et HrpZ de *Pseudomonas syringae* (Haapaleinen *et al.*, 2011) ou la famille Hpa1/HpaG chez *Xanthomonas spp.* (Zhu *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2003 ; Sang *et al.*, 2012). Les harpines ne sont pas impliquées dans la structure de l'appareil de sécrétion. Ce sont les premières protéines découvertes comme étant sécrétées par le SST3 (Buttner et Bonas, 2002).

Même si elles présentent peu d'homologie au niveau de leur séquence primaire, les harpines partagent des caractéristiques communes au niveau structural et biochimique. Ce sont des protéines riches en glycine et en acides aminés hydrophiles. Elles ne possèdent pas de résidus cystéine. De plus, elles sont stables à la chaleur, ce qui suggère qu'elles n'ont pas d'activité enzymatique (Wei *et al.*, 1992). De manière surprenante, ces caractéristiques présentent des similitudes intéressantes avec celles des protéines LEA (présentées dans le paragraphe précédent).

Plusieurs études ont eu pour objectif ces dernières années d'identifier le rôle des harpines dans le pouvoir pathogène des bactéries. Malgré cela, la (ou les) fonction(s) de ces protéines reste(nt), à l'heure actuelle, encore largement méconnue(s). Ce sont des protéines dirigées vers la paroi externe des cellules de l'hôte et capables de se fixer au calcium pectique (Vivian et Arnold, 2000 ; Li *et al.*, 2010). Ce sont des éliciteurs de mécanismes non spécifiques de défense de la plante dépendants du cluster *hrp* pour leur sécrétion (Huang *et al.*, 1995 ; Alfano et

Collmer, 1997). En effet, celles-ci ont un rôle dans l'établissement de la maladie chez des plantes sensibles et dans l'induction d'une réaction de type hypersensible chez des plantes résistantes (Zhu *et al.*, 2000). L'expression d'un tel gène chez le riz lui confère une résistance non spécifique et durable face à un champignon phytopathogène, *Magnaporthe grisea* (Shao *et al.*, 2008). D'autres études semblent indiquer que ces protéines puissent être impliquées dans la suppression des phénomènes d'agrégation de protéines entre elles grâce un domaine protéique particulier (Wang *et al.*, 2007). La surexpression d'une harpine de *X. oryzae* pv. *oryzae* dans du riz exposé à une sécheresse améliore la tolérance de la plante face à ce stress (Zhang *et al.*, 2011). Cette réponse est la conséquence d'une activation de la voie de signalisation de l'acide abscissique (ABA). L'augmentation des teneurs en ABA dans la plante a pour conséquence directe d'induire la fermeture des stomates.

Enjeux et objectifs de la thèse

Enjeux et objectifs de la thèse

L'enjeu de ce travail de thèse est d'approfondir les connaissances sur le déterminisme moléculaire bactérien et fongique de la transmission à et par la semence de la plante hôte. Pour cela, deux pathosystèmes modèles au stade reproducteur ont été mis en place avec la *Brassicaceae* modèle *Arabidopsis thaliana* comme plante-hôte et côté agent pathogène avec la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et le champignon *Alternaria brassicicola*. Sur la base des connaissances bibliographiques actuelles, différents paramètres liés principalement aux méthodes d'inoculation et de récolte des graines ont été testés afin de déterminer les conditions expérimentales optimales permettant d'obtenir une contamination des graines satisfaisante dans chacun des deux pathosystèmes. De plus, l'étude de l'influence de la teneur en flavonoïdes des graines sur la modulation de la transmission d'une souche sauvage d'*A. brassicicola* a également été abordée. Enfin, une approche microscopique menée en microscopie électronique à balayage et en microscopie confocale à balayage laser, a été engagée dans l'optique de mieux comprendre les interactions histologiques entre l'agent pathogène et la plante hôte au moment de la transmission à la semence.

Nous posons l'hypothèse que les mécanismes moléculaires intervenant dans la transmission d'agents pathogènes à la semence et dans leur survie sur les graines sont liés à la versatilité nutritionnelle du microorganisme, à sa capacité d'une part à percevoir les stress et d'autre part à mettre en place une réponse adaptative pour se protéger.

La versatilité nutritionnelle a été étudiée uniquement dans le pathosystème bactérien et lors de la transmission à la semence. Pour cela, des mutants de délétion ont été construits ou obtenus grâce à une collaboration avec l'équipe de Matthieu Arlat et Emmanuelle Lauber du Laboratoire des Interactions Plante-Microorganismes (LIPM) de Toulouse. La fréquence de transmission de ces souches aux graines d'*A. thaliana* a été quantifiée.

Nous avons également focalisé notre attention sur l'étude des mécanismes permettant aux agents pathogènes de percevoir et s'adapter aux stress *via* l'activation de voies de signalisation spécifiques dans les deux pathosystèmes. Le cycle de vie d'agents pathogènes transmis par les semences est constitué d'une part par l'étape de transmission à la graine mais aussi par une phase de survie sur cet organe mature. Nous avons émis l'hypothèse que la mise

en place de mécanismes protecteurs contre des stress osmotiques et hydriques intervient de ces deux étapes pour répondre au stress provoqué par les faibles teneurs en eau contenues dans la graine. En effet, lors de la dessiccation de la graine en phase finale de maturation sur la plante mère, cet état quiescent se traduit par la mise en place d'un état vitreux cytoplasmique. Les états vitreux intracellulaires des graines se caractérisent par une très faible mobilité moléculaire et une concentration moléculaire élevée. Cela permet de limiter la diffusion de molécules et les probabilités d'apparition de réactions chimiques (Buitink et Leprince, 2008). La maturation de la graine s'accompagne également d'une diminution drastique de la teneur en eau dans cet organe. Dans la plupart des espèces végétales, celle-ci diminue jusqu'à atteindre 5 à 10% par rapport à la matière fraîche ou moins de 0,1 g d'eau/g de matière sèche.

Dans le cas du pathosystème fongique, une approche fonctionnelle a été entreprise dans le but d'évaluer l'implication du mécanisme d'osmorégulation cellulaire (*via* l'utilisation d'un mutant affecté dans la production d'une histidine kinase du groupe III) dans la capacité d'*A. brassicicola* à se transmettre aux graines. En effet, lorsque le champignon parvient à pénétrer dans la silique et atteint les graines, cela correspond chronologiquement au début de la phase de maturation des graines et donc à une diminution de la teneur en eau dans les tissus hôtes.

Dans le cas du pathosystème bactérien, nous avons choisi de débiter la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la perception et la transduction du signal chez *X. campestris* pv. *campestris* en utilisant des souches affectées respectivement dans des systèmes à deux composants bactériens et dans la production de facteurs σ^{54} . Le phénotype de ces souches a été caractérisé dans des expérimentations de survie *in vitro* en microcosmes et *in vivo* sur des graines d'*A. thaliana*. Une étude plus approfondie a été menée pour identifier les différents rôles joués par les facteurs σ^{54} lors de la transmission à la semence et de la survie de *X. campestris* pv. *campestris* sur des graines. Nous émettons l'hypothèse que les processus d'adhésion et d'agrégation ont un rôle déterminant d'une part dans la transmission à la graine et d'autre part dans la capacité de survie de *X. campestris* pv. *campestris* sur les graines d'*A. thaliana*. L'étape d'adhésion d'un microorganisme sur les tissus de sa plante hôte est un prérequis indispensable à la mise en place d'une interaction avec celle-ci et/ou à la poursuite de son cycle de vie. Ainsi, lors de la transmission aux graines, l'agent pathogène doit adhérer aux surfaces de la graine pour assurer la réussite de cette phase et mettre en place des mécanismes de résistance aux stress hydriques afin d'assurer leur survie. Dans notre pathosystème modèle, nous émettons l'hypothèse que les cellules bactériennes pourront être

protégées face à des stress de type hydrique ou osmotique en formant des biofilms grâce, entre autres, à l'intervention des facteurs σ^{54} .

Afin de répondre de la manière la plus adaptée à ces stress, l'agent pathogène doit mettre en place une réponse adaptative. Nous avons émis l'hypothèse que des protéines intrinsèquement déstructurées de type LEA pourraient intervenir dans la mise en place de cette réponse adaptative générale.

Un axe de ce travail de thèse a consisté à identifier des protéines LEA de type déhydrines chez *A. brassicicola* et à caractériser leur(s) rôle(s) dans le déterminisme du pouvoir pathogène de ce champignon et plus particulièrement dans la capacité de transmission et de survie de ce pathogène à et sur les graines d'*A. thaliana*.

Les harpines bactériennes ont des caractéristiques physico-chimiques semblables à celles des déhydrines, aussi nous avons émis l'hypothèse de l'implication d'une telle protéine (Hpa1) de *X. campestris* pv. *campestris* lors des premières phases de survie sur la graine d'*A. thaliana*.

Matériel et Méthodes

Tableau 1. Liste des souches et des plasmides utilisés dans cette étude

Souches ou plasmides	Phénotype et caractéristiques	Source ou référence
Plasmides		
pΔ13	dérivé du pK18mobsacB, sacB, oriT(RP4), pBM1ori, BsaI, ccdB, Cm ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pRK600	Cm ^R , traRK2, oriColE1	Finan <i>et al.</i> , 1986
pCB1636	dérivé du pBluescript II SK-/ Sall, Hyg ^R	FGSC
pnr2	dérivé du PUC18, Nat ^R	Hayashi <i>et al.</i> , 2002
pDsRed-SKL	Nat ^R , DsRed-SKL, Amp ^R	Elleuche et Pöggeler, 2008
pGEMt	dérivé du pGEM-5Zf(+). Amp ^R . Origine de réplication. LacZ. Multiples sites de clonage - Apa I, Aat II, Sph I, BstZ I, Nco I, Sac II, Spe I, Not I, BstZ I, Pst I, Sal I, Nde I, Sac I, BstX I, Nsi I. Promoteurs ARN polymérase T7 and SP6.	Promega
pYes2/CT	dérivé du vecteur parental pYES2. Amp ^R , URA3 (résistance dans la levure), pGAL1, CYC1 TT, pUC1 ori, 2μ origin, fl ori. Epitope C-terminal V5 pour la détection et une polyhistidine (6xHis) pour la purification.	InvitroGen
pufZ75	dérivé de pUFR034 (IncW, Mob ⁺ , Par ⁺ , cos, lacZα, Km ^r) auquel on a ajouté P _{trp} -TIR-gfp.	Zhang <i>et al.</i> , 2009
pCT74	ToxA, SGFP	Lorang <i>et al.</i> , 2001
Souches sauvages		
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 ou LMG568, mutant spontané de LMG569, jaune, Rif ^R	da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>Abra43 WT</i>	<i>Alternaria brassicicola</i> , souche isolée sur des semences de radis porte-graines par le GEVES	GEVES
BY4743	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Dérivé d'un croisement entre BY4741 et BY4742 (issus tous deux de S288C). Génotype: MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0.	EuroScarf
DH5α	<i>Escherichia coli</i> Fϕ980dlacZ:M15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK-) supE44 relA1 deoR (lacZYA-argF)U169	Hanahan, 1983
K12	souche d' <i>Escherichia coli</i> helper	Devoret et Blanco, 1970
JM109	<i>Escherichia coli</i> . Génotype: F' [traD36 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15] Δ(lac-proAB) glnV44 (supE44) c14- (McrA-) thi gyrA96 (NalR) endA1 hsdR17(rk- mk+) relA1 recA1	Promega
Mutants et transformants		
AB43Δ <i>Dhn1</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abdh1</i> , Hyg ^R	cette étude
AB43Δ <i>Dhn2</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abdh2</i> , Hyg ^R	cette étude
AB43Δ <i>Dhn3</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abdh3</i> , Hyg ^R	cette étude
AB43Δ <i>Dhn1ΔDhn2</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau des gènes <i>abdh1</i> et <i>abdh2</i> , Hyg ^R , Nat ^R	cette étude
AB43Δ <i>Dhn1GFPc</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abdh1</i> et exprimant constitutivement la GFP, Hyg ^R	cette étude
AB43Dhn1fGFP	<i>A. brassicicola</i> 43 dont le gène <i>abdh1</i> est fusionné en C-terminal à la GFP, Hyg ^R	cette étude
AB43Dhn2fGFP	<i>A. brassicicola</i> 43 dont le gène <i>abdh2</i> est fusionné en C-terminal à la GFP, Hyg ^R	cette étude
AB43Dhn3fGFP	<i>A. brassicicola</i> 43 dont le gène <i>abdh3</i> est fusionné en C-terminal à la GFP, Hyg ^R	cette étude
AB43Dhn1fGFPdsred	AB43Dhn1fGFP exprimant la protéine DsRed-SKL, Hyg ^R , Nat ^R	cette étude
AB43Dhn2fGFPdsred	AB43Dhn2fGFP exprimant la protéine DsRed-SKL, Hyg ^R , Nat ^R	cette étude
AB43Dhn3fGFPdsred	AB43Dhn3fGFP exprimant la protéine DsRed-SKL, Hyg ^R , Nat ^R	cette étude
AB43Δ <i>Abp1</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abap1</i> , Hyg ^R	souche IRHS-Fungisem
AB43Δ <i>Abkn7</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abkn7</i> , Hyg ^R	souche IRHS-Fungisem
AB43Δ <i>Hog1</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>ahog1</i> , Hyg ^R	Joubert <i>et al.</i> , 2011a
AB43Δ <i>Abt2</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abst2</i> , Hyg ^R	Joubert <i>et al.</i> , 2011a
AB43Δ <i>Hac1</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>ahac1</i> , Hyg ^R	Joubert <i>et al.</i> , 2011b
AB43Δ <i>Abn1</i>	<i>A. brassicicola</i> 43 déficient au niveau du gène <i>abn1</i> , Hyg ^R	Dongo <i>et al.</i> , 2009
<i>XccΔ1240</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>hpa1</i> (<i>xcc1240</i>), Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ1935</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc1935</i> , Rif ^R	LIPM Toulouse
<i>XccΔ2802</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc2802</i> , Rif ^R	LIPM Toulouse
<i>XccΔ1935Δ2802</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau des gènes <i>xcc1935</i> et <i>xcc2802</i> , Rif ^R	LIPM Toulouse
<i>XccGFP</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 marqué constitutivement avec la GFP, Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ1935GFP</i>	<i>XccΔ1935</i> marqué constitutivement avec la GFP (pufZ75), Rif ^R , Kan ^R	cette étude
<i>XccΔ2802GFP</i>	<i>XccΔ2802</i> marqué constitutivement avec la GFP (pufZ75), Rif ^R , Kan ^R	cette étude
<i>XccΔ1935Δ2802GFP</i>	<i>XccΔ1935Δ2802</i> marqué constitutivement avec la GFP (pufZ75), Rif ^R , Kan ^R	cette étude
<i>XccΔ4120</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xytB</i> (<i>xcc4120</i>), Rif ^R	Dejean, 2011
<i>XccΔ2828</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xytA</i> (<i>xcc2828</i>), Rif ^R	Dejean, 2011
<i>XccΔ4120Δ2828</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau des gènes <i>xytA</i> et <i>xytB</i> , Rif ^R	Dejean, 2011
<i>XccΔ4120 p4120</i>	<i>XccΔ4120</i> complétement avec le gène <i>xytB</i> (<i>xcc4120</i>), Rif ^R , Tet ^R	Dejean, 2011
<i>XccΔ2828 p2828</i>	<i>XccΔ2828</i> complétement avec le gène <i>xytA</i> (<i>xcc2828</i>), Rif ^R , Tet ^R	Dejean, 2011
<i>Xcc::1166</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>hpfG</i> (<i>xcc1166</i>), Rif ^R , Kan ^R	souche IRHS-EmerSys
<i>Xcc::1230</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>hcuU</i> (<i>xcc1230</i>), Rif ^R , Kan ^R	souche IRHS-EmerSys
<i>XccΔ0824</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc0824</i> , Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ1049</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc1049</i> , Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ1187</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc1187</i> , Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ2053</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc2053</i> , Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ2152</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc2152</i> , Rif ^R	cette étude
<i>XccΔ3435</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 déficient au niveau du gène <i>xcc3435</i> , Rif ^R	cette étude

Chapitre 2 : Matériel & Méthodes

I. Matériel

1. Matériel microbiologique

Un isolat fongique Abra43 appartenant à l'espèce *Alternaria brassicicola* a été utilisé dans ces travaux. Il provient d'isolements effectués par le GEVES (Groupe d'Etude et de Contrôle des Variétés et des Semences) à partir de semences de radis, et a été identifié sur la base de critères morphologiques et moléculaires (Iacomi-Vasilescu, 2001). Cette souche est maintenue par repiquages successifs du mycélium sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA : extrait de pomme de terre 0,4% (p/v), glucose 2% (p/v), agar 2% (p/v)) ou Malt-Agar (Malt 2% (p/v) ; Agar 2% (p/v)) à 24°C et à l'obscurité pour la croissance, et à 4°C pour la conservation. Les souches transformées génétiquement dérivent de cette souche de référence. Selon la nature des gènes de résistance intégrés lors de la mutagénèse dirigée, les transformants sont maintenus soit sur hygromycine (Sigma) à 12 µg/mL ou nouséothricine (Fluka) à 10 µg/mL soit simultanément sur ces deux antibiotiques.

L'ensemble des souches construites dans ce travail est répertorié dans le **Tableau 1**.

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude appartiennent aux genres *Xanthomonas* et *Escherichia*. Les souches de *Xanthomonas* sont cultivées sur milieux TSA 10% (tryptone 1,7 g/L ; peptone soja 0,3 g/L ; glucose 0,25 g/L ; NaCl 5 g/L ; KH₂PO₄ 0,5 g/L ; agar 15 g/L ; pH 7,2), MOKA (extrait de levure 4 g/L ; casamino acids 8 g/L ; KH₂PO₄ 2 g/L ; MgSO₄.7H₂O 0,3 g/L), KADO (MOKA additionné de saccharose à 10 g/L) (Bordes *et al.*, 2011), MME (K₂HPO₄ 2,1 g ; KH₂PO₄ 0,9 g ; (NH₄)₂SO₄ 0,2 g ; 4 mL de glutamate 1 M ; 0,2 mL de MgSO₄ ; 2 mL de casamino acids 15 % ; eau qsp 200 mL), ou XVM2 (NaCl 1,17 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,32 g/L, MgSO₄ 1,2 g/L, CaCl₂ 110,99 mg/L, KH₂PO₄ 21,8 mg/L, K₂HPO₄ 55,74 mg/L, FeSO₄ 2,7 mg/L, Fructose 1,8 g/L, saccharose 3,42 g/L, casamino acids 0,3 g/L, pH 6,7) (Guo *et al.*, 2011) ; additionnés des antibiotiques et antifongiques appropriés. Les antibiotiques utilisés sont la rifamycine (Rif, 50 mg/L, (Sigma)), rifampicine (Rifp, 50 mg/L, (Sigma)) et la kanamycine (Kan, 25 ou 50 mg/L, (Sigma)). Deux fongicides sont ajoutés dans les milieux de culture (propiconazole 10 mg/L (Polyflor, Syngenta) et cycloheximide 50 mg/L, (Sigma)). Les souches d'*E. coli* sont cultivées sur du milieu Luria

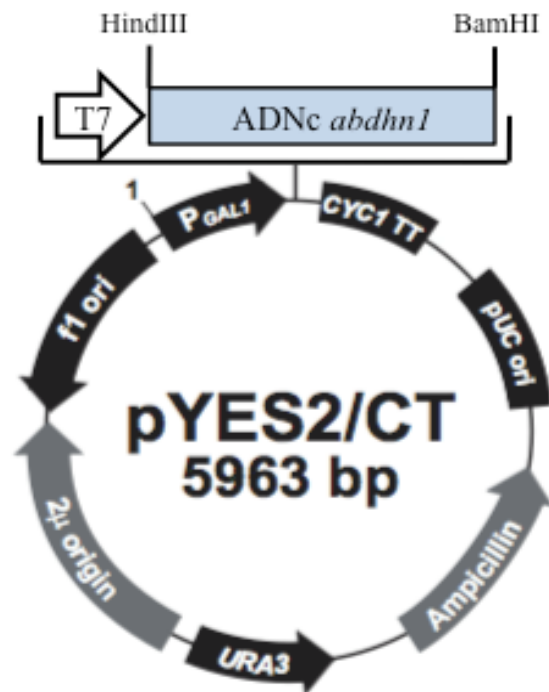


Figure 33. Représentation schématique du vecteur pYES2/CT recombinant et localisation du promoteur permettant l'expression inducible par le galactose du gène cloné (P_{GAL1}), du promoteur T7 nécessaire à la transcription in vitro (T7), du site permettant une fin de transcription efficace et la stabilisation de l'ARN messager (CYC1 TT), de l'origine pUC nécessaire au maintien d'une répliation d'un grand nombre de copies du plasmide chez *Escherichia coli* (pUC ori), du gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des transformants d'*E. coli* (Ampicillin), du gène permettant la sélection des transformants de levures capables de croître sur un milieu déficient en uracile (URA3), de l'origine permettant la répliation d'un grand nombre de copies du plasmide chez *S. cerevisiae* (2μ origin), de l'origine permettant la récupération de l'ADN simple brin (f1 origin).

Bertani (Bacto-tryptone 10 g/L ; extrait de levure 5 g/L ; NaCl 10 g/L ; agar 15 g/L ; pH 7,5). Les souches de *Xanthomonas* sont cultivées à 28°C et celles d'*E. coli* à 37°C. Toutes les souches sauvages, clones et mutants sont conservés à -80°C dans une solution de glycérol à 40 % (v/v).

Des levures (*Saccharomyces cerevisiae* souche BY4743 Acc#Y20000, Euroscarf) ont été transformées au laboratoire avec le vecteur pYes2/CT Invitrogen (**Figure 33**), dans lequel ont été introduites, de manière individuelle, les séquences codantes des gènes *Abdhn1* et *Abdhn3*, ainsi que les deux formes épissées du gène *Abdhn2* : *Abdhn2 α* , *Abdhn2 β* . Ces séquences sont sous le contrôle du promoteur P_{GALI}, inductible en présence de galactose.

2. Matériel végétal

Arabidopsis thaliana (Arabette des dames) a été utilisée comme plante modèle pour la mise au point des pathosystèmes bactériens et fongiques au stade reproducteur. Selon les expériences menées, les plantes doivent être soit au stade rosette (pour les tests de pouvoir pathogène) soit au stade hampe florale. Ainsi, la proportion de la photopériode par rapport à la nyctipériode varie : 8 h jour/16 h nuit pour l'obtention d'une rosette et 16 h jour/8 h nuit pour une hampe florale. Selon les microorganismes testés, différents écotypes et mutants d'arabette ont été utilisés. Il s'agit des écotypes San Feliu 2 (Sf-2) et Landsberg *erecta* (Ler). Un mutant construit dans *Ler* a également été utilisé : il s'agit du mutant *tt4-1* (référence NASC N85), affecté dans la production de la chalcone synthase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Les plantes sont cultivées dans un substrat Neuhaus huminsubstrat *N4* NFU 44-551 dans une chambre climatique où les températures jour/nuit sont respectivement de 22°C et 19°C. L'arrosage intervient suite à un ressuyage correct du terreau.

Le chou, *Brassica oleracea* var. *capitata* 'Bartolo', a été utilisé lors de la réalisation de tests de pouvoir pathogène avec des souches fongiques et bactériennes. Ses conditions de culture sont identiques à celles de l'arabette. Les plants de chou sont arrosés tous les 2 jours et une solution nutritive (N : 18 %, P : 14 %, K : 18 %, oligoéléments) est apportée une fois par semaine.

I. Méthodes

1. Méthodes d'analyse des acides nucléiques par biologie moléculaire

1.1. Extraction d'acides nucléiques

1.1.1. Extraction d'ADN génomique fongique

1.1.1.1. Méthode de Goodwin et Lee (1993)

Cette méthode est utilisée afin d'extraire l'ADN génomique à partir de cultures pures d'*Alternaria*. Le mycélium (2 à 10 mg) est prélevé en raclant la surface d'une boîte de Petri puis est transféré dans 100 µL du tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,2 ; EDTA 50 mM ; SDS 3% (p/v); β-mercaptoéthanol 1% (v/v)) et subi trois passages successifs au four à micro-ondes à la puissance maximale pendant 15, 10 et 5 s. Le mélange est additionné de 300 µL de tampon de lyse supplémentaire et incubé pendant 10 min à 80°C. Un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) est ajouté et la phase aqueuse est recueillie après une centrifugation pendant 15 min à 15000 g. L'ADN est précipité pendant 5 min dans la glace après ajout de 0,55 volume d'isopropanol en présence de 10 µL d'acétate de potassium 5 M. Après une centrifugation pendant 10 min à 10000 g, le culot obtenu est lavé avec 250 µL d'éthanol 80% puis séché pendant 3 min sous vide. L'ADN est mis en suspension dans 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 0,1 mM) et conservé à -20°C. Cette méthode vise à obtenir de l'ADN génomique fongique, de manière rapide, pour la vérification de l'intégration d'une cassette de mutation dans des transformants.

1.1.1.2. Méthode de Moller (1992)

Cette méthode a été utilisée pour la préparation d'ADN destiné à l'hybridation moléculaire (Southern-blot). Le mycélium (150 à 300 mg) est prélevé en raclant la surface des boîtes de Petri et broyé dans l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est transférée dans un tube Eppendorf et remise en suspension dans 1 ml de méthanol-0,1%-β-mercaptoéthanol. Après agitation, le mélange est centrifugé pendant 5 min et le surnageant est éliminé. Cette étape est effectuée à nouveau 2 fois. Le culot est ensuite séché à température ambiante pendant au moins 1 h, puis remis en suspension dans 500 µL de TES (Tris 100 mM pH 8,0 ; EDTA 10 mM ; SDS 2% (p/v)) en présence de 100 µg de protéinase K. Le mélange est incubé à 60°C pendant 1 h avant l'ajout de 140 µL de NaCl 5 M (concentration finale de 1,4

M) et de 65 μL de CTAB 10% (concentration finale de 1%). Après incubation à 65°C pendant 10 min, un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) est ajouté. Le mélange est conservé dans la glace pendant 30 min puis centrifugé 10 min à 4°C à 12000 g. La phase aqueuse est mélangée à 0,215 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 min puis centrifugé pendant 10 min à 4°C à 12000 g. L'ADN est précipité par addition sur le surnageant de 0,55 volume d'isopropanol froid. Le tube est agité doucement jusqu'à apparition de filaments d'ADN. Ceux-ci sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur et lavés dans 500 μL d'éthanol 70% (v/v). L'ADN est séché à l'air libre, remis en suspension dans 50 à 100 μL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 0,1 mM pH 8,0) contenant de la RNase (0,2 mg/ml).

1.1.2. Extraction d'ADN plasmidique

1.1.2.1. Méthode analytique

Pour l'analyse rapide des plasmides recombinants contenus dans *E. coli*, l'extraction est réalisée selon la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim (1983). Les bactéries sont cultivées dans 2 ml de milieu liquide LB, contenant l'antibiotique approprié, pendant une nuit à 37°C sous agitation. L'extraction est réalisée à partir de 1,5 ml de culture à saturation. Le culot cellulaire, obtenu par centrifugation à 5000 g pendant 1 minute, est repris dans 100 μL de tampon (glucose 50 mM ; EDTA 10 mM ; Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Les cellules sont lysées par l'action de 200 μL d'une solution NaOH 0,2 N / SDS 1% (p/v) pendant 5 min dans la glace. L'ADN chromosomique et les protéines dénaturés sont précipités par 150 μL d'une solution d'acétate de potassium 3 M pendant 5 min à 4°C puis éliminés par centrifugation (10000 g pendant 5 min à 4°C). Un volume d'éthanol 100% froid est ajouté au surnageant afin de précipiter l'ADN plasmidique pendant 5 min à température ambiante. Après 5 min de centrifugation à 10000 g, le surnageant est éliminé et le culot est lavé dans une solution Tris 0,1 mM / éthanol 70% (v/v) puis dans l'éthanol 100%. Le culot est séché puis repris dans 30 μL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 0,1 mM pH 8,0) contenant de la RNase (0,2 mg/ml).

1.1.2.2. Méthode préparative

L'obtention d'ADN plasmidique très pur est nécessaire pour le séquençage d'un insert. Cette purification est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) suivant

les indications données par le fournisseur. L'extraction est réalisée à partir de 6 ml de culture bactérienne à saturation dans le milieu LB contenant l'antibiotique approprié. Après une lyse alcaline classique et la précipitation des débris cellulaires, la fixation de l'ADN plasmidique à une colonne de silice permet une élimination très efficace des contaminants. L'ADN plasmidique est finalement élué dans 50 µL d'eau ou de tampon faiblement concentré en sels.

1.1.3. Extraction des ARN totaux

1.1.3.1. Extraction des ARN totaux fongiques

Le matériel fongique à extraire est obtenu en réalisant des cultures liquides dans du PDB (Potato Dextrose Broth). Une suspension de conidies d'*A. brassicicola* est calibrée à l'aide d'une cellule de Thoma à 4×10^6 conidies/mL. Un volume de 30 mL de PDB est inoculé avec 1 mL de la suspension calibrée pour obtenir une concentration finale de 2×10^5 conidies/mL. Les cultures sont mises sous agitation à 150 rpm, à 24°C et pendant 36 h. Les différentes cinétiques d'expression sont réalisées à partir de ce moment-là par ajout d'une molécule à une concentration donnée.

Le mycélium de chaque culture est récolté par filtration et immédiatement congelé dans l'azote liquide. Après un broyage dans l'azote liquide, 100 mg de mycélium en poudre sont placés dans un microtube à centrifuger. Du Trizol (0,5 mL, Invitrogen) est ajouté et l'ensemble est agité vigoureusement au vortex. Après une incubation de 15 min à température ambiante le mélange est centrifugé 10 min à 18000 g. La phase supérieure contenant le Trizol est prélevée avec précaution, transférée dans un nouveau tube, et 0,4 volume (200 µL) de chloroforme est ajouté. Après une agitation vigoureuse de 30 s, l'échantillon est incubé 15 min à température ambiante avant d'être centrifugé 5 min à 18000 g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 350 µL d'éthanol 70% (v/v) sont ajoutés. Après avoir mélangé l'échantillon 3 à 4 fois par retournement, le tout est transféré dans une colonne du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) et centrifugé pendant 30 s à 11000 g. La suite de l'extraction est réalisée selon le protocole du fournisseur.

1.1.3.2. Extraction des ARN totaux bactériens

Les ARNs bactériens sont extraits à partir d'une culture en bouillon en milieu MOKA ou MME-glutamate. L'inoculum est calibré au spectrophotomètre à 0,1 de DO à 600nm puis ajusté à 1×10^7 bactéries/ml dans 80 ml de milieu. Après 72 h d'incubation à 28°C, la

suspension est mise à centrifuger 30 secondes à 14 000 g de sorte à obtenir un culot bactérien dense, qui est immédiatement congelé dans de l'azote liquide. 600 µL de trizol chaud sont ajoutés aux culots et incubés 5 min à 65°C en vortexant toutes les minutes. Après 5 minutes à température ambiante, une centrifugation de 5 minutes à 15°C à 2 500 rpm permet de précipiter les débris cellulaires. Un volume de 600 µL de surnageant est alors récupéré auquel est ajouté 120 µL de chloroforme, le mélange est vortexé 30 secondes et après une incubation de 2 min à température ambiante une nouvelle centrifugation de 15 min à 4°C à 12 000 g est réalisée. Un volume de 300 µL de la phase aqueuse sont ensuite récupérés dans un nouveau tube et mélangés à 250 µL d'isopropanol. Après 10 min d'incubation à température ambiante et une centrifugation de 20 min à 4°C à 12 000 g le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 500 µL d'éthanol 75% (v/v) froid. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'au traitement DNase. Le surnageant est éliminé après 5 min de centrifugation à 4°C à 7 500 g et le culot séché 10 min à température ambiante. Les culots d'acides nucléiques sont réhydratés avec 89 µL d'eau puis resuspendus après un passage de 5 min dans la glace. 10 µL de tampon DNase et 1 µL de DNase sont ajoutés à l'échantillon qui est alors mis à incuber 1 heure à 37°C. Afin d'inactiver la DNase le tube est ensuite mis à incuber 10 min à 75°C. Les ARNs ainsi extraits sont enfin conservés à -80°C dans 10 µL d'acétate de sodium et 275 µL d'éthanol 100%.

1.2. Analyse des acides nucléiques

1.2.1. Amplification par PCR conventionnelle d'ADN fongique

La matrice d'ADN ou d'ADNc est amplifiée dans un volume final de 50 µL contenant 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTP, Promega), 400 nM de chaque amorce, 1 unité de GoTaq (Promega), 10 mM de tampon de réaction (Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1,5 mM MgCl₂). Les conditions d'amplification sont les suivantes : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min suivie de 30 à 35 cycles et d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 15 min. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 95°C de 30 s, une étape d'hybridation des amorces de 50 s à température variable selon la nature des amorces, et une étape d'élongation à 72°C pendant un temps variable selon la taille attendue du produit amplifié.

La cassette de disruption utilisée pour la transformation d'*A. brassicicola* est obtenue grâce à trois étapes successives d'amplification réalisées avec une ADN polymérase haute

fidélité (Taq Phusion Finezyme) selon les indications du fournisseur.

1.2.2. Amplification par PCR conventionnelle d'ADN bactérien

L'amplification de la matrice ADN est réalisée dans un volume réactionnel final de 20 μ L constitué de 0,5 μ L de chaque amorce à 10 μ M, 1 μ L de dNTP à 2,5mM chacun, 4 μ L de tampon 5X et 0,08 μ L de GOTaq à 50 U/ μ L et 5 μ L de suspension bactérienne légèrement turbide préalablement bouillie 10 min. Le programme PCR utilisé est le suivant : une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation des amorces de 40 secondes à 60°C puis d'une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C. La PCR se termine par une étape d'élongation finale de 7 minutes à 72°C.

1.2.3. Electrophorèse sur gels d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus après PCR ou hydrolyse enzymatique sont séparés selon leur taille par électrophorèse dans du tampon TAE 0,5X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La migration s'effectue sous une tension de 100 V dans du tampon TAE 0,5X. Le gel est ensuite immergé dans un bain de bromure d'éthidium (BEt) à 0,5 μ g/ml pendant 15 min et les fragments amplifiés sont visibles par exposition du gel au rayonnement UV (310 nm).

1.2.4. Hydrolyse d'ADN par des endonucléases de restriction

L'analyse par restriction de l'ADN nécessite l'utilisation de différentes endonucléases, utilisées à raison de 2 à 5 unités par μ g d'ADN et selon les indications du fabricant.

1.2.5. Hybridation moléculaire par Southern-blot

Cette technique permet la détection de molécules d'ADN cibles dans une population d'ADN hétérogène. Les molécules d'ADN, préalablement digérées et séparées par électrophorèse sur gel d'agarose, sont transférées sur une membrane de nylon. Elles sont ensuite hybridées à une sonde d'ADN radioactive spécifique du fragment recherché.

1.2.5.1. Restriction de l'ADN génomique

Suite à une extraction d'ADN selon la méthode Moller, environ 2 µg d'ADNg sont digérés avec l'enzyme de restriction choisie pendant une nuit.

1.2.5.2. Transfert sur membrane de nylon

Après électrophorèse des fragments de restriction, l'ADN est dépuriné en immergeant le gel d'agarose dans une solution d'HCl 0,25 M pendant 10 min. Le gel est rincé rapidement à l'eau et immergé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M) (2 bains de 15 min), puis dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M ; Tris 0,5 M pH 7,0 ; EDTA 1 mM) (bains de 30 min chacun). Le transfert des fragments d'ADN vers une membrane de nylon (GeneScreen, NEN) est effectué sous vide en présence de SSC 5X (NaCl 0,75 M ; Citrate de sodium 75 mM) pendant 1 h. La membrane est séchée à l'air libre puis incubée 1 h à 80°C entre 2 papiers Whatmann. La membrane protégée peut ensuite être conservée à température ambiante.

1.2.5.3. Préparation des sondes radioactives

Le fragment d'ADN sélectionné pour servir de sonde est amplifié par PCR puis purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel). Cette sonde est marquée avec le kit « Rediprime II Random Prime Labelling System » (Amersham) par la technique de l'amorçage aléatoire (« random priming »). Des oligodéoxyribonucléotides (9-mers) s'hybrident à l'ADN dénaturé et servent d'amorces à l'ADN polymérase (fragment Klenow) afin de synthétiser le brin complémentaire en incorporant un nucléotide radioactif (($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP). Au mélange réactionnel contenant les dNTP (dATP, dTTP, dGTP), le fragment Klenow (7 à 12 unités) et les oligodéoxyribonucléotides sont ajoutés l'ADN (de 25 à 50 ng) préalablement dénaturé à 98°C pendant 5 min et 50 µCi d'($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP à 3000 Ci/mmol (NEN). Le mélange est incubé 1 h à 37°C. Les nucléotides non incorporés peuvent être éliminés par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Sephadex G-50 (ProbeQuant G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia biotech) conformément aux indications du fournisseur.

1.2.5.4. Hybridation et lavages

Les membranes sont préalablement imbibées dans une solution de SSPE 2X (NaCl 0,36 M ; NaH₂PO₄ 20 mM ; EDTA 2 mM pH 7,4) puis enroulées dans des drains de nylon et placées dans un tube à hybridation. Elles sont incubées 4 h à 65°C dans 15 ml de tampon de

préhybridation (SSPE 5X ; Denhardt 5X (Ficoll 0,1% (p/v) ; polyvinylpyrrolidone 0,1 % (p/v) ; BSA 0,1% (p/v) ; SDS 0,5% (p/v); 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé). L'hybridation est ensuite effectuée pendant une nuit à 65°C dans 15 ml de tampon d'hybridation. Ce dernier correspond au tampon de préhybridation auquel est ajouté la sonde radiomarquée préalablement dénaturée par chauffage. Après l'hybridation, les membranes sont lavées 2 fois pendant 15 min à 65°C dans deux solutions (SSPE 2X ; 0,5% SDS puis SSPE 0,2X ; SDS 0,5% (p/v)) dont la stringence augmente par diminution de la force ionique. Les membranes sont ensuite positionnées contre un écran (Kodak, Imaging Screen K, Bio Rad), qui est révélé (Molecular Imager FX, Bio Rad) après quelques minutes ou quelques heures d'exposition à température ambiante.

1.2.5.5. Déshybridation moléculaire

La déshybridation est effectuée en plongeant les membranes dans une solution bouillante de SDS 0,1% (p/v) et SSPE 0,1X jusqu'à leur refroidissement à température ambiante. Les membranes peuvent alors être utilisées pour de nouvelles hybridations.

1.2.6. Reverse transcription

Dans le cas des ARN d'*A. brassicicola*, avant l'étape de transcription reverse, 1,5 µg d'ARN totaux sont dénaturés pendant 3 min à 80°C dans un volume final de 9 µL. Les ARN sont ensuite reverse transcrits dans un mélange de 30 µL contenant 200 U de rétrotranscriptase du virus de la leucémie murine Moloney (M-MLV rétrotranscriptase, Promega), 400 nM d'amorce oligo(dT), 1 µM de random hexamères, 500 µM de dNTP en présence du tampon 1X de la rétrotranscriptase (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM et DTT 10 mM). La réaction enzymatique a lieu pendant 1h à 42°C. Les traces d'ARN sont éliminées en ajoutant de la RNase H. L'enzyme est ensuite dénaturée par chauffage à 80°C pendant 10 min.

Dans le cas des ARN de *X. campestris* pv. *campestris*, après lavage et séchage des culots d'ARN, ces derniers sont repris dans 20 µL d'eau puis dosés (Nanodrop). Avant la rétrotranscription, les échantillons sont calibrés à 1,5 µg d'ARN dans un volume final de 5µL auxquels sont ajoutés 15 µL d'amorces 11mer à 10 µM chacune. Le mélange est alors mis à incuber 10 minutes à 65°C puis 5 min dans la glace. La rétrotranscription est réalisée à 42°C pendant 1 h en ajoutant : 6 µL de tampon 5X, 8 µL de dNTP à 2,5 mM chacun et 0,2 µL de reverse transcriptase à 200 U/µL et 0,8 µL d'eau. Les ADNc ainsi synthétisés sont précipités

avec 3,5 μL d'AcNa à 3 M et 96,25 μL d'éthanol absolue puis conservés à -20°C . Afin de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique, une PCR est réalisée en utilisant des amorces spécifiques d'une région non codante de l'ADN.

1.2.7. Amplification d'ADNc par RT-PCR quantitative en temps réel sur des ADNc d'*A. brassicicola* et de *X. campestris* pv. *campestris*

La matrice d'ADNc ainsi obtenue est amplifiée par PCR en temps réel avec du SYBR Green (Applied Biosystems) et des amorces spécifiques des gènes cibles. Trois amplifications sont réalisées pour chaque échantillon et chaque couple d'amorces. Une moyenne des trois valeurs de C_T obtenues permet d'analyser le niveau de transcription de chacun de ces gènes. Cette analyse est effectuée par quantification relative en utilisant la méthode de calcul des $\Delta\Delta C_T$ (Winer *et al.*, 1999). L'amplification d'un ou plusieurs gène(s) référence (témoin endogène) est utilisée pour standardiser la quantité d'ADNc de chaque échantillon. Dans les études concernant *A. brassicicola* et *X. campestris* pv. *campestris*, le gène codant la tubuline puis d'autre part, les gènes *atpD*, *gyrB* et *rpoB* sont choisis en tant que référence de gène exprimé de manière constitutive. Le calcul des ΔC_T correspond à la différence entre la valeur moyenne de C_T obtenue pour le gène d'intérêt et la valeur moyenne obtenue pour le gène de référence exprimé constitutivement. Les valeurs de $\Delta\Delta C_T$ de chaque échantillon sont obtenues en faisant la différence avec la ΔC_T d'un échantillon de calibrage (le plus souvent, un échantillon témoin non traité). Avant d'utiliser la méthode de quantification en temps réel par calcul des $\Delta\Delta C_T$, il est nécessaire de démontrer que les efficacités des amplifications des gènes cibles et du gène référence sont similaires. Cette démonstration est effectuée par amplification d'une série de dilution d'ADNc matrice et le calcul de la pente de la droite : $\text{Log}(\text{quantité d'ADNc matrice})/\Delta C_T$. Le facteur d'induction (ou de répression) du gène cible dans l'échantillon traité par rapport à l'échantillon de calibrage est exprimé à l'aide de la formule « (efficacité du couple d'amorces) $^{-\Delta\Delta C_T}$ ». La quantité relative de transcrits dans chaque échantillon traité est alors exprimée par comparaison à l'échantillon calibre pour lequel la valeur 1 est attribuée. Les résultats obtenus par PCR quantitative ont fait l'objet d'une répétition technique. Au moins une répétition biologique est donc à envisager pour que les résultats fassent l'objet d'une analyse statistique dans le cas d'*A. brassicicola*. L'expression des gènes de *X. campestris* pv. *campestris* sont issus de trois répétitions biologiques.

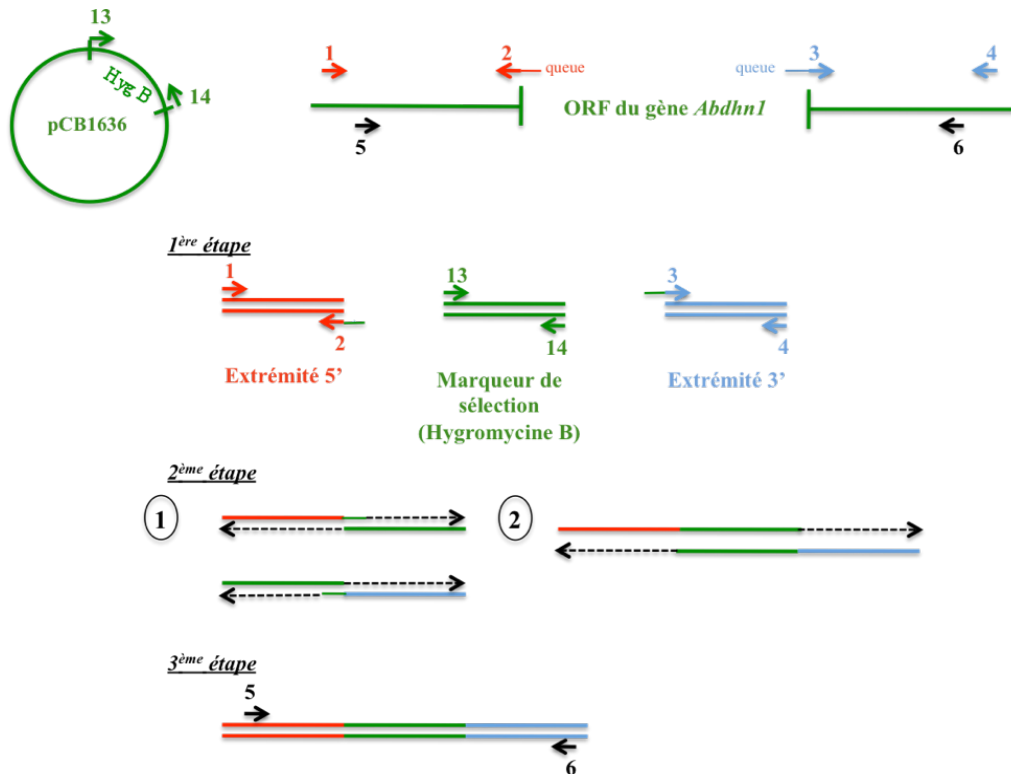


Figure 34. Représentation schématique de la construction de la cassette de remplacement par « double-joint » PCR (d'après Yu *et al.*, 2004). Les numéros correspondent aux amorces utilisées. La 1ère étape de PCR permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' du gène d'intérêt et le gène de résistance à l'hygromycine B. Les étapes de PCR 2 et 3 permettent d'assembler la cassette de remplacement.

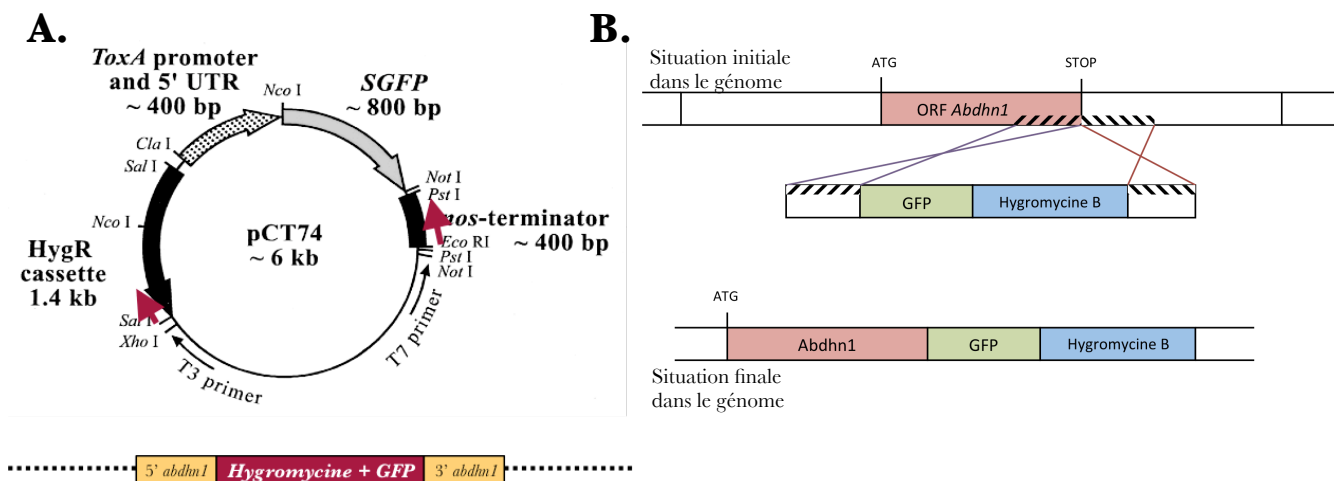


Figure 35. Schéma de construction des cassettes d'ADN permettant d'exprimer la GFP dans des souches d'*A. brassicicola*. **A.** Construction de la cassette de remplacement permettant d'exprimer constitutivement la GFP dans une souche sauvage d'*A. brassicicola*. Cette cassette remplacera par double crossing-over le gène *abdhn1*. **B.** Construction de la cassette d'ADN permettant de fusionner la GFP en partie C-terminale du gène d'intérêt. Les parties hachurées représentent les zones homologues permettant de cibler le double crossing-over.

1.3. Transformation génétique d'*A. brassicicola* : mutagénèse dirigée par délétion, fusion d'une protéine cible à la GFP, marquage stable d'un organe.

1.3.1. Obtention de la cassette de remplacement

La cassette de remplacement utilisée pour la transformation d'*A. brassicicola* est obtenue grâce à 3 étapes successives d'amplification par PCR (technique de « double joint PCR ») (Yu *et al.*, 2004). La première étape consiste à amplifier, d'une part les régions 5' et 3' bordant le gène d'intérêt à partir d'ADN génomique fongique, et d'autre part un gène de résistance au marqueur de sélection choisi (hygromycine B et nourseothricine dans le cas respectivement d'un simple et double mutant). L'amplification du gène de résistance à l'hygromycine B est réalisée à partir du plasmide pCB1636 et celle du gène de résistance à la nourseothricine à partir du plasmide pnr2. La deuxième étape permet de fusionner les trois produits PCR purifiés (extrémité 5', marqueur de sélection et extrémité 3') et ne nécessite pas d'amorce. En effet, les fragments 5' et 3' vont s'appareiller au gène du marqueur de sélection et jouent ainsi le rôle d'amorces. Le produit fusionné obtenu est amplifié lors de la troisième étape par utilisation d'amorces « nichées », situées aux extrémités du fragment (**Figure 34**).

L'expression constitutive de la protéine GFP chez *A. brassicicola* a été réalisée sur le même principe que la mutagénèse dirigée. Le gène *abdh1* a été choisi comme cible de mutation ; ses régions flanquantes 5' et 3' ont fusionnées à une cassette contenant le gène de résistance à l'hygromycine B et la GFP à partir du plasmide pct74 (**Figure 35A**).

En vue de fusionner un gène d'intérêt à la protéine fluorescente GFP et étudier la localisation subcellulaire de la protéine chimérique, le gène codant la GFP est disposé en phase avec le gène d'intérêt en position C-terminale. Le codon stop du gène d'intérêt est supprimé lors des premières étapes de fusion PCR. Les différents stades de la construction de cette cassette sont décrits dans la **Figure 35B**.

Dans l'optique de marquer spécifiquement les peroxysomes avec la protéine fluorescente DsRed rouge, une cassette est amplifiée à partir du plasmide pDsRED-SKL (**Figure 36**) et mise en contact directement avec les protoplastes. L'insertion de cette cassette est aléatoire dans le génome d'*A. brassicicola*.

Après purification, environ 10 µg du produit final sont utilisés pour la transformation du champignon.

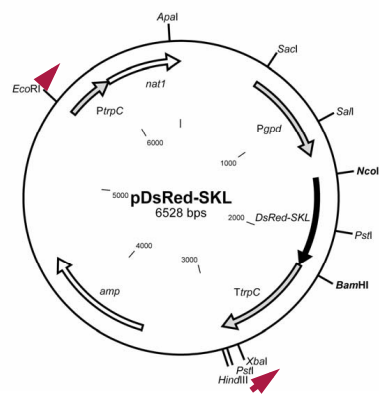


Figure 36. Carte de restriction partielle du vecteur pDsRed-SKL. La cassette de résistance à l'ampicilline est indiquée « *amp* » et peut être utilisée pour sélectionner des transformants d'*E. coli*. Le gène de résistance à la nourseothricine *natI* (flèche blanche) sous le contrôle du promoteur *trpC* d'*Aspergillus nidulans* peut être utilisé pour la sélection des transformants fongiques. Le gène codant la protéine DsRed-SKL (flèche noire) est régulé par le promoteur *gpd* et le terminateur *trpC* d'*A. nidulans*. Toutes les séquences des promoteurs et des terminateurs sont indiquées par des flèches grises. Les flèches rouge indiquent la position des amorces utilisées pour amplifier la cassette d'ADN nécessaire au marquage des peroxyssomes chez *Alternaria brassicicola*.

1.3.2. Préparation des protoplastes d'*A. brassicicola* selon Cho *et al.* (2006)

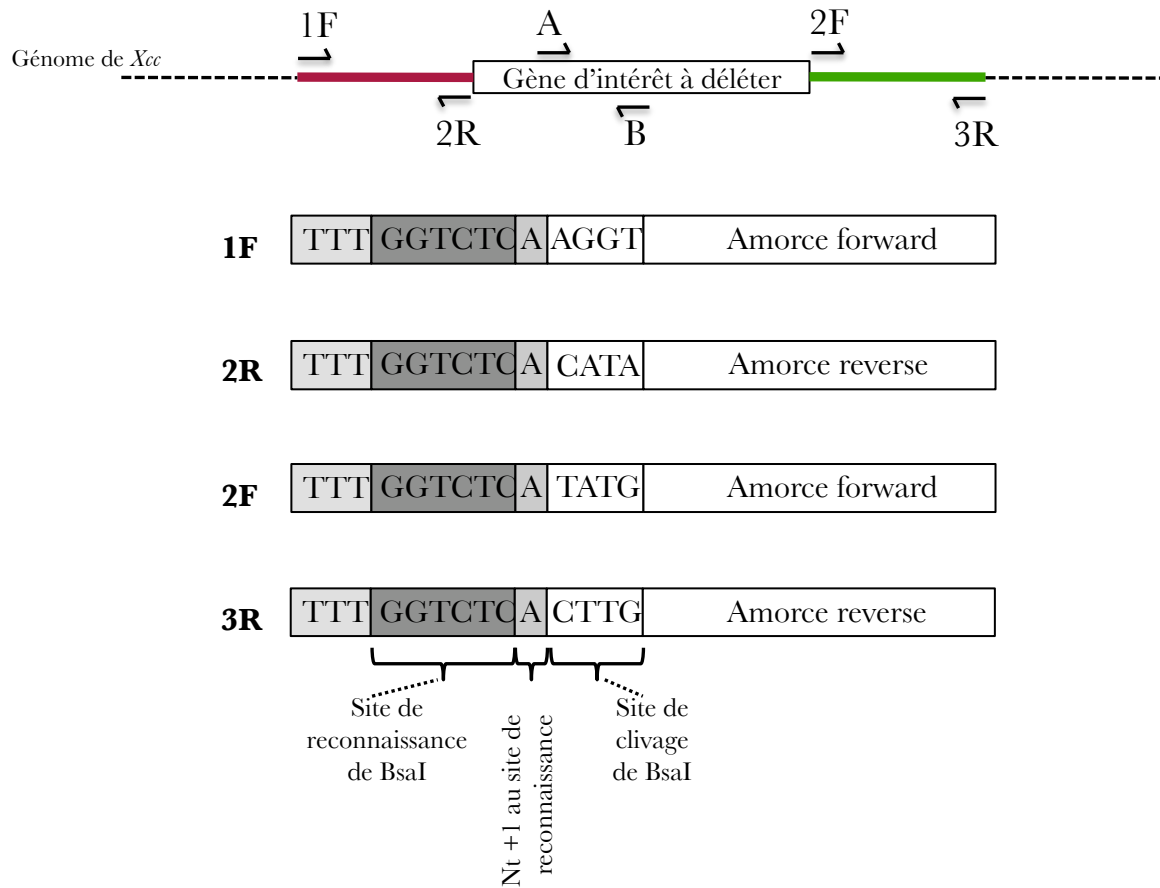
Les conidies, issues d'une culture gélosée d'*A. brassicicola* d'environ 15 jours, sont mises en suspension dans 3 mL de milieu PDB puis ajoutées à 200 mL de milieu PDB. Les cultures sont mises à incuber pendant 18 h à 24°C sous agitation (175 rpm). Les conidies germées sont ensuite récoltées par centrifugation (3200 g, 10 min) puis lavées à deux reprises dans une solution de NaCl 0,7 M. Un volume de 25 mL de solution enzymatique (NaCl 0,7M, Driselase (InterSpex,) 20 mg/mL, Kitalase 10 mg/mL (WAKO)) est ajouté. Après une incubation à 32°C pendant 4 h, puis des filtrations successives sur des membranes de maille 60 µm et 30 µm, le milieu est centrifugé (3200 g, 7 min). Le culot contenant les protoplastes est lavé une fois dans du NaCl 0,7 M puis à deux reprises avec du STC (sorbitol 1,2 M, Tris 10 mM pH 7,0, CaCl₂ 50 mM) dans les mêmes conditions que précédemment. La solution de protoplastes est calibrée à 1×10^7 - 1×10^8 protoplastes/mL à l'aide d'une cellule de Thoma.

1.3.3. Transformation d'*A. brassicicola*

Les protoplastes sont aliquotés (200 µL) dans des tubes de 12 mL. 10 à 20 µg d'ADN précédemment obtenus sont ajoutés et l'ensemble est mélangé avec précaution. Après une incubation de 20 min dans la glace, du PEG (Polyéthylène glycol (MW 3350-4000) 60% (p/v), Tris pH 7,5 10 mM, CaCl₂ 50 mM) est ajouté goutte à goutte en trois fois (200, 200 et 800 µL) avec 5 min d'incubation dans la glace entre chaque ajout. Une incubation finale de 20 min à température ambiante est effectuée après ajout d'1 mL de STC.

1.3.4. Régénération des protoplastes

Un volume de 400 µL de la suspension de protoplastes préalablement traitée est ajouté dans 15 mL de milieu de régénération maintenu en surfusion (extrait de levure 1 g/L, hydrolysate de caséine 1 g/L, eau 1 L, saccharose 342 g/L, agar 16 g/L) avant d'être coulé dans une boîte de Pétri. Celles-ci sont incubées à 25°C pendant 6 à 16 h. Le milieu est ensuite recouvert par 15 mL d'eau gélosée contenant l'agent de sélection à la concentration requise (hygromycine B et nouséothricine, respectivement à 12 µg/mL et 15 µg/mL). La culture est de nouveau incubée à 25°C jusqu'à l'apparition en surface de colonies fongiques. Chaque colonie est individuellement repiquée sur milieu PDA contenant l'agent de sélection puis monosporée sur un nouveau milieu. L'insertion de la cassette au locus ciblé et en copie unique est vérifiée à la fois par PCR et par Southern-blot.



A : amorce interne au gène à déléter pour vérifier l'absence d'amplification après les étapes de mutagenèse

B : amorce interne au gène à déléter pour vérifier l'absence d'amplification après les étapes de mutagenèse

Figure 37. Dessin et localisation des amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée chez *X. campestris* pv. *campestris*. Les régions 5' et 3' amplifiées par PCR ont une taille comprise entre 350 et 600 pb.

1.4. Mutagenèse dirigée par délétion chez *Xcc* ATCC33913

La technique de mutagenèse dirigée par délétion utilisée est la technique « sacB » (Pelicic *et al.*, 1996 ; Engler *et al.*, 2008 ; Logue *et al.*, 2009) qui consiste à déléter un gène par double recombinaison homologue.

1.4.1. Amplification par PCR des régions amont (5') et aval (3') du gène cible

Deux couples d'amorces sont dessinés de manière à amplifier des fragments de 350 à 600 bp de part et d'autre du gène à déléter (**Figure 37**). Les couples d'amorces sont validés *in silico* grâce au logiciel Amplify version 3.1.4 (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>).

Les régions flanquantes du gène à déléter sont amplifiées par PCR avec le programme suivant : 5 min à 94°C suivies de 35 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à la température d'hybridation et un temps d'élongation à 72°C (1 min/kb) et 5 min à 72°C. Le mélange réactionnel (50 µL) contient 200 nM de chaque amorce (Eurogentec) ; 200 µM de dNTPs ; 1 U de Taq Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) et 10 µL de tampon correspondant ; 5 µL de suspension bactérienne légèrement turbide préalablement bouillie 10 min. Après amplification, la taille des fragments obtenus est vérifiée par migration sur un gel d'agarose à 1,5 %. Les produits de PCR sont ensuite purifiés grâce au kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

1.4.2. Digestion, ligation et transformation d'*E. coli*

Les régions 5' et 3' amplifiées sont ensuite digérées et insérées dans le plasmide pΔ13 (**Figure 38**) en mélangeant, dans un volume final de 10 µL, 50 ng de chaque fragment 5' et 3' avec 25 ng de plasmide pΔ13, 100 ng de BSA (Promega), 5 U de l'enzyme de restriction BsaI (Fermentas) et 2,5 U de T4 DNA ligase (Promega) dans le tampon de ligation correspondant. La digestion-ligation s'effectue pendant 1 h à 37°C (digestion, ligation) suivie de 10 min à 55°C (pour limiter l'adhésion de BsaI aux surfaces et la stabiliser). Les réactions sont stoppées par 5 min d'incubation à 80°C et les échantillons refroidis 5 min à 20°C.

Le plasmide construit est introduit dans une souche d'*E. coli* DH5α thermo-compétente (Hanahan, 1983) (**Figure 38**). Pour cela, le produit de ligation est mis en contact avec 50 µL de bactéries thermo-compétentes. Après 20 min dans la glace, un choc thermique est appliqué à 42°C pendant exactement 50 s suivi de 2 min dans la glace. Ensuite, 950 µL de LB sont ajoutés et le mélange est incubé 1 h 30 à 37°C sous agitation légère pour permettre

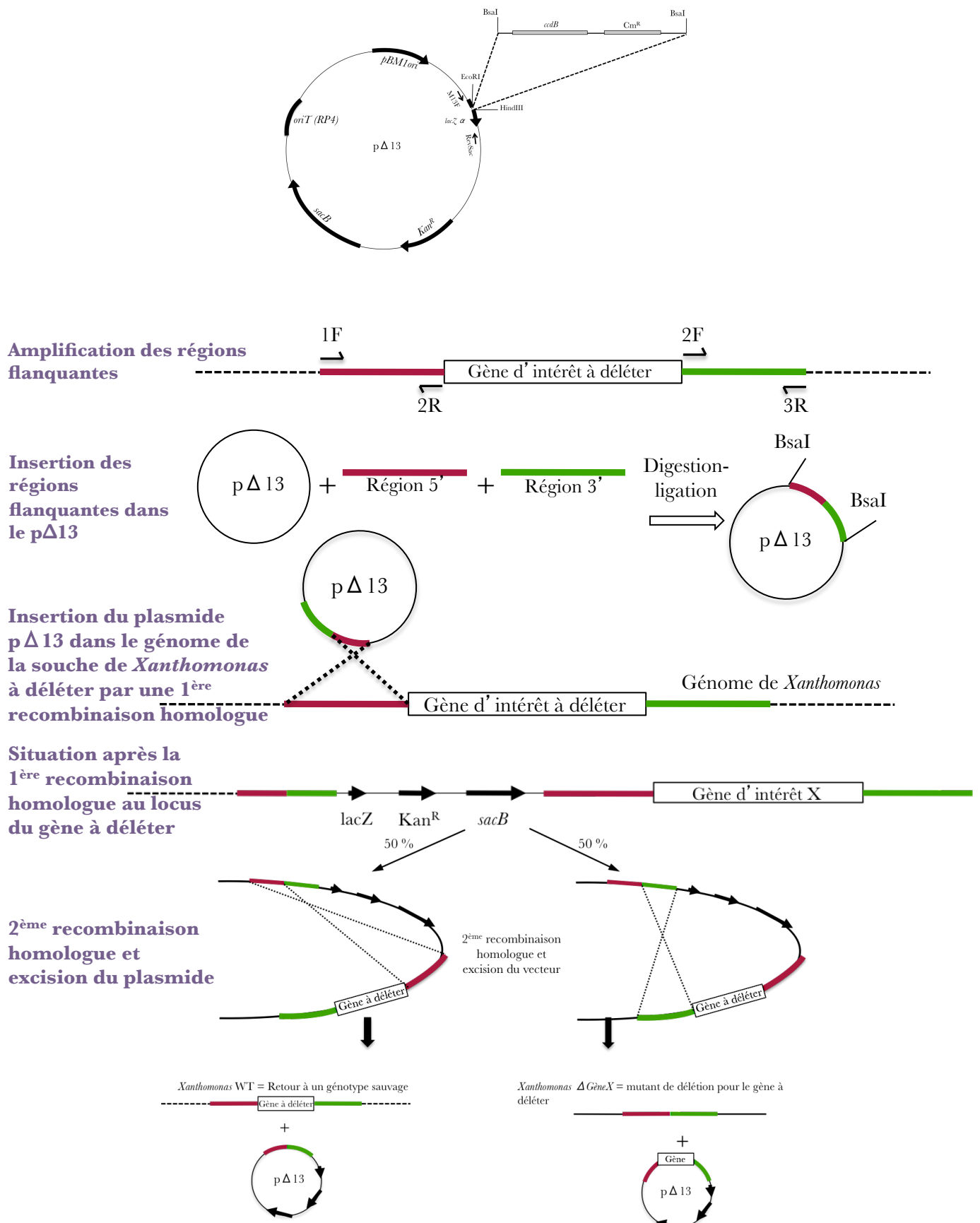


Figure 38. Organisation de la mutagenèse dirigée par déletion utilisant le gène *sacB*. Amplification par PCR des régions flanquantes 5' et 3' du gène à déléter. Insertion des régions flanquantes 5' et 3' dans le plasmide pΔ13. Recombinaisons homologues pour retrouver un génotype sauvage ou construire un génotype mutant.

l'expression phénotypique du gène de résistance à la kanamycine. Après centrifugation 10 min à 5000 g, le culot est repris dans 100 μ L et étalé sur LB-Kan pour une incubation 24 h à 37°C. Les transformants sont vérifiés par PCR sur colonie selon le régime thermique temporel suivant : 5 min à 94°C ; suivi de 30 cycles de 30 s à 94°C, 40 s à 52°C et 1 min 30 à 72°C ; pour finir 5 min à 72°C avec les amorces M13F et RevSac. Le mélange réactionnel de la PCR (20 μ L) contient 0,125 μ M de chaque amorce; 200 μ M de dNTPs; 4 μ L de tampon GoTaq 5X ; 0,4 U de GoTaq et l'ADN cible (une « pointe » de colonie). Les tailles théoriques sont ensuite vérifiées par migration en gel d'agarose 1,5 % (p/v). Une extraction plasmidique (kit QIAprep Spin miniprep Qiagen©) est ensuite réalisée. Deux vérifications sont faites, la première, par digestion dans 20 μ L de 1 μ g de plasmide par 6 U d'EcoRI (Promega) et 10 U de HindIII (NEB) en tampon NEB adapté, 2 h à 37°C. Les tailles des produits de digestion sont vérifiées sur gel d'agarose 1,5 % (p/v). Si ce premier résultat est concordant, les plasmides sont envoyés à séquencer (Genoscreen, France) avec les amorces universelles M13F et M13rev pour définitivement valider la transformation et continuer les étapes suivantes de la mutagénèse.

1.4.3. Conjugaison triparentale et recombinaison homologue

Trois souches différentes sont mises en contact : (i) *E. coli* précédemment transformée contenant le plasmide avec l'insert, (ii) *E. coli* contenant le plasmide pRK600 contenant les gènes *tra* codant la formation de pilus conjugatif pour aider le transfert du plasmide avec insert vers la bactérie à muter, (iii) la souche de *Xanthomonas* à muter. Pour cela, respectivement 1 mL, 1 mL et 2 mL sont centrifugés 5 min à 5000 g. Le culot est repris dans 600 μ L de milieu MOKA. Puis, respectivement 30 μ L, 30 μ L et 60 μ L sont mélangés dans un tube et déposés en une goutte sur MOKA incubée toute la nuit à 28°C pour le transfert du plasmide contenant l'insert dans la souche de *Xanthomonas* à muter. La recombinaison homologue entre le plasmide et le génome peut alors se faire (**Figure 38**). Après 24 h, la culture est reprise dans 1 mL d'eau, centrifugée 5 min à 8000 g, le surnageant est éliminé et le culot étalé sur MOKA Rifp-Kan pour 3 jours d'incubation à 28°C.

1.4.4. Sélection et vérification des mutants de délétion

Les clones issus de MOKA Rifp-Kan sont, en parallèle, repiqués sur MOKA Rifp-Kan-Sac et sur MOKA Rifp-Kan. Après 24 h à 28°C, 3 clones sensibles au saccharose (Sac^S) et résistants à la Kan (Kan^R) sont sélectionnés et mis en culture liquide MOKA Rifp (excision du

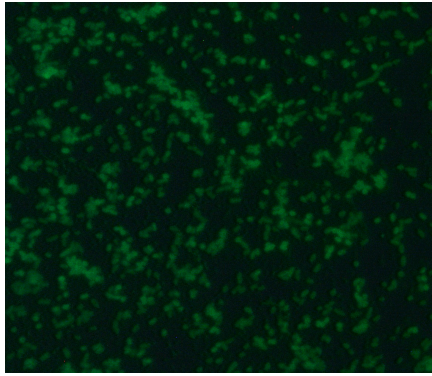


Figure 39. Photo de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 exprimant constitutivement la GFP observé en microscopie photonique à fluorescence (x 600).

plasmide). Après 24 h à 28°C sous agitation continue, 100 µL des dilutions 10⁻¹ et 10⁻² sont étalés sur MOKA Rifp-Sac et incubés à 28°C. Ensuite, les clones Sac^R sont repiqués en parallèle sur MOKA Rifp-Kan et MOKA Rifp à 28°C. Trente clones Sac^R et Kan^S sont sélectionnés et une PCR de vérification est faite avec les amorces 1F/3R pour vérifier le différentiel de taille entre le mutant potentiel et le parent, ainsi qu'avec une autre paire d'amorces F/R dessinée dans le gène à muter (**Figure 38**), pour vérifier si le gène cible est présent (souche sauvage) ou absent (souche mutante). Le mélange réactionnel de la PCR, sauf les amorces, est similaire à celui utilisé pour vérifier le plasmide recombinant et le régime thermique temporel similaire à celui utilisé pour amplifier les séquences flanquantes. La taille des produits d'amplification est vérifiée sur gel d'agarose à 1,5 % (p/v) et les produits PCR affectés par la délétion potentielle sont envoyés à séquencer pour confirmation.

1.4.5. Construction d'une souche de *X. campestris* pv. *campestris* exprimant constitutivement la GFP

Le plasmide *pufZ75* (Zhang *et al.*, 2009) a été introduit, par conjugaison triparentale (méthode décrite dans le paragraphe 1.4.3), dans une souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. Ainsi, celle-ci émet une forte fluorescence constitutive ce qui permet d'observer aisément la souche avec un microscope à fluorescence (**Figure 39**).

1.4.6. Absence d'effet pléiotrope : croissance des mutants de délétion

La croissance de trois clones supposés issus de trois événements indépendants de mutagenèse est analysée pour montrer l'absence d'effet pléiotrope de la mutation introduite. La croissance est analysée en milieu appauvri (TSB 10 % (p/v)) en plaque de microtitration. Chaque puits contenant 315 µL de TSB 10 % (p/v) est inoculé avec 35 µL d'une suspension à 1×10⁸ ufc/mL (0,1 de DO_{600 nm}). Les plaques sont incubées à 28°C sous agitation (120 rpm) pendant 48 h. La lecture de la DO est programmée toutes les 2 h.

2. Méthodes de phénotypage des mutants *in vitro*

2.1. Survie des bactéries *in vitro* en microcosmes

Des papiers Whatman 3M (8 mm × 10 mm = 80 mm²) (appelés par la suite « microcosmes ») sont inoculés avec 100 µL d'une suspension bactérienne calibrée à

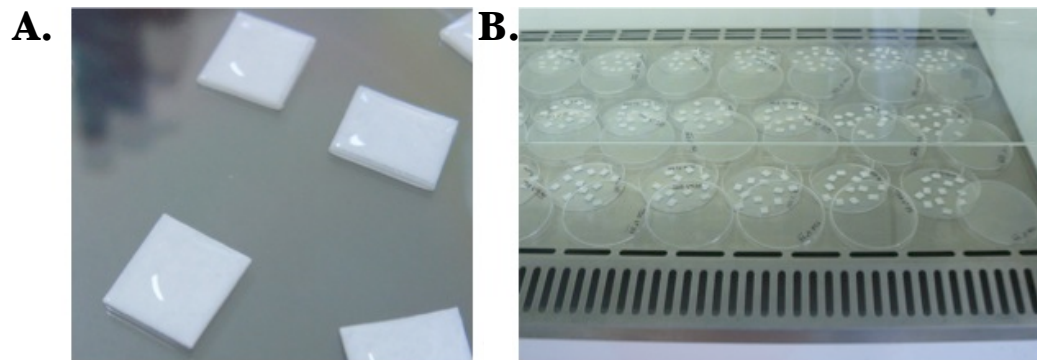


Figure 40. Mise en place de l'expérience de conservation *in vitro* sur papiers buvard. **A.** Papiers Whatman 3M inoculés avec 100 μL d'une suspension bactérienne calibrée à 1×10^7 ufc/mL. **B.** Séchage sous hôte à flux vertical des papiers buvard inoculés.

1×10^7 /mL dans du milieu TSB à 10% (p/v). Les papiers sont ensuite séchés pendant 2 h sous une hotte à flux laminaire (**Figure 40**). Deux températures de conservation sont testées lors de cette expérience : 4°C et 25°C. Les papiers sont ensuite disposés dans des boîtes de Petri stériles et celles-ci sont disposées aux températures souhaitées. L'expérience combine à la fois l'étude de l'effet des températures sur la capacité de conservation de *X campestris* pv. *campestris* et la durée de conservation. A chaque temps d'analyse, trois papiers sont analysés par souche et par température. Ils sont mis à macérer pendant 1h30 dans 1 mL d'H₂O stérile à 28°C. Les macérats sont analysés par dilution et dépôt de gouttes sur du TSA 10% avec l'antibiotique approprié. Un papier est l'unité d'échantillonnage et trois papiers sont analysés de manière indépendante pour chaque condition.

2.2. Survie des bactéries sur des graines d'*A. thaliana*

L'unité d'échantillonnage est représentée par 25 mg de graines d'*A. thaliana* (soit environ 800 graines). A chaque temps d'analyse, trois échantillons sont analysés par condition. La première étape consiste à inoculer les graines par infiltration. Chaque échantillon de 25 mg est mis à imbiber 27 min dans 1 mL d'inoculum calibré à 1×10^7 ufc/mL puis il est placé dans une pompe à vide dans laquelle le vide est appliqué pendant 3 min. Les graines sont ensuite placées sur un papier absorbant stérile et mises à sécher pendant 1 h sous une hotte à flux laminaire. Enfin, les graines sont disposées dans du papier de germination stérile avant d'être conservées soit à 4°C soit à 25°C. Les échantillons sont ensuite prélevés au fur et à mesure, à chaque temps d'analyse. Les graines sont mises à macérer 4 h à 4°C sous agitation. Les macérats sont ensuite analysés par dilution et dépôt de gouttes afin de dénombrer les populations bactériennes associées à chaque échantillon.

2.3. Adhésion des souches bactériennes en plaques de polypropylène

Dix microlitres d'une suspension bactérienne à 1×10^7 ufc/mL sont inoculés dans 190 μ L de milieu MME par puits en plaque de polypropylène de 96 puits. Après 4 jours de culture statique à 28°C, le surnageant est transféré dans une plaque de microtitration et la DO est lue (lecteur de plaque μ quant™, Bio-Tek Instruments, Inc., USA) à 600 nm afin de vérifier la croissance des bactéries. La plaque de polypropylène (PP) est ensuite rincée délicatement à l'eau distillée puis, 200 μ L d'une solution de cristal violet (CV) 1 % (p/v) sont ajoutés par puits. Après 15 min, la plaque de PP est rincée 3 fois à l'eau distillée et 200 μ L

d'éthanol à 95 % (v/v) sont rajoutés dans chaque puits afin de solubiliser le CV. Pour finir, les 200 µL sont transférés en plaque de microtitration à fond plat afin de lire la DO à 600 nm pour estimer la quantité de cellules adhérentes. Trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon (O'Tolle *et al.*, 2000 ; Finelli *et al.*, 2003).

2.4. Mesure de la croissance radiale mycélienne

Les solutions contenant les différents composés testés sont incorporées au milieu PDA encore en fusion et le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri. Pour chaque test, trois répétitions sont réalisées. A partir d'une culture fongique âgée d'une semaine, des disques mycéliens de 8 mm de diamètre sont prélevés et déposés au milieu de chaque boîte de culture supplémentée ou non. La croissance mycélienne est évaluée au bout de 10 à 15 jours d'incubation à 24°C. Des pourcentages d'inhibition de la croissance radiale due à la présence d'un composé sont ensuite calculés par rapport à la boîte témoin (milieu non supplémenté).

2.5. Mesure des phases précoces de croissance d'*A. brassicicola* par néphélométrie

La néphélométrie est utilisée pour mesurer la croissance fongique dès les premiers stades du développement fongique: la germination de la conidie, l'élongation et la ramification des hyphes (Joubert *et al.*, 2010). C'est une technique de mesure du trouble qui prend en compte les particules dans la totalité du milieu de culture. Un récepteur comptabilise les rayons laser déviés et les traduit en RNU, unité arbitraire néphélométrique, proportionnelle à la concentration en particule du soluté. Une analyse cinétique de la croissance fongique sur 33 h permet d'obtenir une courbe de croissance représentative du développement du champignon. Les analyses sont effectuées sur une microplaque de 96 puits (Greiner). 300 µL de PDB supplémenté selon l'étude sont inoculés avec des conidies âgées de 15 jours à une concentration de 1×10^5 conidies/mL. La culture se fait à 24°C sous agitation à 175 rpm pendant 5 min puis au repos les 5 min suivantes. Les mesures sont prises toutes les 10 min, après agitation. Une matrice de traitement des résultats a été construite sous Excel pour normaliser les données brutes et les traduire en graphique.

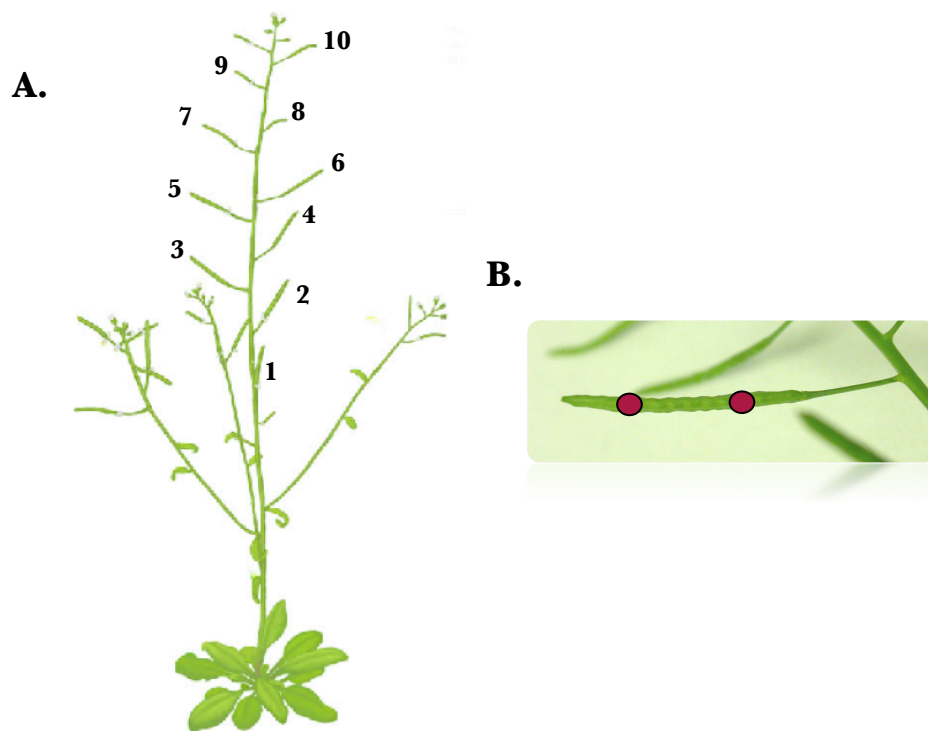


Figure 41. **A.** Représentation schématique de la nomenclature adoptée pour la numérotation des siliques lors de l'inoculation par dépôt de gouttes d'une suspension de conidies d'*A. brassicicola* sur les siliques d'*A. thaliana*. **B.** Localisation des deux gouttes de la suspension de conidies d'*A. brassicicola* sur une silique d'*A. thaliana*.

2.6. Conservation des conidies d'*A. brassicicola* à l'état sec

Une suspension de conidies de chacune des souches est calibrée à 1×10^6 conidies/mL dans l'eau stérile puis diluée au 1/10^{ème} pour obtenir une concentration finale de 1×10^5 conidies/mL dans 1mL d'H₂O (constituant un échantillon). Chaque échantillon est centrifugé 4 min à 11 000g puis le culot de conidies est séché pendant 5 min au speed-vac. Les échantillons sont ensuite mis en conservation dans une boîte hermétique contenant du dessicant. A chaque point d'analyse, les conidies de chaque échantillon sont réhydratées dans 100 μ L d'H₂O stérile. Une série de dilutions est réalisée pour obtenir des concentrations théoriques de 1×10^4 , 1×10^3 et 1×10^2 conidies/mL dans 100 μ L d'H₂O stérile. Ces suspensions sont ensuite étalées sur un milieu PDA sans pression de sélection. Les spores germées sont comptabilisées au bout de deux jours de croissance. Pour chaque condition, cinq répétitions techniques sont réalisées.

3. Méthodes de phénotypage des mutants *in planta*

3.1. Méthodologie de mise en place du pathosystème fongique

3.1.1. Par voie florale

Cette voie de transmission a été testée en inoculant des boutons floraux d'*A. thaliana* Ler au stade 13/14 de la floraison (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) en déposant une goutte de 5 μ L d'une suspension de conidies d'*A. brassicicola*. La concentration de celle-ci a été ajustée soit à 1×10^4 soit à 1×10^5 conidies/mL. Les plantes sont ensuite maintenues à humidité saturante pendant deux jours à l'obscurité. Le développement de la plante et du champignon est contrôlé six et quatorze jours après l'inoculation.

3.1.2. Par voie indirecte de contact avec le fruit

Les plantes (écotype Ler) inoculées sont âgées d'environ un mois et possèdent 10 (ou 20 pour la détermination de l'influence du stade de développement de la plante sur la probabilité d'infection des graines) siliques. Les siliques sont numérotées arbitrairement de 1 (la silique la plus vieille, à la base de la plante) jusqu'à 10 (la silique la plus jeune au moment de l'inoculation) (**Figure 41A**). Deux gouttes de 2,5 μ L d'une suspension de conidies d'*A. brassicicola* calibrée à 1×10^5 conidies/mL dans de l'eau stérile, et additionnée de Tween 20



Figure 42. Stades d'inoculation d'*A. thaliana* au stade bouton floral avec une suspension bactérienne dans le but d'évaluer la capacité de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* aux graines d'*A. thaliana* par voie florale.

à 0,01% (v/v), sont placées sur chacune des 10 siliques les plus jeunes de la manière suivante: une goutte à la base et une goutte au milieu de la silique (**Figure 41B**). Les plantes sont ensuite maintenues à humidité saturante pendant deux jours à l'obscurité. Trois plantes, au minimum, sont inoculées par génotype de plante ou de champignon et l'expérience est répétée au moins deux fois. Dans toutes les expérimentations, les dix siliques les plus jeunes d'une plante témoin sont inoculées avec une solution d'eau additionnée de Tween 20 à 0,01 % (v/v).

Les siliques inoculées sont récoltées dix jours après l'inoculation (ou 20 jours après l'inoculation pour la détermination de l'influence de la date de récolte sur la probabilité d'infection des graines). Toutes les siliques sont disséquées avec des pinces stériles et les graines sont récoltées avec précaution en évitant le contact entre les graines et les surfaces externes des siliques. Les graines sont mises à incuber de manière séparée sur un milieu favorable au champignon (PDA) pendant deux jours. Une graine est considérée comme infectée lorsqu'une colonie fongique typique d'*A. brassicicola* se développe à partir de la graine. Les premiers essais ont permis de démontrer que la probabilité d'infection des graines issues des siliques n°6 à n°10 est faible. Ainsi, les expériences de phénotypage de mutants ont été réalisées en inoculant uniquement les siliques n°1 à n°5.

3.2. Méthodologie de mise en place du pathosystème bactérien

3.2.1. Par voie florale

Des plantes d'*A. thaliana* (écotype Sf-2) au stade bouton floral 13/14 (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) (**Figure 42**) sont inoculées par dépôt d'un inoculum bactérien sous forme de gouttes. Une suspension bactérienne calibrée à 1×10^6 ufc/mL, 1×10^7 ufc/mL ou 1×10^8 ufc/mL dans de l'eau stérile est déposée à raison de 10 μ L sur chacune des fleurs de chaque inflorescence. La plante au moment de l'inoculation doit porter 3 étages de boutons floraux. Les plantes sont maintenues pendant 24 h dans une atmosphère saturée en humidité.

3.2.2. Par voie vasculaire

3.2.2.1. Injection d'un inoculum bactérien dans des feuilles d'une rosette d'*A. thaliana*

Les plantes sont inoculées au stade rosette (1 mois de culture) par piqûre de 4 ou 6 feuilles par plante avec une aiguille préalablement trempée dans une suspension bactérienne

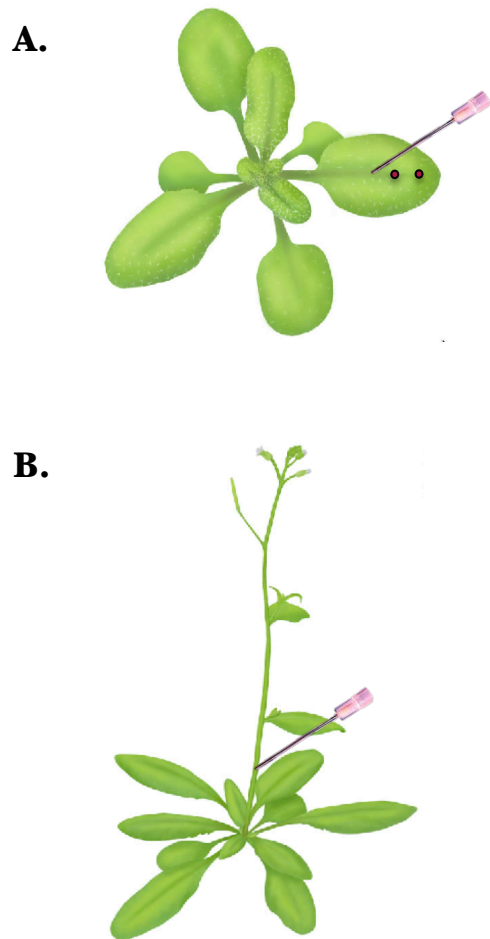


Figure 43. Stades d'inoculation d'*A. thaliana* aux stades **A.** « rosette » et **B.** « hampe florale » avec une suspension bactérienne dans le but d'évaluer la capacité de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* aux graines d'*A. thaliana* par voie vasculaire.

calibrée à 1×10^6 ufc/mL, 1×10^7 ufc/mL, 1×10^8 ufc/mL. Trois piqûres distinctes sont réalisées dans la nervure centrale, sur une même feuille, du centre vers l'extrémité apicale de la feuille (**Figure 43A**). Les plantes sont maintenues pendant 24 h dans une atmosphère saturée en humidité.

3.2.2.2. Injection de l'inoculum dans la hampe florale d'*A. thaliana*

Cette dernière méthode d'inoculation nécessite des plantes d'*A. thaliana* au stade hampe florale. Des suspensions bactériennes sont calibrées à 1×10^6 ufc/mL, 1×10^7 ufc/mL, 1×10^8 ufc/mL à partir d'une culture sur boîte de *Xcc* fraîchement repiquée. Une aiguille, préalablement trempée dans l'inoculum bactérien, sert à traverser une hampe florale de part en part afin d'injecter l'inoculum dans cette dernière (**Figure 43B**). Les plantes sont maintenues pendant 24 h dans une atmosphère saturée en humidité. Dix-huit plantes sont inoculées pour chacune des souches inoculées.

Quelle que soit la méthode d'inoculation, la récolte a généralement lieu cinq à six semaines après l'inoculation. La plante est alors sénescente mais la récolte a lieu avant que les siliques ne s'ouvrent par déhiscence. L'ensemble de la plante est récolté. Les graines et les valves des siliques sont séparées par des étapes de tamisage successives. Ainsi, une analyse bactériologique est réalisée sur la hampe florale dépourvue de toutes siliques, les valves des siliques et les graines après avoir relevé l'ensemble des poids frais de tous les organes. Les hampes florales et les valves des siliques sont broyées (Stomacher 80 Laboratory Blender, Seward) dans 5 mL d'eau stérile et les graines sont mises à macérer dans le même volume d'eau stérile pendant 4 h à 4°C. Un dénombrement bactérien est effectué par dilutions et étalement des produits de broyage et de macération.

3.3. Tests de pouvoir pathogène de *X. campestris* pv. *campestris* et ses mutants

Les souches sont sorties du congélateur à -80°C sur milieu TSA 10% (p/v) additionné d'antibiotiques. Après 48 h de croissance à 28°C, elles serviront à ensemercer des cultures liquides en milieu riche MOKA pendant 16 heures, sous agitation. Deux millilitres de ces cultures sont centrifugés 4 min à 10 000 rpm. Les culots sont repris dans 1 mL d'H₂O stérile, vortexés puis centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment. Les culots sont à

nouveau repris dans 1 mL d'H₂O stérile et les suspensions calibrées à une DO_{600nm} = 0,05. Une aiguille est trempée dans cette solution bactérienne et des feuilles d'arabette, âgées d'un mois, sont ensuite percées avec cette aiguille en trois points au niveau de la nervure centrale. Quatre plantes par souche et 4 feuilles par plante sont inoculées. Les plantes sont maintenues pendant 48 h dans une atmosphère saturée en hygrométrie. L'apparition des symptômes est observée à 5, 6, 7 et 9 jours après l'inoculation. Selon l'ampleur des symptômes, une note située entre 0 et 4 est attribuée à chaque feuille inoculée selon l'index de maladie suivant : **0** = rien ; **0,5** = petite tache chlorotique vert pâle ; **1** = petite tache chlorotique franche, bien jaune, localisée au point d'inoculation ; **1,5** = tache chlorotique jaune un peu étendue ; **2** = tache chlorotique jaune recouvrant 2 points d'inoculation ; **2,5** = tache chlorotique jaune très étendue (absence de nécrose) ; **3** = présence d'une nécrose, mais les symptômes ne dépassent pas les 3 points d'inoculation ; **3,5** = présence d'une nécrose, avec des symptômes qui sont étendus et dépassent les 3 points d'inoculation, donc dépassent le milieu de la feuille vers le pétiole ; **4** = les symptômes envahissent la totalité de la surface de la feuille qui est souvent complètement flétrie.

3.4. Tests de pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*

A partir de cultures sur boîtes d'*A. brassicicola* âgées de 7 jours, une suspension de conidies est préparée dans de l'eau stérile et ajustée à différentes concentrations (1×10^5 spores/mL, 1×10^4 spores/mL et 1×10^3 spores/mL) pour tester l'agressivité des souches. Les feuilles des plantes de *B. oleracea* âgées de quinze jours sont inoculées en déposant trois gouttes de 5 µL de la solution de spores. Après l'inoculation, les plantes sont conservées à l'intérieur des enceintes climatiques dans les mêmes conditions de croissance que les plantes saines avec une humidité relative saturante. L'obscurité est maintenue pendant 48 h après l'inoculation.

3.5. Tests de réaction d'hypersensibilité sur tabac

Une suspension est calibrée à 1×10^7 ufc/mL et infiltrée à l'aide d'une seringue sans aiguille après éraflure superficielle du limbe en face inférieure des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum* et *N. benthamiana*). Les lectures sont faites dès 24 h après l'infiltration.

3.6. Internalisation des mutants de *Xcc in planta* sur *A. thaliana*

Des plantes d'*A. thaliana* (écotype Sf-2), au stade rosette, sont inoculées avec une suspension de *X. campestris* pv. *campestris* calibrée à 1×10^7 ufc/mL. Les feuilles inoculées sont préalablement marquées individuellement avec une étiquette d'horloger. L'inoculation consiste à percer la nervure centrale d'une feuille d'*A. thaliana* avec une aiguille et de déposer sur chacune des blessures une goutte de 5 μ L d'inoculum. Cinq feuilles, issues de cinq plantes différentes, sont analysées de manière indépendante pour chaque condition. Les feuilles sont ensuite prélevées 4 h après l'inoculation, puis 1, 4 et 7 jours après l'inoculation. Une décontamination de la surface externe des feuilles par des vapeurs de chloroforme (3 min dans une boîte de $0,37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ dont l'ambiance est saturée en chloroforme par dépôt de 1 mL de chloroforme sur un papier filtre) permet d'analyser les populations bactériennes internalisées. Les feuilles sont ensuite broyées dans 500 μ L d'eau stérile puis un dénombrement bactérien par dilutions-étalements est réalisé pour chaque échantillon.

4. Méthodes d'analyse par microscopie

4.1. Observations de graines et de valves de siliques en microscopie électronique à balayage

Lors de la récolte, les tissus des graines et des valves de siliques sont fixés par incubation dans une solution de glutaraldéhyde à 4% (v/v) dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,2. Le matériel est maintenu dans ces conditions à 4°C sous vide durant une demi-journée. La solution de fixation est ensuite renouvelée, et les échantillons sont placés une nuit à 4°C. Cette solution est remplacée par du tampon phosphate 100 mM pH 7,2 et les échantillons sont ainsi conservés à 4°C jusqu'à remplacement du tampon par une solution de tétraoxyde d'osmium 2% (v/v), et maintenus 2 h à l'obscurité. Pour la déshydratation, les échantillons sont d'abord rincés 3 fois pendant 5 min dans de l'eau distillée, puis déshydratés par des bains successifs de 20 min dans des solutions de concentration croissante en éthanol : 50% (v/v), 70% (v/v), 95% (v/v) puis 100% (v/v). Ce dernier bain est effectué 3 fois. Pour la dessiccation, les échantillons sont placés dans un appareil à point critique (Baltec CPD 030). Ils subissent 2 bains de 15 min à l'acétone puis plusieurs lavages au CO₂ liquide. Lorsque la teneur en CO₂ atteint 100%, la température est augmentée jusqu'à 32°C. En parallèle, la pression augmente jusqu'à 75 bars pour atteindre le point critique. La pression est ensuite diminuée progressivement tout en maintenant la température à 32°C. Les échantillons desséchés sont déposés sur des plots

métalliques recouverts d'un scotch carbone conducteur. Les plots sont ensuite placés sous vide à 5.10^{-2} Pa dans l'enceinte d'un métalliseur (Baltec MED020). L'enceinte est ensuite parcourue par un courant électrique qui permet de recouvrir les échantillons d'une fine couche de microparticules d'or expulsées d'une cathode à or. Les échantillons peuvent ensuite être observés à une tension d'accélération de 3kV à l'aide d'un microscope électronique à balayage (JSM 6301 F, Jeol, Tokyo, Japon) relié à un système de prise de vue (SemAfore, Jeol, Tokyo, Japon).

4.2. Observations de graines contaminées par *A. brassicicola* en microscopie photonique à épifluorescence

Des siliques d'*A. thaliana* sont inoculées avec une souche d'*A. brassicicola* exprimant constitutivement la protéine GFP. Les graines et les valves des siliques sont observées sans préparation sous une loupe à fluorescence possédant un filtre GFP-FITC (excitation à 490 nm, émission à 520 nm) (SZX16, Olympus).

4.3. Observations de graines et de valves de siliques contaminées par *A. brassicicola* en microscopie confocale à balayage laser

Plusieurs méthodologies ont été envisagées pour observer des graines et des valves de siliques en microscopie confocale à balayage laser. Les tissus végétaux et le champignon ont été observés soit suite à une coloration, soit en utilisant une souche d'*A. brassicicola* exprimant constitutivement la protéine GFP. Les valves des siliques ont été observées dans leur globalité alors que l'observation des graines a été réalisée sur des graines entières ou sur des coupes de graines.

4.3.1. Réalisation de coupes de graines contaminées par *A. brassicicola*

Des coupes semi-fines (de 5 à 50 μ M d'épaisseur) sont réalisées au cryostat (Leica CM3050S, Solms, Allemagne). Les graines sont déposées dans du milieu d'enrobage Neg-50 (contenant de l'alcool de polyvinyle et polyéthylène-glycol, Richard-Allan Scientific) sur une platine réfrigérée, qui est placée dans l'enceinte du cryostat à -20°C pendant quelques minutes puis fixée dans le cylindre porte-objet. Les graines sont coupées avec une lame couteau en acier et les coupes sont récupérées et déposées des lames de verre prétraitées. Ce prétraitement est réalisé par incubation pendant 5 s dans une solution de 3-

aminopropyltriéthoxysilane 2% (v/v) (A3648, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) puis par rinçage dans 2 bains d'acétone et d'eau distillée. Les lames sont ensuite séchées à 37°C pendant 12 h.

4.3.2. Coloration au solophényl et à l'iodure de propidium de graines entières et de coupes de graines par microscopie confocale à balayage laser

Des coupes de graines et des graines entières sont immergées pendant 2 min dans un bain d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 1% (p/v), puis rincées deux fois dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. Elles sont ensuite plongées dans une solution de solophényl flavine 0,1% (p/v) pendant 5 min avant d'être rincées deux fois dans l'eau bidistillée pendant 3 min. Les coupes de graines sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol 50% (v/v) et les graines entières sont conservées dans cette même solution jusqu'à l'observation. Les échantillons sont stockés à 4°C à l'obscurité.

Les échantillons sont ensuite conservés par microscopie confocale à balayage laser (NIKON A1). Les deux fluorophores sont excités respectivement avec un laser multi-raies Argon et une diode laser à 561 nm, et peuvent être détectés grâce à leur émission à 520 nm (Solophényl flavine) et 617 nm (Iodure de propidium).

4.4. Observations de hampes florales et de graines contaminées par *X. campestris* pv. *campestris* en microscopie confocale à balayage laser

Des plantes d'*A. thaliana* (écotype Sf-2) sont inoculées comme décrit dans le paragraphe 3.2 de cette partie par injection de l'inoculum bactérien, calibré à 1×10^7 ufc/mL, dans la hampe florale. La souche de *X. campestris* pv. *campestris* utilisée exprime de manière constitutive la protéine GFP. Des observations sont réalisées régulièrement après inoculation afin d'évaluer la progression de la localisation de la bactérie dans la hampe. Des coupes manuelles de la hampe florale d'*A. thaliana* inoculée ont été réalisées avec de la moelle de sureau. Celles-ci sont directement observées au microscope confocal à balayage laser (NIKON A1). La GFP est excitée avec une diode à 488 nm. Une diode à 561 nm est également utilisée pour visualiser la fluorescence de chlorophylle.

4.5. Observations de biofilms bactériens en microscopie confocale à balayage laser

Cette technique d'observation de biofilms bactériens a été adaptée des travaux réalisés par Torres et ses collaborateurs (2007). La souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* et ses mutants sont cultivés pendant 20 h en milieu KADO avec les antibiotiques appropriés pour atteindre une $DO_{600nm} = 1,5$. Cette culture est diluée 1000 fois dans du milieu KADO ou du milieu MME pour inoculer des lamelles de microscopie (dimensions de 24 x 60 mm et épaisseur 0,13 - 0,17 mm). Ces lamelles sont ensuite mises à incuber dans une chambre humide pendant 4 jours. Des observations au microscope confocal à balayage laser sont réalisées 2 et 4 jours post-inoculation. Les biofilms sont observés soit en réalisant des plans focaux soit en réalisant une reconstitution tridimensionnelle d'une succession de plans focaux. Cette reconstitution est ensuite observée en Y afin de visualiser l'épaisseur du biofilm.

4.6. Etude de la localisation subcellulaire des déhydrines d'*A. brassicicola* en microscopie confocale à balayage laser

Des cultures liquides d'*A. brassicicola* sont réalisées dans un milieu minimum Vogel 1X (Vogel H.J., 1956) à partir de spores des différentes souches. Elles sont mises à incuber pendant 16 à 18 h, à 24°C et sous agitation à 150 rpm. Un stress salin peut être appliqué en ajoutant du NaCl à 2% (p/v) final dans la culture 2 h avant l'observation pour induire l'expression des gènes cibles. Les souches marquées soit simplement avec la protéine GFP soit doublement avec la protéine GFP et la protéine DsRed-SKL (excitation à 558nm, émission à 583 nm) sont observées directement au microscope confocal à balayage laser.

Dans le cas d'un marquage d'un organite cellulaire spécifique dans une souche dont le gène cible est fusionné à la GFP, différents protocoles sont utilisés selon les marqueurs utilisés.

4.6.1. Marquage des noyaux

Les noyaux d'*A. brassicicola* sont colorés avec le marqueur DAPI (LifeTechnologies™, InvitroGen) qui colore les acides nucléiques préférentiellement double brin. Le marquage est réalisé à une concentration finale de 250 nM dans du milieu de culture minimum Vogel 1X pendant 30 min. La solution de marquage est remplacée par du milieu minimum. Les échantillons sont ensuite observés au microscope confocal à balayage laser.

4.6.2. Marquage des mitochondries

Les mitochondries d'*A. brassicicola* sont marquées à l'aide du Mito Tracker Orange MitoTracker® Orange CMTMRos (Invitrogen) (excitation 554nm et émission 576nm). Le marquage est réalisé à une concentration finale de 250 nM dans du milieu de culture minimum Vogel 1X. La culture d'*A. brassicicola* est centrifugée de manière à obtenir un culot de mycélium qui est ensuite marqué avec le mélange milieu / marqueur, préalablement chauffé à 37°C. Le marquage, d'environ 30 min, est également réalisé à 37°C. La solution de marquage est remplacée par du milieu minimum. Les échantillons sont ensuite observés au microscope confocal à balayage laser.

5. Outils d'analyse *in silico* et statistiques

Les recherches de cadres ouverts de lecture (ORF) et les prédictions de position des exons et des introns sont réalisées en ligne à l'aide du serveur Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>).

Des recherches d'homologie entre des séquences sont effectuées par BLAST (Altschul et Lipman, 1990) sur la base de données publique NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les BLASTN et BLASTP permettent de rechercher respectivement des homologies au niveau des séquences d'ADN et des séquences protéiques.

L'alignement des séquences nucléotidiques a été fait en fonction de l'alignement protéique, avec les paramètres définis par défaut dans le programme CLUSTAL W disponible dans la version 7.0.9.0 du logiciel BioEdit (Hall, 1999).

La détermination du modèle d'évolution correspondant aux séquences (sans l'outgroup) est réalisé grâce avec Modeltest 3.7 via PaupUp. L'arbre phylogénétique retraçant les relations phylogénétiques entre les différentes séquences a été construit avec la méthode Neighbor Joining disponible dans le logiciel MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011) et en utilisant le modèle Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993). La robustesse des branches du dendrogramme est évaluée par les valeurs de bootstrap obtenues avec 1000 simulations. L'arbre phylogénétique construit avec la méthode de maximum de vraisemblance en utilisant le logiciel PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010).

Les profils d'hydrophilie, la composition en acides aminés, la structuration des protéines et l'existence de structures secondaires sont prédits respectivement par les logiciels ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>), PepStats (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>), FOLDINDEX (<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex/>) et PELE (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>).

Les amorces utilisées pour la PCR conventionnelle sont définies à l'aide des logiciels Primer3 (http://biocore.unl.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) et Amplify 3.0 (Université du Wisconsin). Le logiciel Primer Express (Applied Biosystems) est utilisé pour la définition des amorces utilisées en PCR quantitative.

Les tailles des populations bactériennes sont analysées à l'aide du test non paramétrique Kruskal-Wallis et comparées à l'aide du test de Mann-Whitney (Sokal et Rolf, 1969) implémentés dans le logiciel Statbox-Pro (Grimmer logiciels) au seuil $\alpha=0,05$. Les transformations en Log10 sont utilisées respectivement pour les tailles des populations bactériennes.

Les analyses statistiques concernant le calcul des probabilités d'infection des graines d'*A. thaliana* par *A. brassicicola* ont été réalisées avec le logiciel R (version 2.12.0) en utilisant la fonction glm en affectant à « family » la valeur binomiale "logit". Les valeurs d'intervalle de confiance de 95% ont été extraites pour chaque modèle. Pour faciliter la lecture, les valeurs de log odd prédites par les modèles ont été converties en probabilités d'infection, expliquant l'asymétrie des intervalles de confiance. Les répétitions ont été considérées comme un facteur, et aucune différence significative entre les répétitions n'a été observée.

Résultats

Chapitre 3 : Résultats

Partie 1 : Mise en place des pathosystèmes modèles pour étudier la transmission des agents phytopathogènes aux graines des porte-graines

L'étude de la transmission aux graines d'organismes phytopathogènes nécessite de mettre en place des pathosystèmes modèles au stade reproducteur en conditions contrôlées. Deux pathosystèmes, mis en place avec la plante modèle *A. thaliana*, ont été envisagés tous deux avec des microorganismes modèles : *X. campestris* pv. *campestris* et *A. brassicicola*. Ces pathosystèmes doivent permettre non seulement de bénéficier des ressources génétiques disponibles pour les différents partenaires de l'interaction mais également de s'affranchir d'une culture en plein champ et des variations de conditions environnementales. De plus, dans l'optique de mieux comprendre les différents mécanismes moléculaires intervenant dans cette phase du cycle de vie de certains pathogènes, des mutants de délétion construits en laboratoire ont été utilisés. Ces souches doivent être manipulées en conditions contrôlées et confinées. Les différentes voies de transmission aux graines ont été envisagées dans chacun des deux pathosystèmes dans le but de déterminer la plus adaptée en terme d'obtention de graines contaminées.

Une partie des travaux présentés dans le cadre de l'étude du pathosystème *A. thaliana*/*A. brassicicola* a fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue *Plant Methods* en 2012 (**Annexe 1**).

La mise en place de pathosystèmes modèles d'étude de la transmission aux semences nécessite la définition de paramètres liés 1) aux conditions d'inoculation, 2) à la méthode de récolte des organes potentiellement contaminés, 3) aux méthodes d'analyse permettant de détecter la présence ou non de l'agent pathogène. Selon le microorganisme étudié, les paramètres retenus peuvent différer afin de prendre en compte les caractéristiques particulières de leur cycle de vie. Les écotypes utilisés diffèrent selon le pathosystème considéré. En effet, l'écotype Col0 est connu pour sa faible sensibilité à *X. campestris* pv. *campestris* (Xu *et al.*, 2008) aussi bien qu'à *A. brassicicola* (Mukherjee *et al.*, 2009). Des essais préliminaires nous ont permis de montrer que l'écotype *Landsberg erecta* (Ler) est sensible à *A. brassicicola*. En revanche, ce même écotype s'est avéré résistant à *X. campestris* pv. *campestris*. Aucune transmission de

Tableau 2. Fréquences de transmission (contamination de la descendance d'une plante) de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 aux graines d'*A. thaliana* écotype Sf-2 selon les méthodes d'inoculation utilisées et en fonction de différentes concentrations d'inoculum.

Méthodes d'inoculation	Dépôt d'un inoculum dans les fleurs			Injection de l'inoculum dans les feuilles			Injection de l'inoculum dans la hampe florale		
	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸
Concentration d'inoculum (cfu/mL)	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸
Fréquences de transmission (effectifs de plantes analysées)	0 (30)	0 (30)	0 (30)	0 (20)	0,17 (20)	0,17 (20)	0,3 (20)	0,5 (20)	0,13 (20)

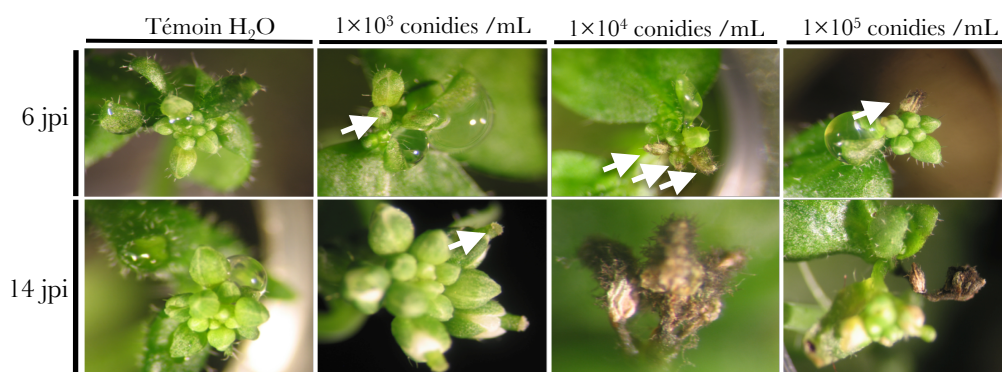


Figure 44. Boutons floraux d'*A. thaliana*, inoculés avec différentes concentrations en conidies d'*A. brassicicola* au stade « bolting ». Les photos illustrent les résultats obtenus 6 et 14 jours après l'inoculation (jpi).

X. campestris pv. *campestris* ATCC33913 à la graine de cet écotype n'est également possible (résultats non montrés). L'écotype San Feliu 2 (Sf-2) s'est avéré sensible au stade végétatif à *X. campestris* pv. *campestris*, et cette bactérie est également transmise par ses graines. C'est donc cet écotype qui a été retenu pour la suite des essais dans le cas du pathosystème *A. thaliana* – *X. campestris* pv. *campestris*.

I. L'inoculation

1. Par voie florale

La transmission par voie florale dépend d'une contamination via le stigmate, il s'agit d'une infection par l'intermédiaire du style de la plante (**Figure 20B**). La réalisation de deux expériences indépendantes nous a permis de mettre clairement en évidence que la voie florale n'était pas la voie privilégiée de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* aux graines d'*A. thaliana* Sf-2. En effet, aucune transmission de *X. campestris* pv. *campestris*, par voie florale, n'a été observée, quelle que soit la concentration d'inoculum utilisée (**Tableau 2**).

Dans le cas du pathosystème *A. brassicicola*/*A. thaliana* Ler, le dépôt d'une suspension de conidies, sous forme de goutte, sur les boutons floraux a été envisagé comme première méthode d'inoculation. Différentes concentrations de conidies dans la suspension ont été analysées. De manière répétable, le champignon ainsi inoculé provoque l'arrêt du développement de la plante, quelle que soit la concentration initiale d'inoculum, et un feutrage de mycélium associé à des conidies apparaît (**Figure 44**). Les organes floraux d'*A. thaliana* semblent donc trop sensibles à *A. brassicicola* pour permettre d'étudier la transmission par cette voie.

2. Par voie vasculaire

La contamination des semences *via* la voie vasculaire intervient suite à une colonisation du xylème de la plante mère (**Figure 20A**). L'injection d'un inoculum dans les feuilles, au stade rosette ou dans la hampe florale, permet de contaminer le système vasculaire et d'étudier la transmission à la semence par cette voie. Le **tableau 2** décrit les fréquences de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 aux semences d'*A. thaliana* suite à une injection dans la nervure principale des feuilles d'une suspension bactérienne calibrée à 1×10^6 , 1×10^7 ou 1×10^8 ufc/mL. Aucune transmission à la graine n'a été observée pour la

concentration d'inoculum la plus faible. A l'inverse, pour les deux autres concentrations d'inoculum utilisées, une transmission de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 a été obtenue, bien que les fréquences de transmission associées (0,17 avec une population bactérienne de $2,4 \times 10^2$ ufc/g de graines) soient trop faibles pour pouvoir envisager une comparaison de différents génotypes bactériens. En effet, l'injection d'un inoculum à 1×10^8 ufc/mL entraîne fréquemment la mort des plantes. Une concentration intermédiaire, telle que 1×10^7 ufc/mL, diminue la fréquence d'apparition de hampes florales chez les plantes inoculées expliquant les faibles fréquences de transmission aux semences obtenues à ce stade d'inoculation (0,17 avec une population bactérienne de $2,5 \times 10^5$ ufc/g de graines). Les hampes florales avortent alors de manière très précoce ou continuent de croître sans former de fruits.

De manière intéressante, l'injection d'une suspension bactérienne directement dans la hampe florale d'*A. thaliana* permet d'obtenir des fréquences de transmission satisfaisantes de l'ordre de 0,5 avec un inoculum calibré à 1×10^7 ufc/mL (**Tableau 2**). Les résultats présentés dans la suite de cette étude ont été obtenus avec cette méthodologie. En revanche, l'augmentation des fréquences de transmission n'est pas corrélée avec l'augmentation de la concentration de l'inoculum. De la même manière que pour l'injection d'un inoculum dans les feuilles, l'utilisation d'un inoculum calibré à 1×10^8 ufc/mL entraîne un avortement des fleurs présentes sur la hampe florale dû à la grande quantité de bactéries déposées lors de l'inoculation. En effet, nous avons estimé la quantité de bactéries injectées dans la hampe suite à la piqûre à environ 1×10^6 ufc pour une suspension calibrée initialement à 1×10^8 ufc/mL.

A. brassicicola n'étant pas connu pour être un pathogène vasculaire, cette voie de transmission n'a pas été envisagée dans le cas du pathosystème fongique.

3. Par voie indirecte de contact avec le fruit ou des pailles

La troisième voie de contamination des semences par les bactéries est le contact entre les téguments de la graine et des fruits qui présentent des symptômes ou des pailles contaminées lors des étapes de récolte et/ou de stockage (**Figure 20C**). Cette contamination a donc lieu en présence d'un fort inoculum qui est associé à la présence de symptômes sur les organes aériens de la plante (Weller et Seattler, 1980). Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires régissant spécifiquement l'étape de transmission à la graine indépendamment du processus infectieux, il est indispensable de dissocier la transmission à la graine du développement des symptômes d'une contamination par contact. Ainsi, cette méthode d'inoculation de

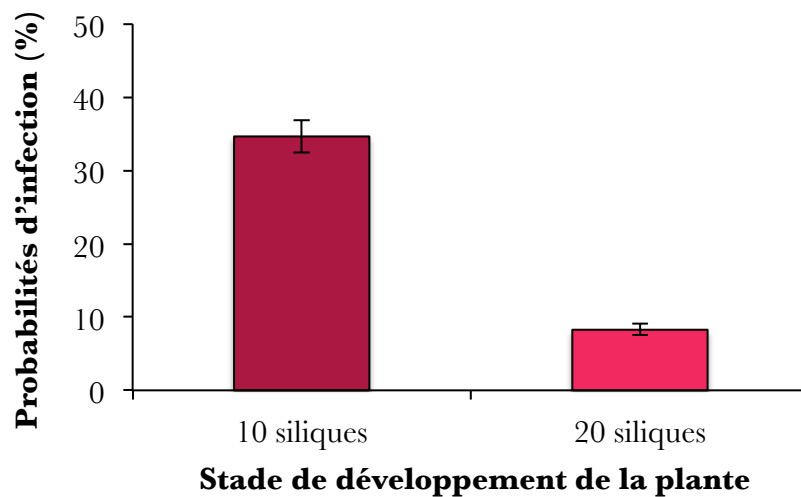


Figure 45. Influence du stade de développement de la plante sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* (Abra 43 WT) aux graines d'*A. thaliana* (Ler). Les siliques ont été inoculées quand 10 ou 20 siliques étaient présentes sur la hampe florale principale. La récolte a été réalisée 10 jours après l'inoculation et les valeurs de probabilités d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.

X. campestris pv. *campestris* directement sur les siliques d'*A. thaliana* n'a pas été envisagée, puisque les méthodes décrites précédemment dans ce document permettent d'avoir accès, de manière plus fine, aux mécanismes impliqués dans la transmission à la semence *via* la voie vasculaire.

A. brassicicola est un champignon qui ne se vascularise pas et qui est incapable de se transmettre aux graines de sa plante hôte par voie florale sans provoquer d'importants symptômes (Maude, 1996), contrairement à d'autres champignons phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae* et biotrophes *Ustilago segetum* var. *tritici*. Ces espèces sont, en effet, capables de contaminer les graines de leurs plantes hôtes respectivement par le système vasculaire de la plante mère et par le stigmate et le style de la fleur. De surcroît, *A. brassicicola* est connu pour être un champignon transmissible par les semences suite à une contamination des siliques (Humpherson-Jones & Maude, 1982).

Ainsi, dans le cas du pathosystème fongique, une seconde méthode d'inoculation envisagée est le dépôt d'une suspension de conidies, sous forme de gouttes, directement sur les siliques d'*A. thaliana* (**Figure 41**). Le stade de la plante au moment de l'inoculation a été un paramètre à définir précisément. En effet, nous avons constaté que le nombre de siliques présentes lors de l'inoculation influence le degré de contamination des siliques et des graines. Deux stades de développement ont été testés : soit 10 siliques (9 jours après pollinisation), soit 20 siliques (12 jap) présentes sur la hampe florale. Plusieurs expériences indépendantes ont permis de déterminer que la probabilité d'infection des graines par plante est significativement supérieur (35%) lorsque les plantes sont inoculées au stade « 10 siliques » par rapport à celui de plantes inoculées plus tardivement au stade « 20 siliques » (8%) (**Figure 45**). Ainsi, l'intégralité des expériences suivantes a été menée sur des plantes au stade « 10 siliques ». Cette technique nous a permis d'obtenir des probabilités d'infection satisfaisantes nous permettant de comparer l'efficacité de transmission de différents génotypes fongiques sur un écotype sauvage d'*A. thaliana* ou d'une souche fongique sur différents génotypes de la plante hôte.

II. Récolte des organes contaminés

Suite à l'injection d'une suspension de *X. campestris* pv. *campestris* dans la hampe florale d'*A. thaliana*, les différents organes de la plante sont récoltés cinq semaines après inoculation. Il

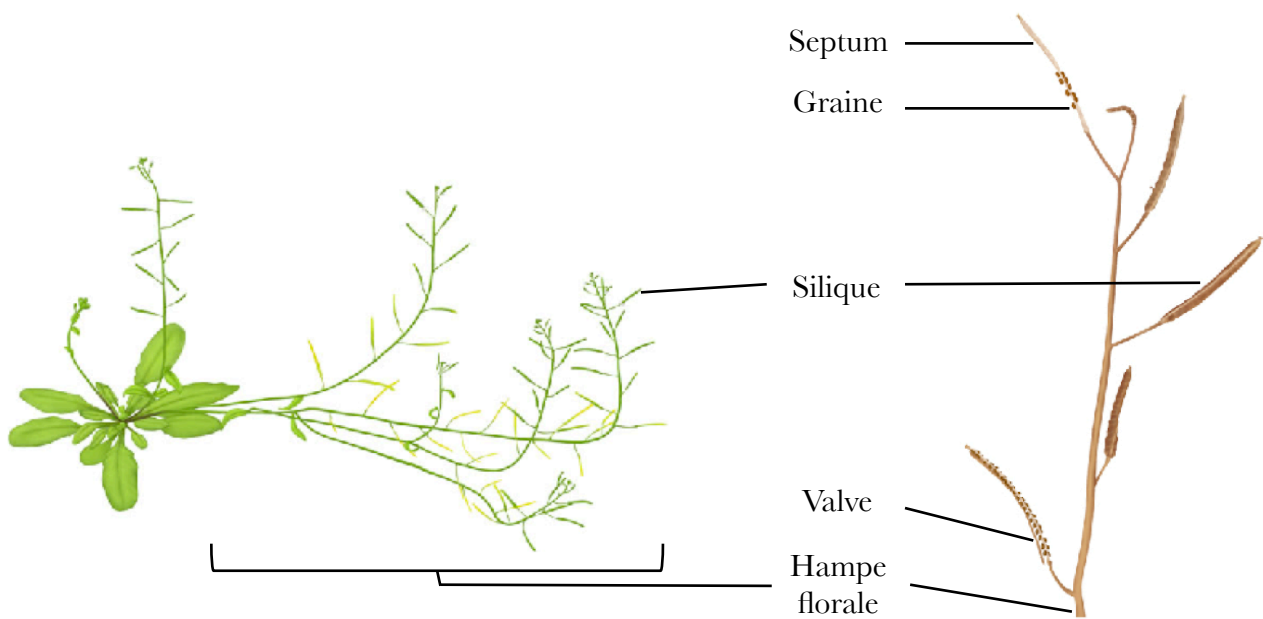


Figure 46. Anatomie de la hampe florale et d'une silique d'*A. thaliana* (photos issues de <http://www.prep.biochem.vt.edu/timeline/>).

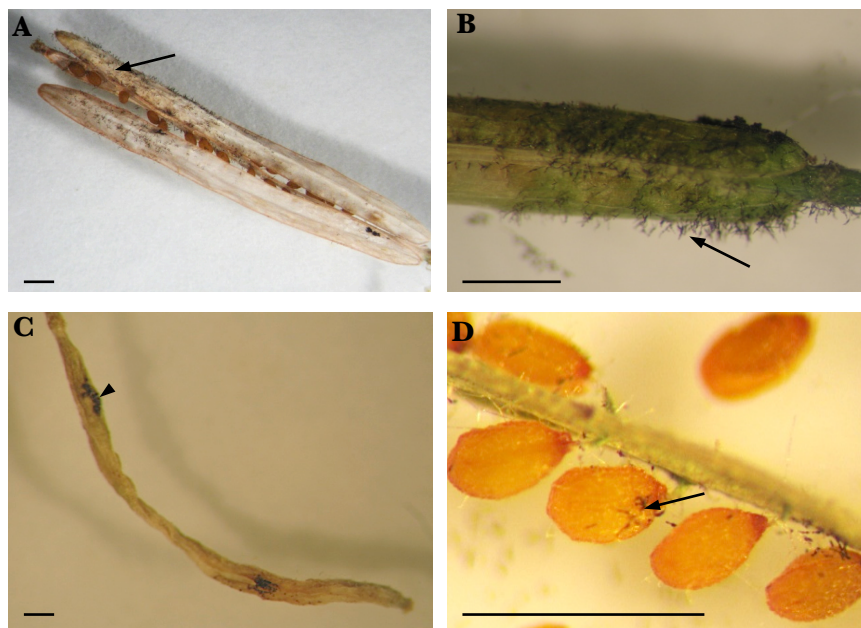


Figure 47. Développement de mycélium, conidiogénèse sur les siliques et les graines, et lésions nécrotiques sur les siliques 10 jours après inoculation avec *A. brassicicola*. **A** et **B**. Développement de mycélium et formation de conidies (flèches) sur les siliques. **C**. Lésions nécrotiques (tête de flèche) sur les siliques. **D**. Développement de mycélium et conidiogénèse (flèches) sur les graines. Barre d'échelle = 1mm.

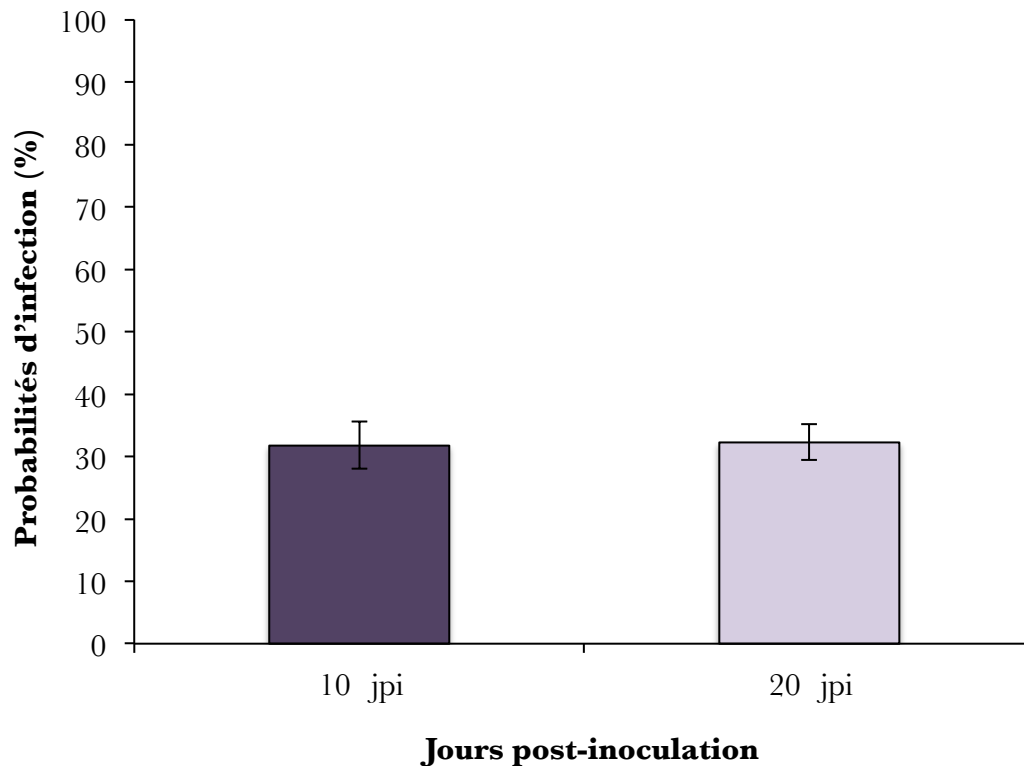


Figure 48. Influence du délai entre l'inoculation et la récolte des organes contaminés sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* (Abra 43 WT) aux graines d'*A. thaliana* (Ler). La récolte a été réalisée 10 ou 20 jours après l'inoculation (jpi). Les valeurs de probabilités d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.

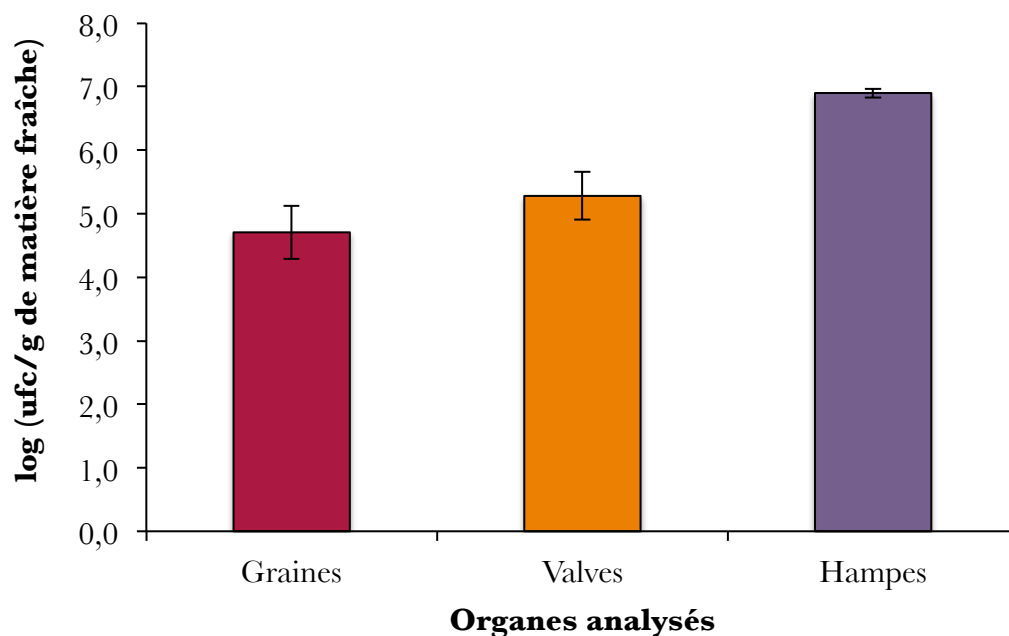


Figure 49. Tailles des populations bactériennes de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 associées aux différents organes d'*A. thaliana* (graines, valves des siliques et hampe florale).

s'agit des graines, des valves des siliques et de la hampe florale constituée de différentes ramifications portant encore les septa (cloisons centrales des siliques) (**Figure 46**).

Lors de la récolte des siliques contaminées par *A. brassicicola*, celles-ci sont tout d'abord observées sous une loupe binoculaire. Fréquemment, le développement de mycélium et de conidies associé à des symptômes typiques de la maladie des taches noires est observé sur les siliques (**Figure 47**). L'aspect des siliques, la présence des symptômes sur siliques, l'aspect des graines et présence ou non de mycélium et/ou de conidies sur les graines est notée systématiquement pour chaque silique (résultats non présentés). Les graines sont ensuite séparées avec précaution des siliques sénescents. L'impact du délai entre l'inoculation et la récolte sur le taux de transmission d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana* a été déterminé à deux moments distincts: soit 10 jours, soit 20 jours post-inoculation (jpi). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux dates de prélèvement. En effet, dans les deux cas, les taux de transmission des graines sont de l'ordre de 32% (**Figure 48**).

III. Détection des organismes phytopathogènes

L'analyse des hampes florales permet de confirmer l'efficacité de la méthode d'inoculation. Une forte population bactérienne est systématiquement associée à chaque hampe inoculée (supérieure à 1×10^7 ufc/g de matière fraîche). La taille des populations bactériennes est plus hétérogène dans les valves et les graines (**Figure 49**). Dans notre étude, la transmission aux semences est considérée comme effective lorsqu'une population bactérienne est détectée dans la descendance d'une plante, matérialisée par l'ensemble des graines récoltées pour cette plante.

La transmission d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana* nécessite d'être quantifiée afin de déterminer une probabilité d'infection des graines par le champignon. En raison de la nature dichotomique des données à analyser (chaque graine est soit contaminée soit saine), ces dernières ont été analysées en utilisant un modèle linéaire généralisé en logit (pour introduction, Rodriguez, 2007). Les graines sont déposées individuellement sur un milieu nutritif gélosé. Ceci permet de détecter la présence d'*A. brassicicola*, pour chaque graine de chaque silique étudiée, en notant l'apparition ou non d'une colonie fongique sur le milieu. Ainsi, un taux de contamination global sur l'ensemble de la plante mais également un taux de contamination spécifique à chaque silique peut être déterminé. Comme l'indique la **Figure 45**, le taux de contamination moyen d'*A. brassicicola* sur les graines d'*A. thaliana* est de 32% par

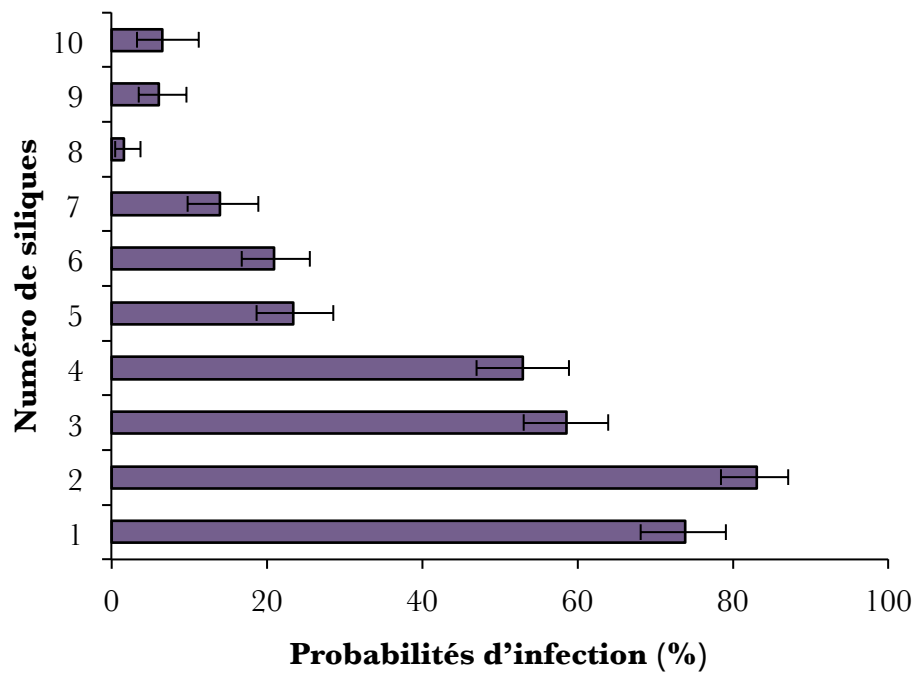


Figure 50. Influence de l'état de maturité de la silique sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* (Abra 43 WT) aux graines d'*A. thaliana* (Ler). La récolte a eu lieu 10 jours après l'inoculation (jpi). Les valeurs de probabilités d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.

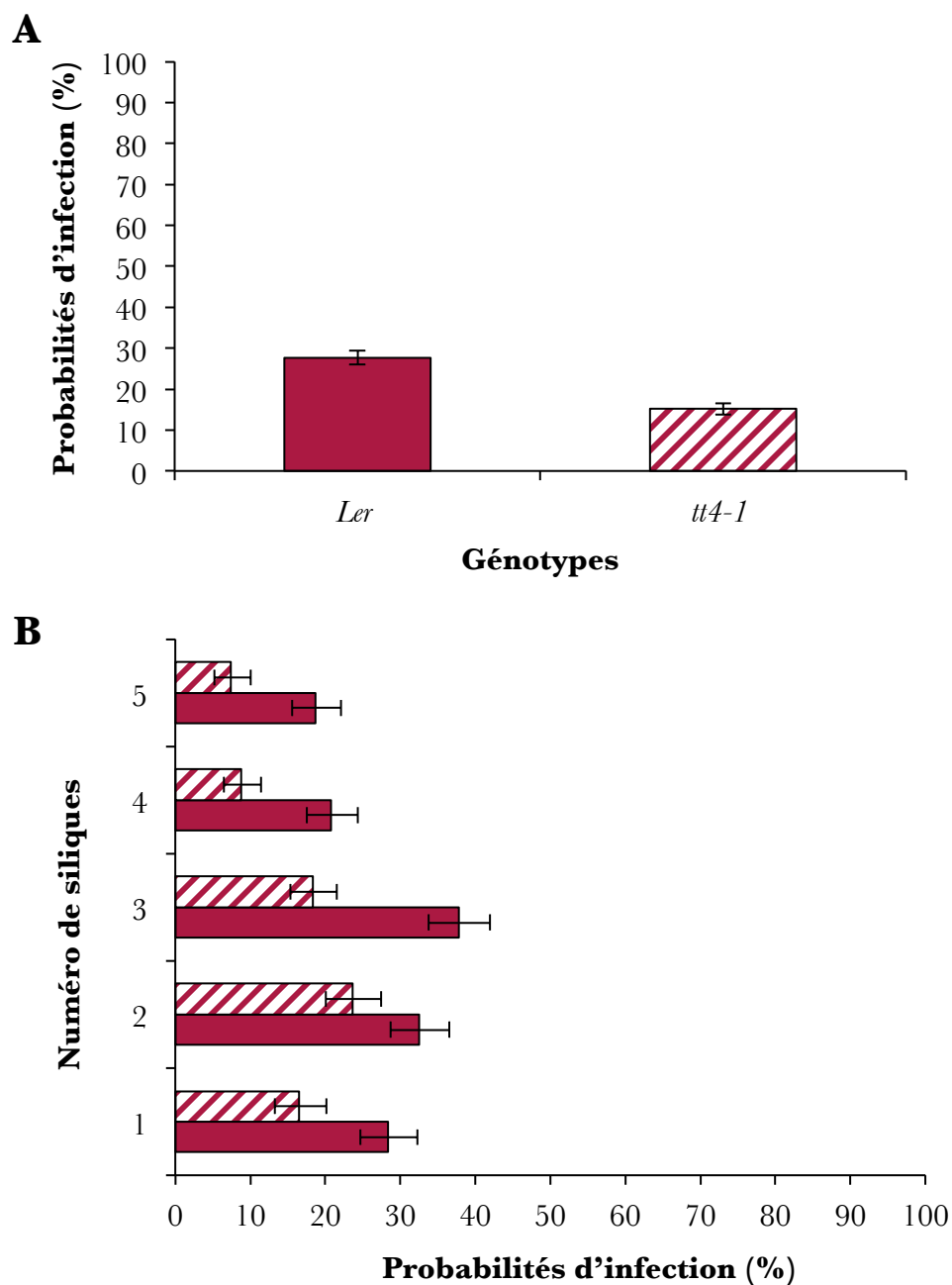


Figure 51. Influence du génotype d'*A. thaliana* sur la capacité d'*A. brassicicola* Abra43 WT à se transmettre aux graines. La capacité de transmission d'*A. brassicicola* a été évaluée aux graines de deux génotypes d'*A. thaliana* (Ler et *tt4-1*). **A.** Capacités de transmission globale sur les deux génotypes **B.** Capacités de transmission d'*A. brassicicola* sur chaque génotype selon l'étage de la plante. La récolte a eu lieu 10 jours après l'inoculation (jpi). Les valeurs de probabilités d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.



Figure 52. Effets de la mutation *tt4-1* chez *A. thaliana* sur la virulence d'*A. brassicicola* sur des feuilles d'*A. thaliana tt4-1*. Les feuilles d'*A. thaliana* de *Ler* (**A.**) et *tt4-1* (**B.**) ont été inoculées avec une suspension de conidies d'*A. brassicicola* Abra43 WT. Cinq feuilles permettent d'illustrer les symptômes obtenus six jours après inoculation.

plante inoculée. Une hétérogénéité du taux de transmission d'*A. brassicicola* sur l'ensemble de la plante a été observée de manière répétable et statistiquement significative. Ainsi, les graines issues de la silique n°1 sont contaminées à hauteur de 74%, alors que celles de la silique n°10, seulement à hauteur de 7%. L'incidence d'*A. brassicicola* sur les siliques les plus jeunes est donc faible (**Figure 50**). Par conséquent, l'évaluation de la capacité de transmission du champignon aux graines a été quantifiée dans les études suivantes seulement sur les 5 siliques les plus âgées (n°1 à n°5). L'influence de la teneur en flavonoïdes sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* aux semences d'*A. thaliana* a été testée par l'intermédiaire d'un mutant déficient au niveau de la voie de biosynthèse de ces métabolites. Cette expérimentation a permis de valider le fonctionnement correct du pathosystème mais également d'étudier un mécanisme moléculaire de l'hôte pouvant moduler la transmission du champignon à la graine. La capacité de contamination de la souche sauvage d'*A. brassicicola* sur deux génotypes d'*A. thaliana*, l'écotype sauvage *Ler* et le mutant *tt4-1*, a été évaluée. La probabilité d'infection par *A. brassicicola* des graines du mutant *tt4-1* (15%) est significativement inférieure à celle des graines de l'écotype sauvage *Ler* (27%) (**Figure 51A**). Cette différence est, à la fois, constatée sur l'ensemble des 5 siliques inoculées mais également si les taux de contamination individuels de chaque silique sont comparés (**Figure 51B**). L'analyse de l'agressivité de la souche sauvage d'*A. brassicicola* au stade végétatif sur des feuilles du mutant *tt4-1* indique que celle-ci est identique à celle obtenue sur l'écotype sauvage *Ler* (**Figure 52**).

Synthèse des deux méthodologies mises en place :

Le pathosystème X. campestris pv. campestris – A. thaliana (Sf-2) mis au point consiste à piquer la hampe florale avec une aiguille préalablement trempée dans une suspension bactérienne calibrée à 1×10^7 ufc/mL. De cette manière, bien que la vascularisation et la colonisation de la hampe florale soient effectives dans 100% des cas, la fréquence de transmission moyenne aux graines est généralement de l'ordre de 0,5 ou autrement formulé la descendance d'une plante est contaminée pour deux plantes inoculées.

*La contamination des graines d'*A. thaliana* (*Ler*) par *A. brassicicola* est obtenue en déposant deux gouttes de 2,5 μ L par silique d'une suspension de conidies à 1×10^5 conidies/mL. Le stade de l'inoculation est primordial : la transmission à la semence est favorisée lorsque l'inoculation intervient au moment où la plante possède 10 siliques. Les expériences de mise au point du pathosystème ont montré que le calcul du taux de transmission pouvait être fait à partir de 5 siliques les plus âgées, ce qui a permis d'alléger les protocoles d'inoculation et de récolte. La récolte des graines a lieu 10 jours post-inoculation. Celles-ci sont déposées individuellement sur un milieu nutritif gélosé pour déterminer un taux de contamination des graines par silique par *A. brassicicola*.*

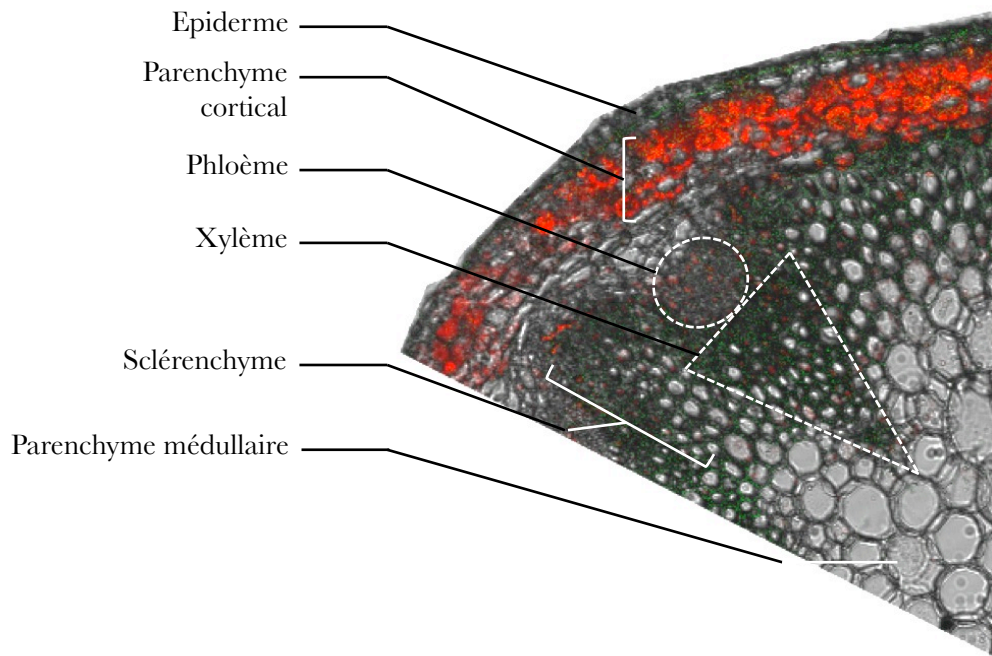
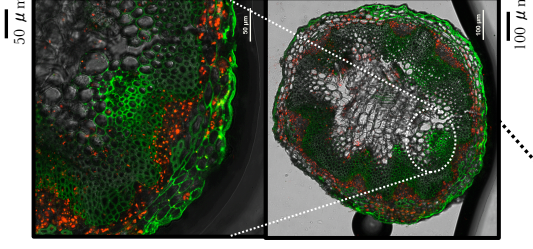
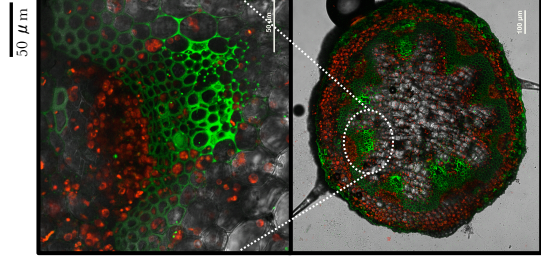
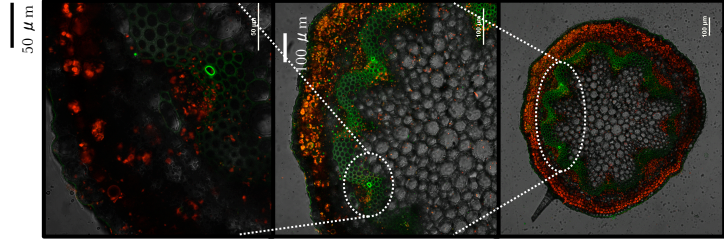
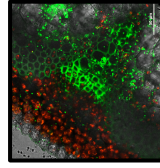
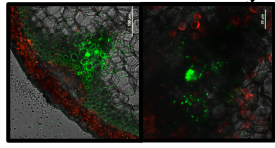
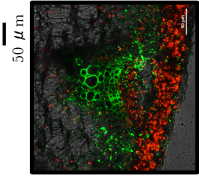
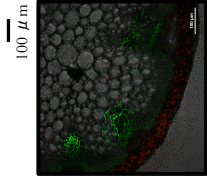
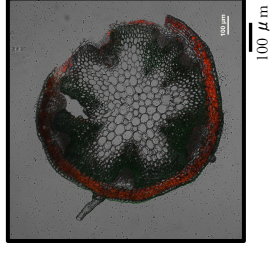
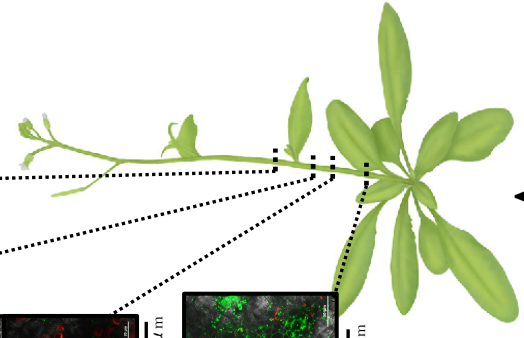


Figure 53. Section d'une coupe transversale de hampe florale d'*A. thaliana* lors de la récolte des organes contaminés par *X. campestris* pv. *campestris*, observée en microscopie confocale à balayage laser (photo obtenue lors de cette étude). (Photos IMAC)

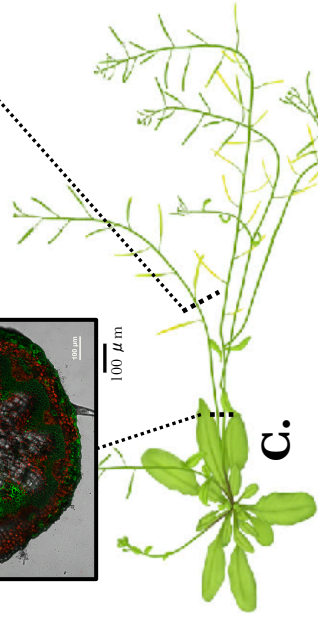
Plante non inoculée



B.



A.



C.

Figure 54. Cinétique d'observation d'une souche de *X. campestris* pv. *campestris* exprimant constitutivement la GFP lors de la colonisation du système vasculaire d'*A. thaliana* en microscopie confocale à balayage laser. **A.** 10 jours après inoculation par piqûre de la hampe florale. **B.** 20 jours après inoculation et **C.** 40 jours après inoculation. Les signaux de fluorescence sont localisés spécifiquement dans le xylème de la hampe florale. (Photos IMAC)

Partie 2. Histologie de la transmission à la graine

La mise en place de pathosystèmes modèles au stade reproducteur permet non seulement d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus, mais également de mieux comprendre les interactions tissulaires et cellulaires lors de la transmission à et par la semence. Deux aspects peuvent ainsi être étudiés en détail pour appréhender cette étape clé du cycle infectieux des pathogènes : il s'agit, d'une part, d'observer la localisation du pathogène lors de la transmission à la semence, et, d'autre part, la colonisation sur ou dans la graine elle-même. Dans le but d'être le plus exhaustif et illustratif possible, des approches microscopiques ont été envisagées pour chacun des deux pathosystèmes.

I. Pathosystème *X. campestris* pv. *campestris* / *A. thaliana*

Nous avons voulu étudier pour le pathosystème *X. campestris* pv. *campestris* – *A. thaliana* la colonisation du système vasculaire de la hampe florale par *X. campestris* pv. *campestris* lors de la transmission à la graine. En outre, la localisation de la bactérie sur et dans les graines d'*A. thaliana* a également été étudiée. De manière générale, les bactéries transmises par les semences sont situées dans les fissures et dans les couches cellulaires des téguments (Taylor, 1979). Une pénétration plus profonde dans les tissus embryonnaires est beaucoup plus rare pour ce type de microorganismes (Maude, 1986).

Dans cette optique, pour le pathosystème bactérien, des hampes florales ont été inoculées avec la souche de *X. campestris* pv. *campestris* marquée constitutivement avec le gène codant la GFP. Des observations de coupes transversales de hampe florale (**Figure 53**) ont été réalisées 10 jours, 20 jours et 40 jours suivant l'inoculation puis observées en microscopie confocale à balayage laser. Une forte fluorescence verte provenant de l'expression constitutive de la GFP chez *X. campestris* pv. *campestris* est visible dès les premiers jours suivant l'inoculation et jusqu'à quelques jours avant la récolte des organes contaminés (**Figure 54**). Quelle que soit la date d'observation, le signal est toujours localisé au niveau des cellules du xylème. Aucune fluorescence n'a été détectée dans les tissus avoisinant tels que le phloème primaire, le sclérenchyme et le parenchyme médullaire. La localisation de *X. campestris* pv. *campestris* au sein du xylème primaire évolue au cours des jours suivant l'inoculation. A 10 et 20 jours post-inoculation, les cellules bactériennes semblent se localiser à la fois dans les espaces

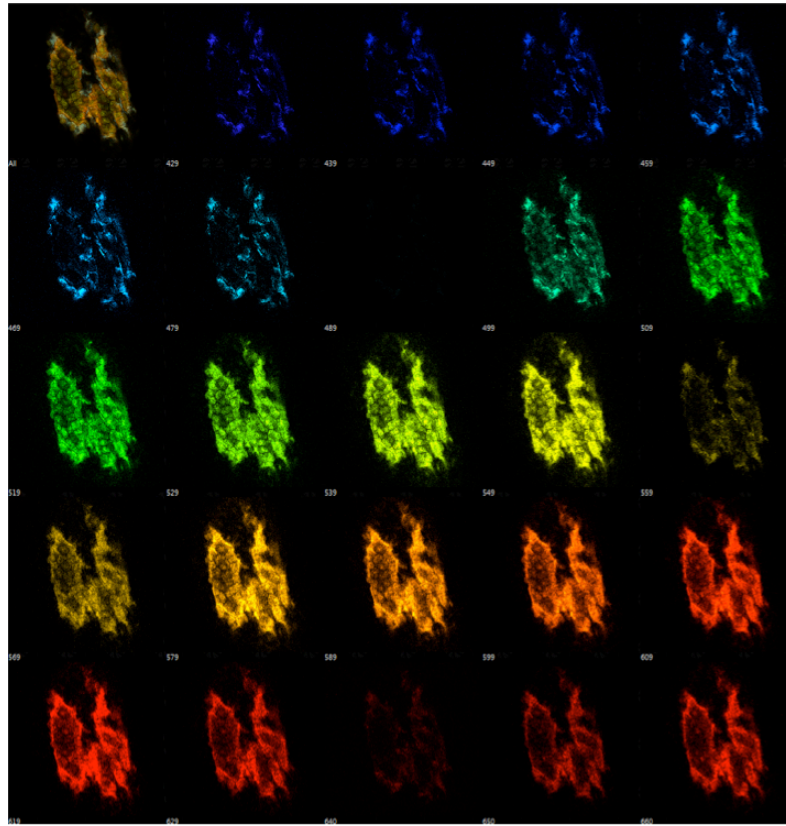


Figure 55. Coupe virtuelle d'une graine d'*A. thaliana* observée en microscopie confocale à balayage laser en analyse spectrale. Les signaux observés à chaque longueur révèle l'existence d'une autofluorescence des tissus de la graine. (Photos IMAC)

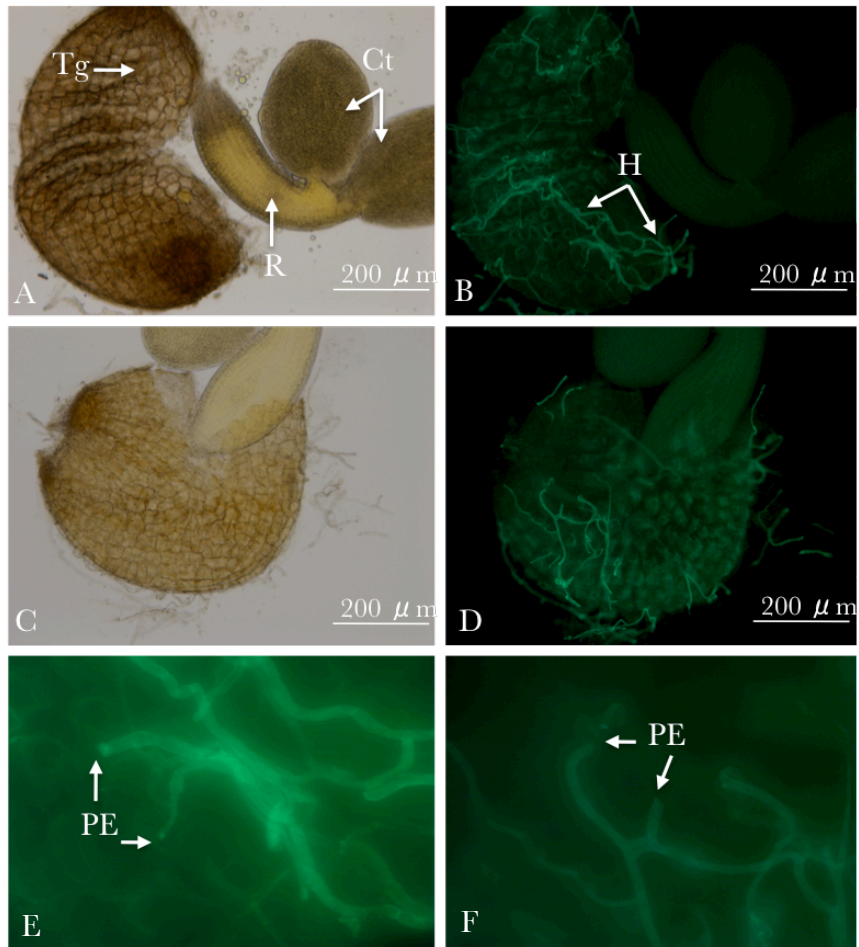


Figure 56. Localisation d'*A. brassicicola* sur les graines d'*A. thaliana*. Observations en microscopie photonique à épifluorescence. **(A, C)**. Graines colorées au solophényl observées en lumière blanche pour lesquelles les embryons sont exclus de l'enveloppe. Tg : Tégument ; Ct : Cotylédon ; R : Radicule. **(B, D)**. Graines colorées au Solophényl observées en fluorescence (filtre GFP-FITC) pour lesquelles les embryons sont exclus de l'enveloppe. H : Hyphes. **(E, F)**. Détails des points de pénétrations putatifs des hyphes dans les téguments. PE : points d'entrée.

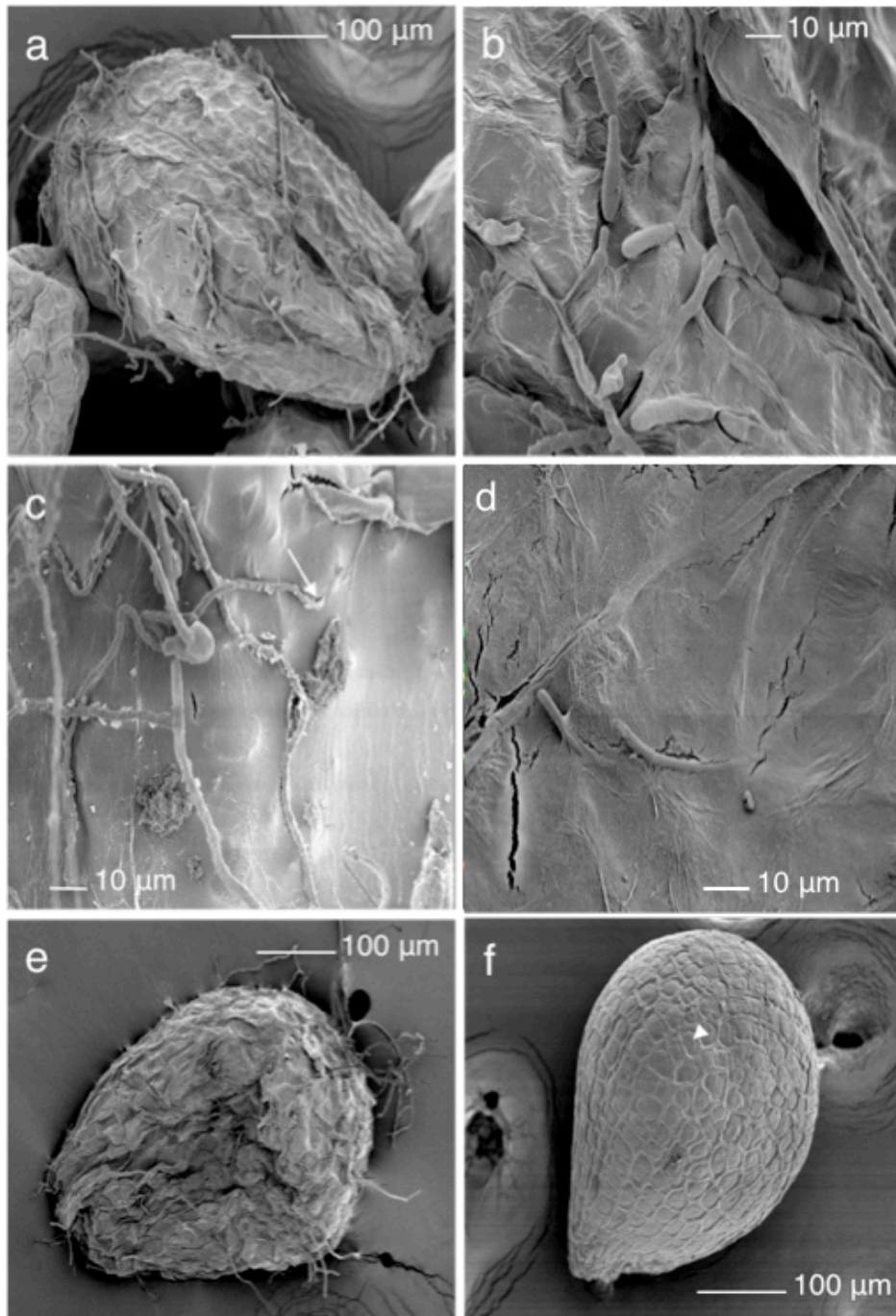


Figure 57. Illustrations de la localisation d'*A. brassicicola* sur des graines d'*A. thaliana* en microscopie électronique à balayage 10 jours après l'inoculation des siliques avec la souche sauvage d'*A. brassicicola*. **a.** Colonisation globale d'une graine par la champignon. **b.** Formation de conidie sur une graine. **c** et **d.** Pénétration et résurgence de mycélium dans les tissus de l'enveloppe de la graine. **e** et **f.** Altération de la surface de la graine après la colonisation du champignon : la graine apparaît déformée (**e.**) par rapport avec une graine récoltée sur une plante témoin (**f.**). (Photos SCIAM)

intercellulaires des cellules du xylème et également dans la lumière des vaisseaux sous forme d'agrégats bactériens. En revanche, au bout de 40 jours, les bactéries sont localisées uniquement dans les espaces intercellulaires du xylème de la hampe florale car aucun agrégat n'est visible dans les vaisseaux. Les mêmes résultats ont été obtenus suite à l'observation de ramifications de la hampe florale.

Des graines d'*A. thaliana*, issues de plantes inoculées avec la souche de *X. campestris* pv. *campestris* marquée avec la GFP, et dont la colonisation de la hampe florale a été vérifiée par microscopie confocale à balayage, ont été observés par cette même technique. L'observation de cellules de *X. campestris* pv. *campestris*, même marquées constitutivement avec la GFP, s'est avérée difficile à mettre en place. L'autofluorescence émise par les téguments de la graine masque le signal de fluorescence de la GFP (**Figure 55**).

II. Pathosystème *A. brassicicola*/*A. thaliana*

Dans le cas du pathosystème fongique, la première approche envisagée, pour étudier la (ou les) localisation(s) d'*A. brassicicola* sur les graines d'*A. thaliana*, a été la microscopie photonique classique à fluorescence. Pour cela, les parois du champignon ont été marquées avec un colorant fluorescent : le solophényl (Hoch *et al.*, 2005) afin de le localiser sur des graines d'*A. thaliana* naturellement contaminées suite à une inoculation du porte-graine. Cette approche nous a permis de visualiser d'une part, le champignon à la surface de la graine, et d'autre part, certains points de pénétration putatifs dans la graine (**Figure 56**). Très rapidement, les limites de cette méthode en terme de précision et de résolution (200 nm) sont apparues.

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images précises (résolution de 10 nm, Meyer *et al.*, 1994) qui reflètent la topographie de la surface d'un échantillon. L'observation de graines en MEB permet de confirmer qu'une croissance superficielle du mycélium d'*A. brassicicola* associée à une formation de conidies intervient sur des graines récoltées 10 jours après inoculation (**Figure 57a-b**). La pénétration d'hyphes à l'intérieur des téguments de la graine, soit directement, soit à travers des craquelures, a été observée (**Figure 57c-d**). Cet événement est généralement associé à une croissance mycélienne à l'intérieur des tissus de la graine (Singh et Mathur, 2004). Ces observations indiquent que le champignon colonise activement l'enveloppe de la graine et qu'il n'est pas seulement un contaminant passif. Cette colonisation active a pour conséquence la dégradation

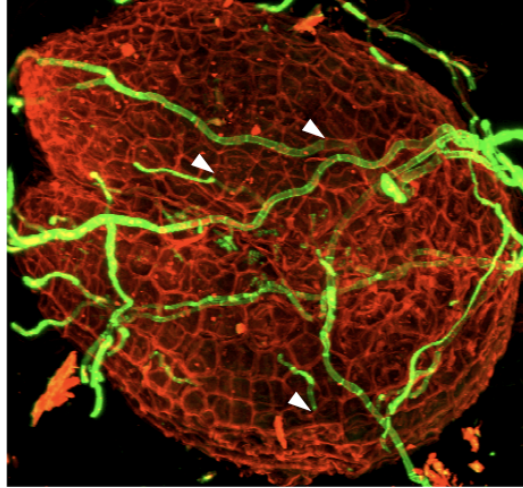


Figure 58. Développement du mycélium d'*A. brassicicola* sur une graine d'*A. thaliana* observée en microscopie confocale à balayage laser. Les hyphes sont colorés avec du solophényl et l'enveloppe de la graine avec de l'iodure de propidium. Les hyphes se sont développés à la surface de la graine, puis semblent pénétrer dans les tissus de l'enveloppe (têtes de flèche). (Photos IMAC)

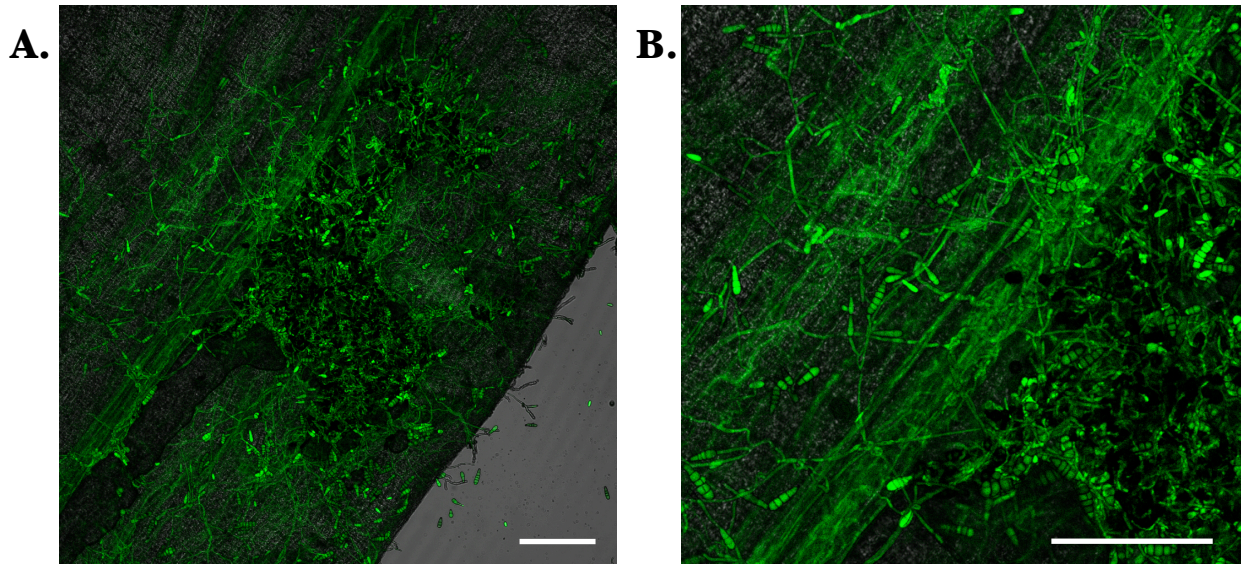


Figure 59. Développement de mycélium d'*A. brassicicola* sur une valve d'une silique d'*A. thaliana* au microscope confocal à balayage laser. La souche d'*A. brassicicola* utilisée exprime de manière constitutive la protéine GFP. Barre d'échelle = 100 μ m. (Photos IMAC)

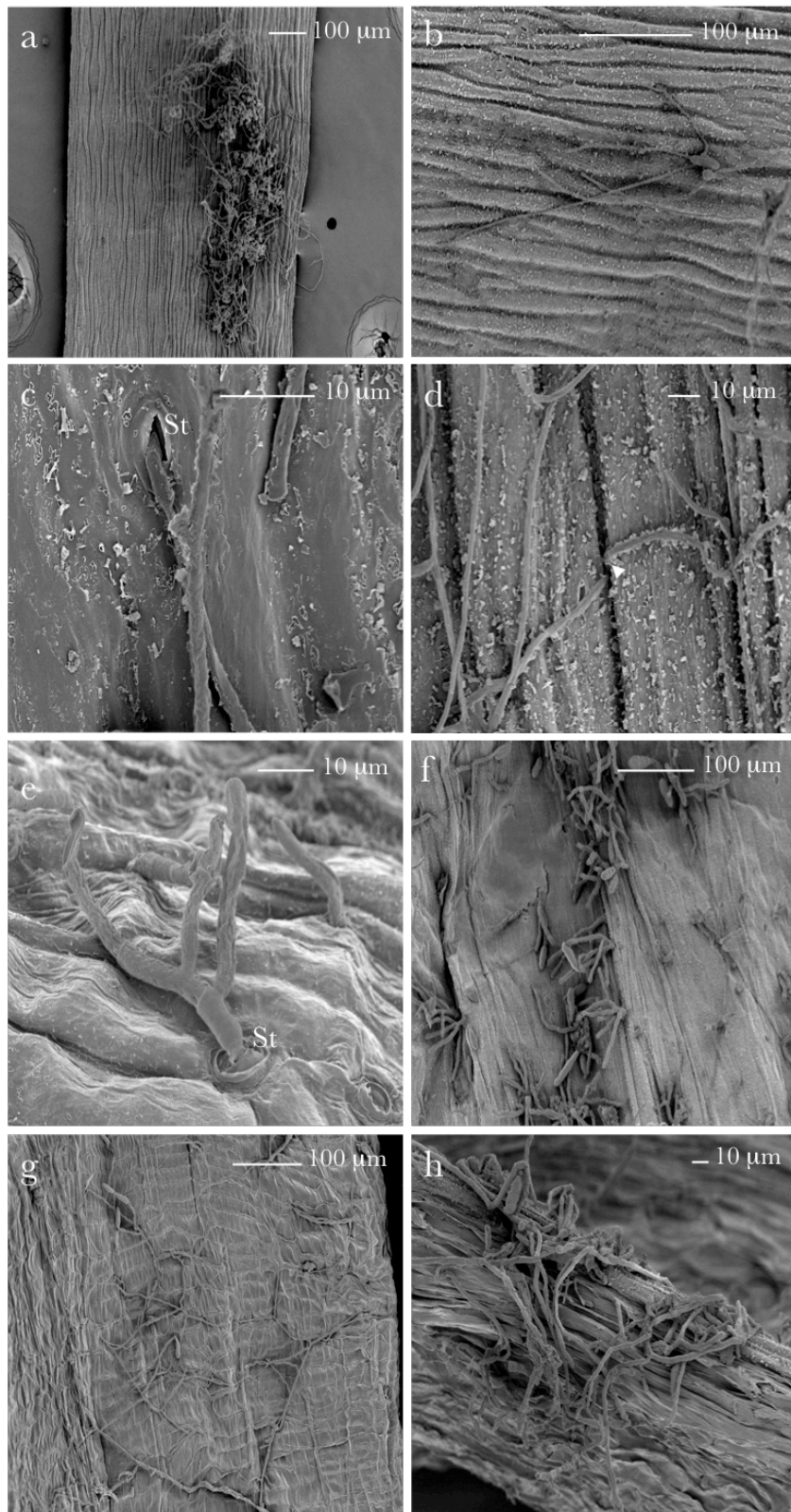


Figure 60. Illustrations de la localisation d'*A. brassicicola* sur des graines d'*A. thaliana* en microscopie électronique à balayage 10 jours après l'inoculation des siliques avec la souche sauvage d'*A. brassicicola*. **a.** Développement de mycélium sur la surface externe de la silique. **b.** Germination d'une conidie sur la surface externe de la silique. Pénétration d'un hyphes dans la silique via un stomate (**c.**), les jonctions cellulaires (**d.**) et le replum (**h.**). **e.** Réémergence d'un hyphes via un stomate. Formation de conidies sur les faces externe (**f.**) et interne (**g.**) de la silique. (Photos SCIAM)

des téguments des graines infectées ; les graines apparaissent de petite taille et déformées (**Figure 57e-f**). Ceci pourrait laisser présager d'un avortement embryonnaire (Maude et Humpherson-Jones, 1980 ; Chigri *et al.*, 2009), cependant, aucune information quant au degré de colonisation dans les tissus de la graine par le champignon ne peut être obtenu en MEB.

Nous avons donc envisagé une troisième méthode de microscopie qui permet de visualiser le champignon plus profondément dans la graine. Il s'agit de la microscopie confocale à balayage laser. Dans un premier temps, nous avons utilisé deux fluorophores différents qui marquent chacun un des deux partenaires de l'interaction. L'iodure de propidium (IP) est utilisé, entre autre, en biologie végétale comme marqueur des noyaux et des parois végétales (Truernit et Haseloff, 2008). Le Solophényl, décrit précédemment, a été utilisé comme marqueur des cellules fongiques. L'observation de graines infectées par *A. brassicicola* 10 jours après inoculation, et colorées avec les deux marqueurs cités précédemment, nous a permis de renforcer l'hypothèse d'une localisation intra-tégumentaire de ce champignon (**Figure 58**).

Afin de mieux comprendre le mode de colonisation des graines par *A. brassicicola*, l'étude de la localisation et du comportement du champignon sur les surfaces externes et internes de la silique a été entreprise. Dans un premier temps, la colonisation de siliques par une souche d'*A. brassicicola* exprimant constitutivement la GFP a été visualisée par microscopie confocale à balayage laser. Une croissance active du mycélium et de la conidiogénèse sont visibles à partir du point d'inoculation (**Figure 59A**). L'interaction des hyphes avec la surface externe de la valve est difficile à mettre en évidence même si des points de pénétration putatifs semblent visibles (**Figure 59B**). La nature des points de pénétration est compliquée à déterminer. Par conséquent, une approche en MEB a permis de préciser nos hypothèses. De la même manière que pour la microscopie confocale à balayage laser, nous avons constaté qu'à la surface des valves de la silique, le mycélium se développe dans différentes directions à partir de conidies germées présentes dans la zone d'inoculation (**Figure 60a-b**). Les hyphes peuvent ensuite pénétrer *via* les stomates présents à la surface externe des siliques ou directement au niveau des jonctions cellulaires (**Figure 60c-d**). Néanmoins, la zone préférentielle de pénétration à l'intérieur de la silique semble être le replum (**Figure 60h**). Les stomates permettent également la réémergence du mycélium (**Figure 60e**). Une conidiogénèse active, visible également macroscopiquement, est très fréquemment observée. Des événements similaires ont été constatés sur la face interne des valves de siliques (**Figure 60f-g**).

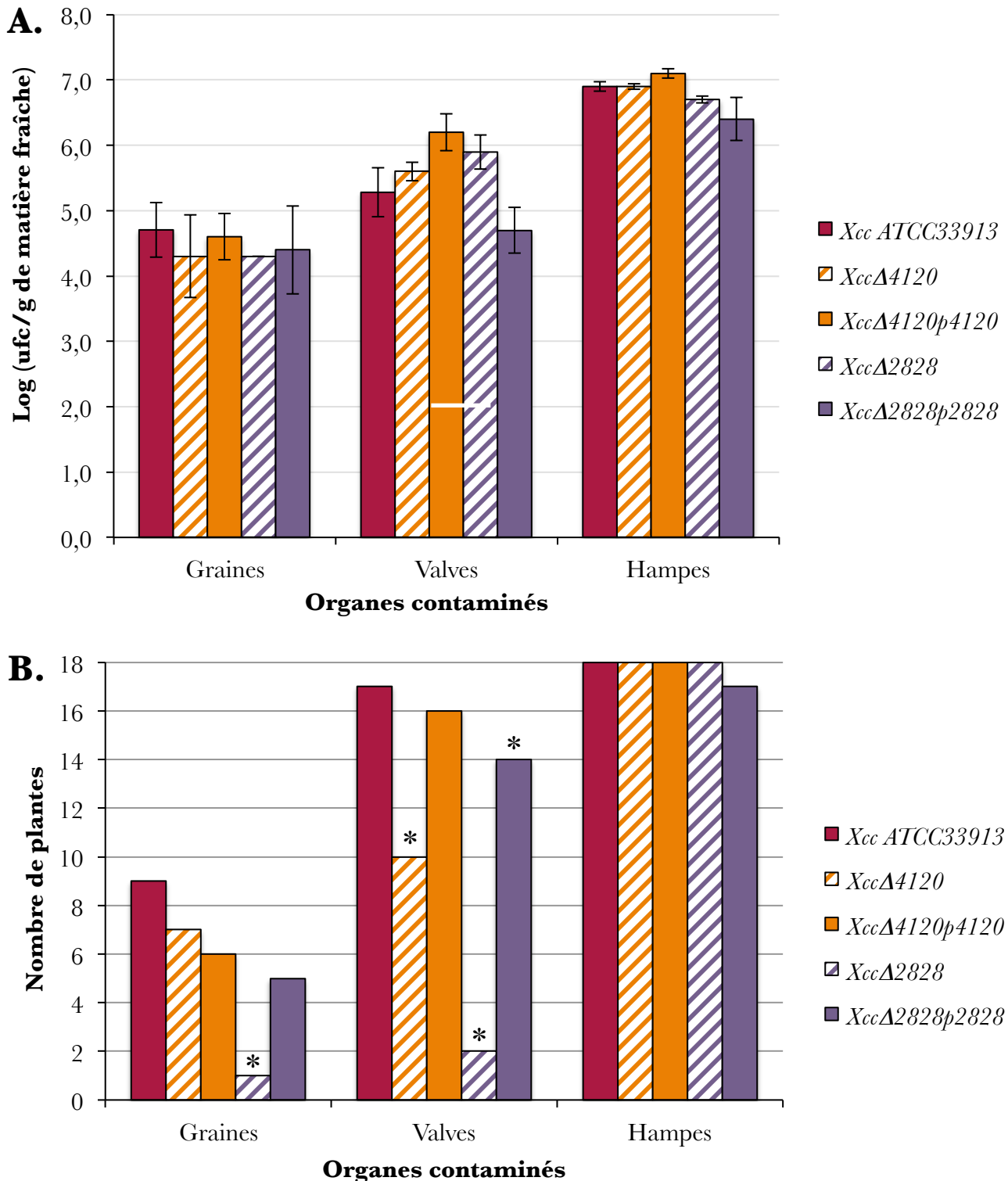


Figure 61. Analyse de la transmission à la semence d'*A. thaliana* par voie vasculaire de souches de *X. campestris* pv. *campestris* mutées au niveau de TBDTs impliqués dans l'utilisation du xylane (les simples mutants *XccΔ2828* et *XccΔ4120* et les souches complémentées *XccΔ2828p2828* et *XccΔ4120p4120*). **A.** Moyenne des tailles des populations bactériennes associées à chaque organe contaminé analysé et pour chaque souche. **B.** Proportion de plantes contaminées pour chaque organe analysé. Dans cette expérience, 18 plantes ont été analysées pour chaque souche. Les * indiquent que les proportions sont significativement différentes de celles de la souche sauvage selon le test du χ^2 .

Partie 3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission et la survie des agents pathogènes aux et sur les graines

I. La versatilité nutritionnelle

Dans le cas de l'interaction *X. campestris* pv. *campestris*/*A. thaliana*, la voie vasculaire semble être celle qui est privilégiée pour la réussite de la transmission des bactéries aux semences. Nous avons émis l'hypothèse que des TBDTs de *X. campestris* pv. *campestris* pouvaient être impliqués dans la transmission aux semences d'*A. thaliana* en modulant la capacité de la bactérie à coloniser la hampe florale de la plante hôte. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'étude de deux mutants de TBDTs impliqués dans l'utilisation du xylane chez *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. Il s'agit des deux simples mutants *XccΔ2828* et *XccΔ4120* et des deux souches complémentées *XccΔ2828p2828* et *XccΔ4120p4120*.

Les tailles de population associées aux différents organes analysés sont similaires pour chaque type d'organe et pour chaque souche entre chaque répétition biologique (**Figure 61A**). Dans le cas des graines, celles-ci varient de manière non significative entre 4,3 et 4,7 log (ufc/g de matière fraîche) entre les cinq souches utilisées lors de cette expérience. En revanche, des différences significatives apparaissent au niveau des fréquences de transmission à la graine entre la souche sauvage et le mutant *XccΔ2828* (**Figure 61B**). Cette dernière souche contamine les graines d'*A. thaliana* à une fréquence de 0,05 comparée à la souche sauvage qui se transmet à une fréquence de 0,5. Le mutant *XccΔ4120* ne présente pas de différence significative au niveau de sa capacité à se transmettre aux graines par rapport à la souche sauvage. Les souches complémentées *XccΔ2828p2828* et *XccΔ4120p4120* retrouvent partiellement un phénotype sauvage en terme de fréquence de transmission aux graines. Dans le cas de la colonisation des valves, la restauration du génotype sauvage chez les mutants complémentés semble moins efficace : à l'exception du mutant *XccΔ2828*, les autres souches présentent des fréquences inférieures à celle de la souche sauvage. La contamination régulière des hampes florales que ce soit en terme de tailles de populations bactériennes ou de fréquences de transmission, constitue un témoin positif de l'expérience et indique que les mutants utilisés colonisent le système vasculaire de la hampe florale de manière identique à la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. Les deux répétitions indépendantes menées nous ont permis de confirmer les résultats.

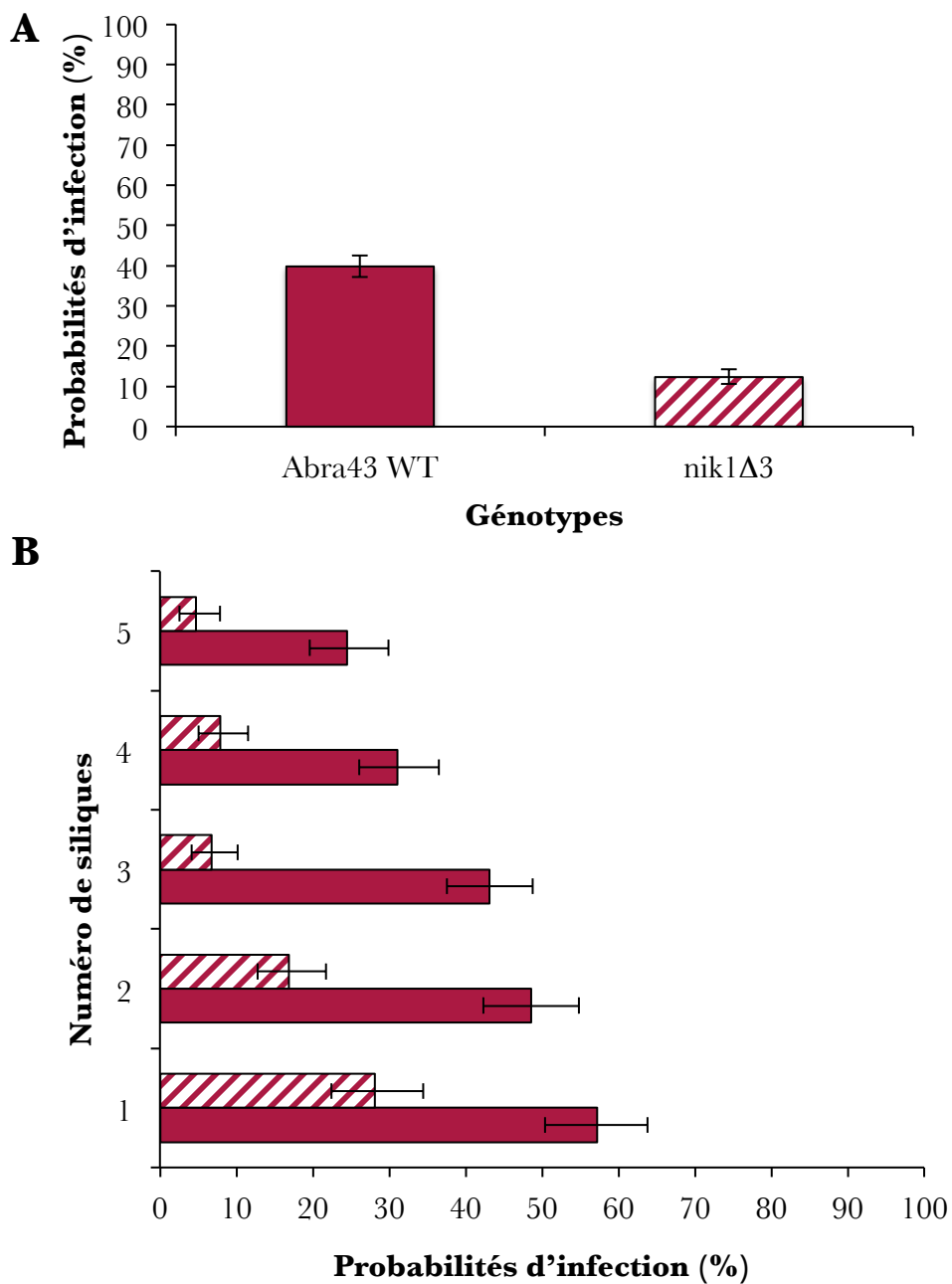


Figure 62. Influence du génotype d'*A. brassicicola* sur sa capacité à se transmettre aux graines d'*A. thaliana*. La capacité de transmission de deux génotypes d'*A. brassicicola*, Abra43 WT et *nik3Δ1*, aux graines d'*A. thaliana* (Ler). **A.** Capacités de transmission globale des deux génotypes **B.** Capacités de transmission de chaque génotype selon l'étage de la plante. La récolte a eu lieu 10 jours après l'inoculation (jpi). Les valeurs de probabilité d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.

II. La perception et la régulation de la transduction du signal de stress

La transmission d'agents pathogènes aux graines et leur maintien sur et/ou dans les graines nécessite la mise en place d'une réponse adaptative. Celle-ci permet de réguler l'expression de gènes codant des protéines impliquées, d'une part, dans la perception et la transduction du signal de stress, et d'autre part dans l'expression de cette réponse.

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent d'associer des mécanismes moléculaires à la phase de survie d'*A. brassicicola* et de *X. campestris* pv. *campestris* sur les graines d'*A. thaliana* grâce à une approche fonctionnelle par génétique inverse.

1. La perception du signal de stress

1.1. La perception du signal via une histidine kinase de type III d'*A. brassicicola*, osmosenseur de la voie de régulation de l'osmolarité cellulaire

Dans le cas du pathosystème *A. brassicicola*/*A. thaliana*, la voie indirecte par contact entre le fruit et les graines est celle qui est privilégiée pour la contamination des graines par le champignon. Ce dernier est confronté directement à une graine en phase de maturation. L'implication d'une protéine senseur, AbNik1, dans la mise en place d'une réponse adaptative face aux stress hydriques et osmotiques a été étudiée grâce au pathosystème *A. thaliana* / *A. brassicicola* lors de la phase de transmission à la semence.

Le mutant *nik1Δ3*, inactivé au niveau du gène *abnik1* (Dongo *et al.*, 2009), a été utilisé afin de déterminer sa capacité à contaminer les graines de l'écotype *Ler* d'*A. thaliana* par rapport à la souche sauvage *Abra43*. La souche *nik1Δ3* est significativement affectée dans sa capacité à se transmettre aux graines d'*A. thaliana Ler* (**Figure 62**). En effet, la probabilité d'infection des graines avec la souche sauvage est de 40% alors qu'elle n'est que de 12% après une inoculation avec la souche *nik3Δ1* (**Figure 62A**). Le gradient de transmission à partir de la silique n°1 jusqu'à la silique n°5, observé suite à une inoculation de la souche sauvage, est également observé dans le cas du mutant *nik3Δ1*. D'un point de vue statistique, les probabilités d'infection des graines sont significativement différentes que ce soit d'un point de vue global sur la plante, et spécifique au niveau de chaque silique (**Figure 62B**).

Ces données semblent indiquer qu'AbNIK1, impliquée dans la mise en place d'une réponse face à un stress osmotique, pourrait intervenir dans le succès de la transmission



Figure 63. Effets de la mutation d'*AbNik* sur la virulence d'*A. brassicicola* sur des feuilles d'*A. thaliana* *Ler*. Les feuilles d'*A. thaliana* ont été inoculées avec une suspension de conidies d'*A. brassicicola* *Abra43* WT (**A.**) et *nik1Δ3* (**B.**). Cinq feuilles permettent d'illustrer les symptômes obtenus six jours après inoculation.

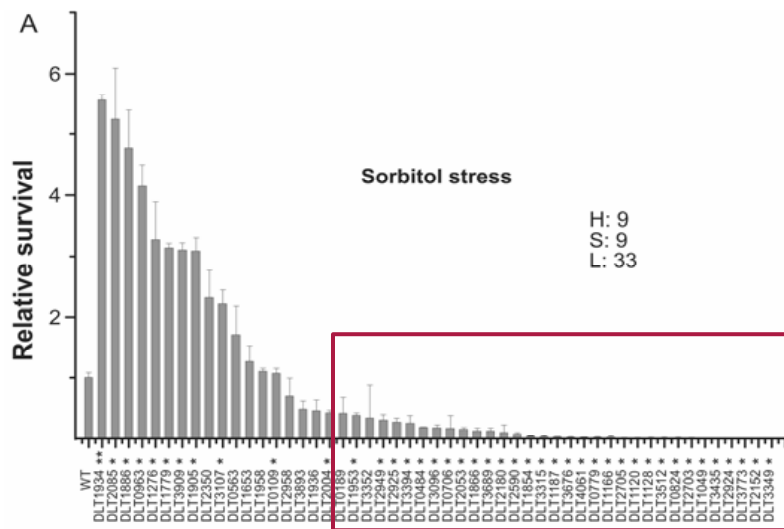


Figure 64. Comparaison de la réponse de 51 mutants d'insertion dans les régulateurs de réponse face à un stress osmotique par rapport à la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* (d'après Qian *et al.*, 2008). Les mutants significativement plus sensibles au stress osmotique sont encadrés en rouge.

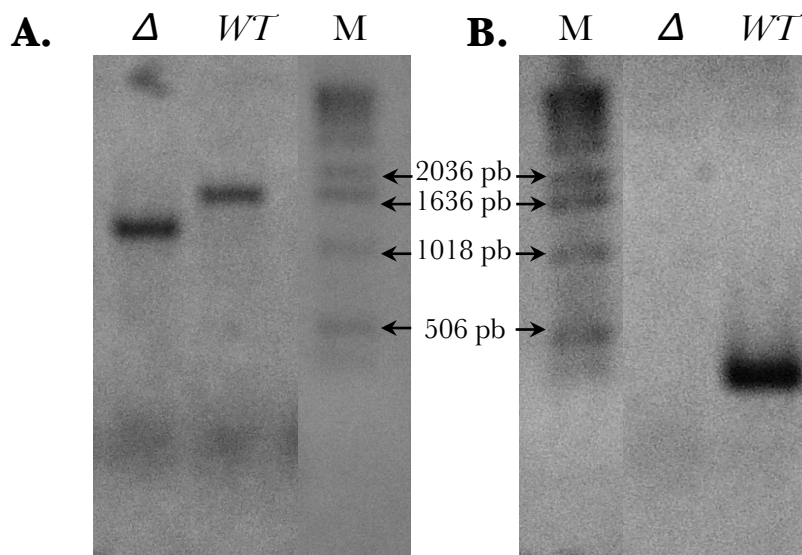


Figure 65. Résultat de l'amplification par PCR sur gel d'agarose 1,2% (p/v) à partir d'une matrice d'ADN de la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* et d'un clone du mutant *Xcc Δ 3435* avec un couple d'amorces situé (**A.**) dans les régions flanquantes du gène cible et (**B.**) dans le gène cible.

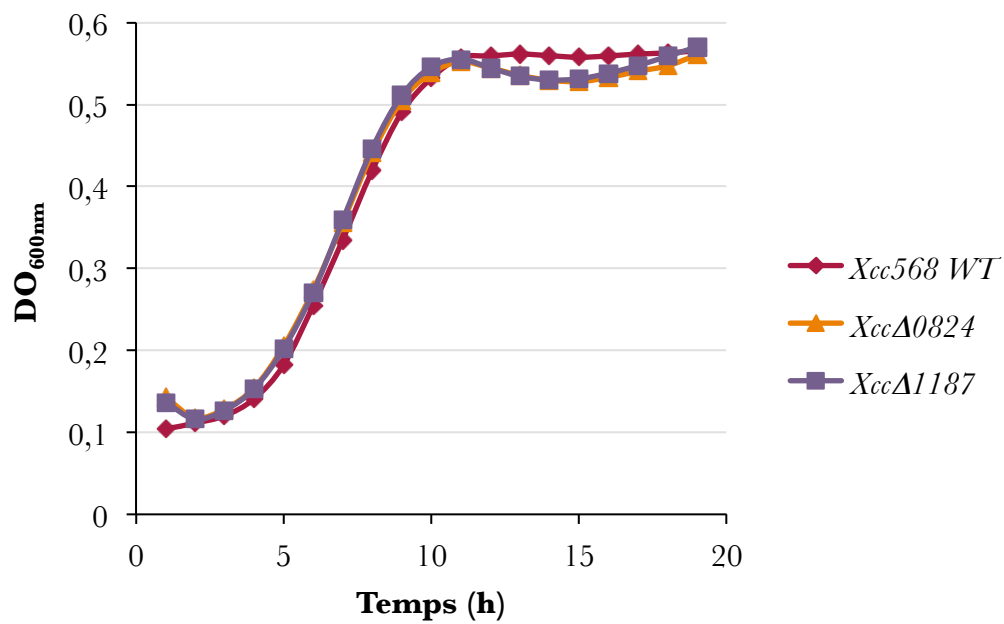


Figure 66. Dynamique de croissance par spectrophotométrie de la souche sauvage *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ0824* et *XccΔ1187* en TSB 10% (p/v).

d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana*. Cette implication semble spécifique puisque le mutant *nik1Δ3* présente une agressivité similaire à la souche sauvage au stade végétatif (**Figure 63**).

1.2. Les systèmes de transduction du signal à deux composantes chez *X. campestris* pv. *campestris*

L'implication de ces systèmes de transduction du signal a été évaluée uniquement dans l'optique d'identifier un rôle probable de ces protéines lors de la survie de la bactérie sur des graines. Sur la base de l'étude menée par Qian et ses collaborateurs (2008), six gènes codant des régulateurs de réponse chez *X. campestris* pv. *campestris* dont la déficience entraîne une sensibilité au stress osmotique ont été ciblés (**Figure 64**). Il s'agit des gènes *Xcc0824*, *Xcc1049*, *Xcc1187*, *Xcc2053*, *Xcc2152*, *Xcc3435*. Les mutants correspondants à ces gènes ont été construits par délétion, du codon start au codon stop, de chacun de ces gènes.

1.2.1. Validation des constructions

1.2.1.1. Absence du gène cible

La validation de la délétion de chaque mutant est faite par une vérification par PCR et l'absence du gène ciblé par séquençage. L'exemple illustré en **Figure 65** montre que la taille du produit d'amplification par PCR, obtenu avec un couple d'amorces entourant la région à déléter, pour la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* et les mutants. Dans le cas du mutant *XccΔ3435*, cette vérification est visible par la différence de taille due à l'absence du gène entre le mutant et la souche sauvage. Cela peut être conforté par l'absence de signal après une amplification du gène cible chez le mutant et la souche sauvage, grâce à des amorces situées de manière interne dans le gène. Le séquençage des produits d'amplification issus de matrice d'ADN des différents mutants montre que les gènes d'intérêts sont délévés depuis le codon d'initiation jusqu'au codon stop. Ces vérifications sont réalisées systématiquement pour chaque nouvelle construction.

1.2.1.2. Absence d'effet pléiotrope de la mutation

Les six mutants construits présentent des courbes de croissance similaires à celle de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. L'exemple de la croissance de deux mutants est comparé à la souche sauvage (**Figure 66**) même si les six souches construites présentent un phénotype identique. La durée des temps de latence, la pente de la courbe en phase

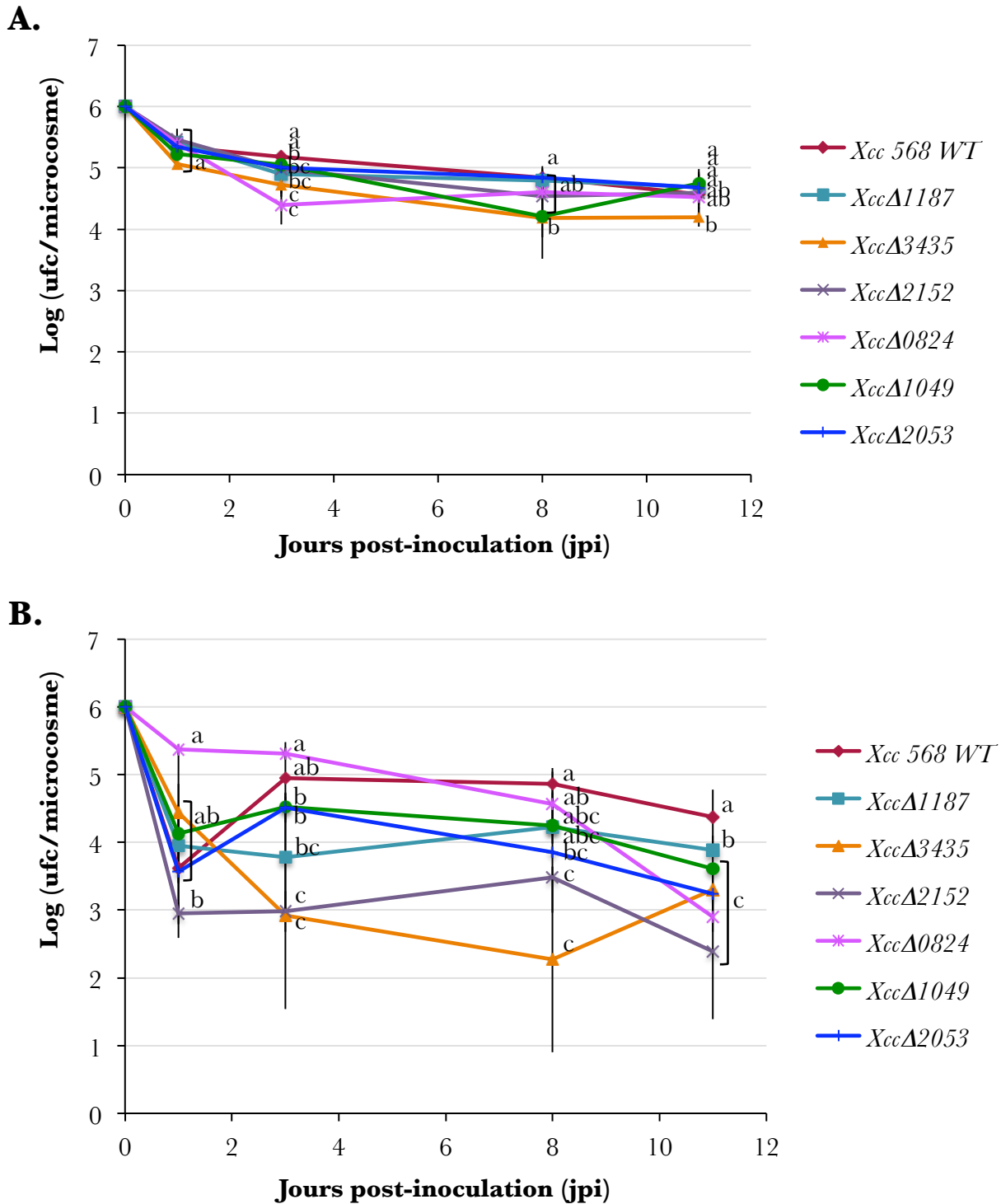
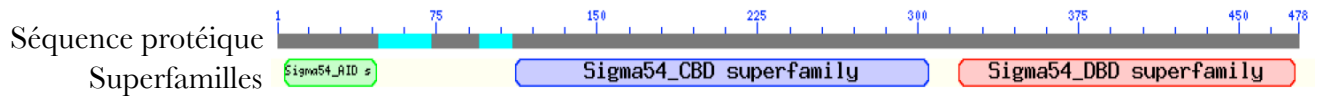


Figure 67. Dynamique des tailles de populations bactériennes associées aux microcosmes de la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ1187*, *XccΔ3435*, *XccΔ2152*, *XccΔ0824*, *XccΔ1049* et *XccΔ2053* à 4°C (**A.**) et 25°C (**B.**) selon une cinétique de temps. Les lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement ($p < 0,05$) différentes au sein d'un prélèvement entre souches pour un même traitement, sur la base des tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney.

A.



B.

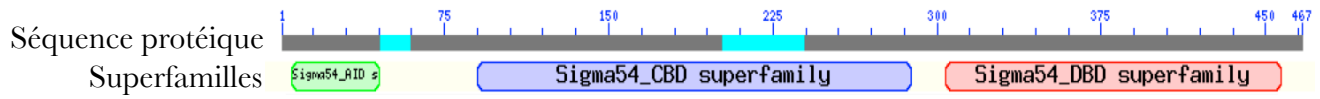


Figure 68. Représentation schématique des domaines protéiques spécifiques aux facteurs σ^{54} . **A.** Protéine Xcc1935 de *Xcc ATCC33913* **B.** Protéine Xcc2802 de *Xcc ATCC33913*. Les différents domaines représentés sont le domaine Activator Interacting Domain (AID), Core Binding Domain (CBD) et DNA Binding Domain (DBD).

exponentielle de croissance et la hauteur du plateau sont similaires. Ces résultats indiquent que les mutations ne semblent pas avoir d'effet pléiotrope.

1.2.2. Capacité de survie des mutants en microcosmes

Les microcosmes sont matérialisés par un morceau de papier Whatman sur lequel est déposé une suspension bactérienne calibrée. La capacité de survie à 4°C des mutants *Xcc*Δ0824, *Xcc*Δ1049, *Xcc*Δ1187, *Xcc*Δ2053, *Xcc*Δ2152, *Xcc*Δ3435 est identique à celle de la souche sauvage (**Figure 67A**). En revanche, les souches *Xcc*Δ0824, *Xcc*Δ2053, *Xcc*Δ2152, *Xcc*Δ3435 semblent être clairement affectées dans leur capacité à survivre en microcosmes à 25°C (**Figure 67B**). Ces différences se dessinent dès le troisième jour de conservation et sont significatives après 11 jours. Alors que la taille de population de la souche sauvage est d'environ $3,8 \times 10^4$ ufc/microcosme 11 jours post-inoculation (jpi), les tailles de population associées aux quatre souches citées précédemment sont comprises entre $9,1 \times 10^2$ ufc/microcosme et $2,5 \times 10^3$ ufc/microcosme et forment un groupe statistique significativement homogène et différent du précédent (Test de Mann-Whitney).

2. La transduction du signal de stress

2.1. Identification des facteurs σ^{54} chez *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 et analyse de leurs séquences nucléotidiques et protéiques

La souche de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 possède deux gènes qui codent des facteurs σ^{54} . Il s'agit des loci *Xcc1935* (*rpoN2*) et *Xcc2802* (*rpoN1*). La longueur de leurs séquences nucléotidiques est respectivement de 1 404 pb et 1 437 pb. Ces séquences codent, respectivement, des protéines de 467 et 478 acides aminés.

La présence de domaines conservés dans ces deux protéines confirme leur appartenance à la famille des facteurs σ^{54} . En effet, trois domaines protéiques caractérisent cette catégorie de facteurs σ . Il s'agit des domaines Activator Interacting Domain (AID), Core Binding Domain (CBD) et DNA Binding Domain (DBD). La **Figure 68** précise la localisation de ces derniers sur les séquences protéiques de RpoN2 et RpoN1. Le domaine AID est nécessaire à la fixation d'un activateur qui permet de former un complexe ouvert capable d'initier la transcription. Le domaine CBD permet une interaction directe avec le cœur de l'ARN polymérase. Enfin, le domaine DBD se situe de manière proximale à la liaison promoteur/holoenzyme. Une région

Tableau 3. Résultats des BLASTP (% d'identité, % de couverture associés à une e-value) à partir des séquences protéiques des deux facteurs σ^{54} dans différents genres bactériens.

Genres	Espèces	pathovar / sous-espèce	Souches	acc2825			acc2862			
				% d'identité	% de couverture	e-value	% d'identité	% de couverture	e-value	
Xanthomonas	compacta	<i>pc. compacta</i>	ATCC33913	100	100	0.0	41	99	1.00E-53	
			8004	41	97	2.00E-93	100	100	0.0	
			B100	100	100	0.0	41	99	1.00E-53	
			756C	99	100	0.0	41	99	4.00E-54	
			NCPPB1361	93	100	0.0	40	99	5.00E-51	
			pc. coccolensis	41	97	2.00E-94	93	100	0.0	
	compacta (avocado)	<i>pc. coccolensis</i>	RS-10	92	100	0.0	40	99	4.00E-49	
			NCPPB702	93	100	0.0	40	99	6.00E-51	
	oryzae	<i>pc. oryzae</i>	K.M.C.C.10331	93	100	0.0	40	99	3.00E-49	
			MAF9311018	40	97	1.00E-91	94	100	0.0	
			PSO99A	93	100	0.0	40	99	3.00E-49	
			BLS256	41	97	2.00E-94	94	100	0.0	
			pc. oryzae	93	100	0.0	40	99	1.00E-49	
			pc. citri	906	92	100	0.0	41	99	4.00E-50
		avenae	<i>pc. avenae</i>	F1	41	97	2.00E-94	94	100	0.0
				ICPBI0535	92	100	0.0	41	99	5.00E-49
				ICPBI1122	41	97	2.00E-93	94	100	0.0
				91-118	92	100	0.0	40	99	1.00E-49
				ATCC19865	92	100	0.0	40	99	2.00E-49
				GPE.PC.73	76	100	0.0	40	99	2.00E-50
	multiseptata	<i>pc. multiseptata</i>	JV3	72	100	0.0	40	100	5.00E-48	
			K279a	41	97	6.00E-93	76	100	0.0	
			R351-3	72	100	0.0	40	100	3.00E-47	
			SKA14	73	100	0.0	38	99	2.00E-45	
ME3			39	98	3.00E-97	64	99	0.0		
CFBP2967			36	98	2.00E-79	37	99	1.00E-56		
avenae		<i>pc. avenae</i>	CMR15	37	98	1.00E-89	42	99	1.00E-111	
			GMI100	37	98	2.00E-82	37	99	4.00E-85	
			UW551	38	98	3.00E-89	42	99	3.00E-112	
			Pa82	36	98	2.00E-79	37	99	1.00E-56	
			PS87	38	98	8.00E-88	42	99	3.00E-108	
			IP01669	37	98	3.00E-80	37	99	8.00E-97	
avenae	<i>pc. avenae</i>	M6K2	40	80	3.00E-78	45	81	5.00E-84		
		R24	38	98	6.00E-79	37	99	3.00E-56		
		12D	37	97	3.00E-89	42	99	8.00E-109		
		12J	36	98	1.00E-86	42	99	2.00E-109		
		5_2_473AA	38	98	1.00E-85	41	99	4.00E-84		
		5_2_569AA	37	98	2.00E-79	37	99	3.00E-54		
	avenae	<i>pc. avenae</i>	PM01	40	97	2.00E-109	43	100	1.00E-132	
			PV7	40	97	3.00E-103	43	100	4.00E-126	
			2_1_26	39	97	2.00E-109	43	100	4.00E-132	
			SBW25	39	97	2.00E-108	44	99	7.00E-133	
			PS5	39	97	4.00E-108	43	99	3.00E-113	
			FT13	39	96	8.00E-105	43	98	3.00E-131	
avenae		<i>pc. avenae</i>	PS13	39	97	3.00E-106	43	99	3.00E-132	
			NM6	39	97	1.00E-107	42	99	3.00E-131	
			Cs 7	39	97	3.00E-108	42	99	3.00E-132	
			NCPPB581	39	97	4.00E-108	42	99	8.00E-132	
			si-2250	39	97	4.00E-108	42	99	8.00E-132	
			sihaci	39	97	5.00E-108	42	99	6.00E-132	
	avenae	<i>pc. avenae</i>	DC3000	39	97	1.00E-107	42	99	2.00E-132	
			Max13	39	97	1.00E-107	42	99	2.00E-132	
			T1	39	97	1.00E-107	42	99	3.00E-132	
			K40	39	97	9.00E-107	42	99	3.00E-131	
			MB2280PF	39	97	2.00E-107	42	99	1.00E-132	
			7_8	39	96	2.00E-107	42	99	4.00E-132	
avenae		<i>pc. avenae</i>	MD91313	39	97	2.00E-107	42	99	6.00E-132	
			glennae	39	97	4.00E-107	41	99	2.00E-124	
			B72Ba	39	97	1.00E-106	42	99	2.00E-131	
			642	39	97	2.00E-106	42	99	3.00E-131	
			aveti	39	97	1.00E-106	42	99	2.00E-130	
			MB2273PF	39	97	2.00E-106	42	99	2.00E-130	
	avenae	<i>pc. avenae</i>	1448A	39	97	2.00E-106	42	99	2.00E-130	
			MB1072PF	38	97	3.00E-106	42	99	1.00E-130	
			NCPPB 3335	39	97	4.00E-108	42	99	8.00E-132	
			12-X	39	97	5.00E-108	42	99	1.00E-129	
			L19	39	97	6.00E-108	42	99	3.00E-125	
			GPF2	39	96	1.00E-107	43	98	1.00E-131	
avenae		<i>pc. avenae</i>	NM19	39	97	1.00E-107	42	99	3.00E-138	
			GB1	39	96	5.00E-106	43	98	2.00E-128	
			S16	40	96	6.00E-106	43	98	3.00E-127	
			KF2440	39	97	2.00E-107	42	99	2.00E-129	
			NK-01	40	96	7.00E-104	43	98	4.00E-128	
			A1501	41	96	2.00E-93	42	91	3.00E-110	
	avenae	<i>pc. avenae</i>	DSM 1166	40	96	1.00E-106	42	98	1.00E-125	
			ATCC17388	40	96	2.00E-106	42	98	4.00E-125	
			L46	39	97	1.00E-106	43	99	1.00E-130	
			NCPPB1361	39	96	3.00E-105	43	98	1.00E-131	
			CFBP1361	39	97	1.00E-99	42	100	3.00E-125	
			DSM 11018	39	97	1.00E-95	41	100	3.00E-131	
avenae		<i>pc. avenae</i>	E17156	38	94	1.00E-99	41	97	7.00E-117	
			E17159	39	97	2.00E-96	41	100	2.00E-122	
			E1661	40	97	4.00E-98	42	100	3.00E-124	
			K12	39	97	1.00E-99	42	100	2.00E-128	
avenae		<i>pc. avenae</i>	O127	40	97	3.00E-100	42	100	7.00E-128	
			O100	40	96	3.00E-100	42	100	3.00E-128	
	si C28		33	97	8.00E-72	36	99	4.00E-74		
	5A		34	97	1.00E-71	36	99	7.00E-80		
avenae	<i>pc. avenae</i>	F2	34	96	5.00E-70	35	99	7.00E-77		
		K84	38	71	3.00E-64	37	80	2.00E-63		
avenae	<i>pc. avenae</i>	si-Minnesota si-A-603	40	97	1.00E-102	42	100	3.00E-128		
		si-sear Typ1 str. CT18	40	97	2.00E-102	42	100	9.00E-128		

hautement conservée, connue sous le nom de « RpoN-box », est située en position C-terminale et représente la signature des protéines de type σ^{54} .

2.2. Analyse phylogénétique des facteurs σ^{54} dans différents genres bactériens

La distribution au sein du genre *Xanthomonas* et de genres bactériens proches du ou des homologues fonctionnels aux gènes *Xcc1935* et *Xcc2802* a été étudiée en recherchant dans un premier temps les séquences protéiques homologues par BLASTP. Chacune des deux protéines, *Xcc1935* et *Xcc2802*, a servi de « séquence requête » pour rechercher des homologues. Les pourcentages d'identité associés aux e-value sont présentés dans le **Tableau 3**. Ces résultats indiquent que dans certains genres bactériens deux gènes codant potentiellement des facteurs σ^{54} sont identifiés. Il s'agit des genres *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Xylella* ou *Ralstonia*. En revanche, un seul gène est identifié dans d'autres genres tels que *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Salmonella* ou *Agrobacterium*. Ainsi, l'objectif de ce travail est de réaliser une étude phylogénétique pour tenter de comprendre l'évolution de ces gènes. Un jeu de données contenant l'ensemble des séquences nucléotidiques obtenues par recherche TblastN dans Genbank correspondant à l'ensemble des séquences protéiques identifiées par BLASTP a été constitué et a permis de construire un premier arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-Joining avec 1 000 simulations (**Figure 69A**). Une séquence homologue à *Xcc2802* d'une souche du genre *Caulobacter* a été choisie comme « outgroup » pour enraciner l'arbre. Les séquences provenant des souches d'*Agrobacterium* forment avec celle de *Caulobacter* un cluster distinct des séquences provenant des autres souches. Quatre clusters se distinguent dans cet ensemble de gènes appartenant à différentes souches et permettent de regrouper les gènes : 1. des souches de *Pseudomonas*, 2. des souches de *Xylella*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomas* qui possèdent un gène homologue à *Xcc2802*, 3. des souches de *Ralstonia* et 4. des souches de *Xylella*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomas* qui possèdent un gène homologue à *Xcc1935*. Le même jeu de données a été utilisé pour construire un arbre phylogénétique par la méthode de Maximum de vraisemblance (ou Maximum Likelihood, ML) avec 1 000 simulations (**Figure 69B**). Le même type d'observation peut être réalisé en ce qui concerne *Agrobacterium* et *Caulobacter*. Un cluster bien soutenu par une forte valeur de bootstrap (98%) signifiant la robustesse de la branche sépare l'ensemble des gènes des souches de *Ralstonia* des autres séquences. Ce cluster se scinde ensuite en deux sous-groupes correspondant chacun à un gène différent. Le second cluster faiblement soutenu (48%) est

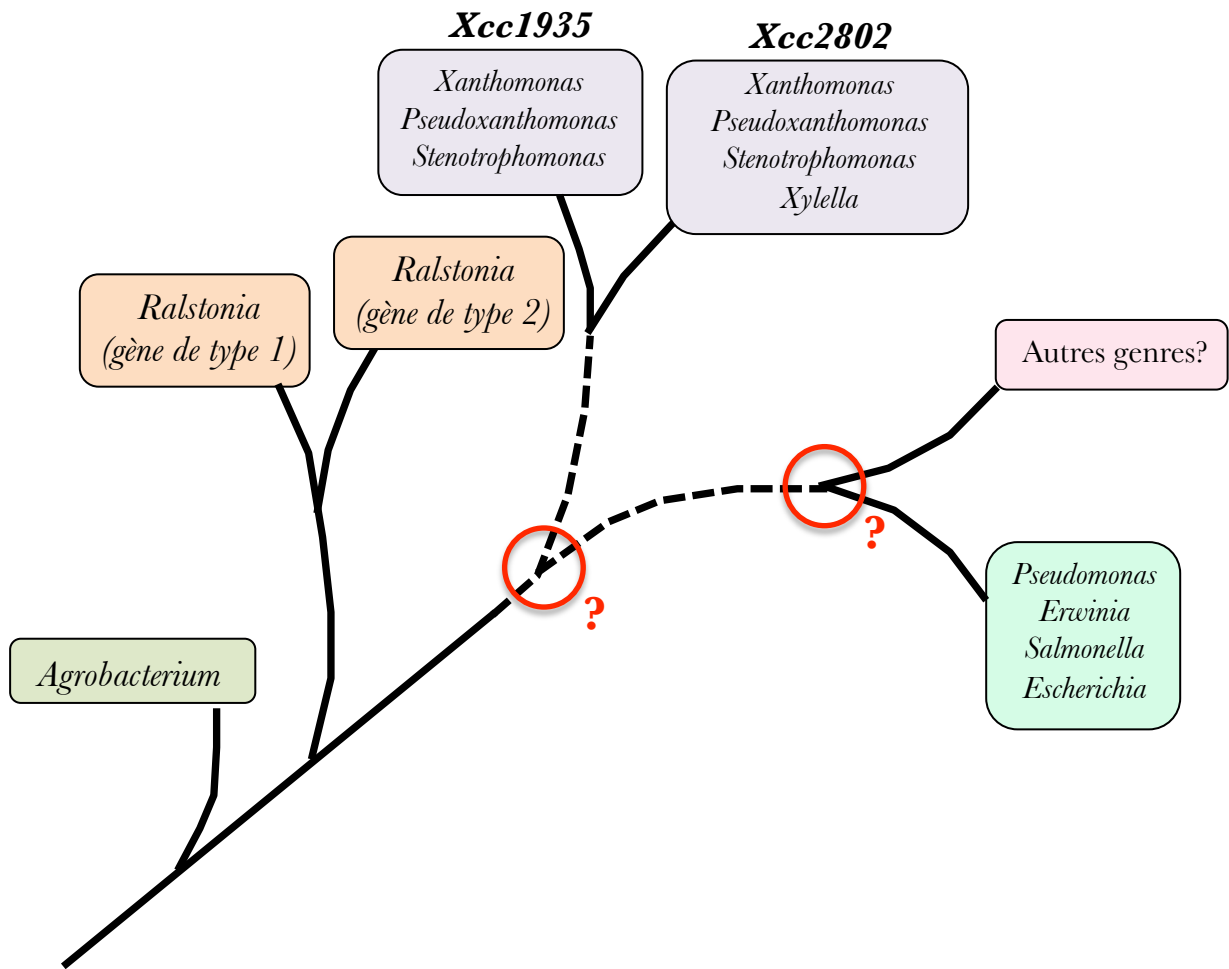


Figure 70. Représentation schématique de l'histoire évolutive potentielle des gènes codant le (ou les) facteur(s) σ^{54} dans différents genres bactériens. Les traits en pointillés indiquent une zone présentant des incertitudes. De la même manière, les cercles rouge indiquent une divergence hypothétique qui reste encore à démontrer.

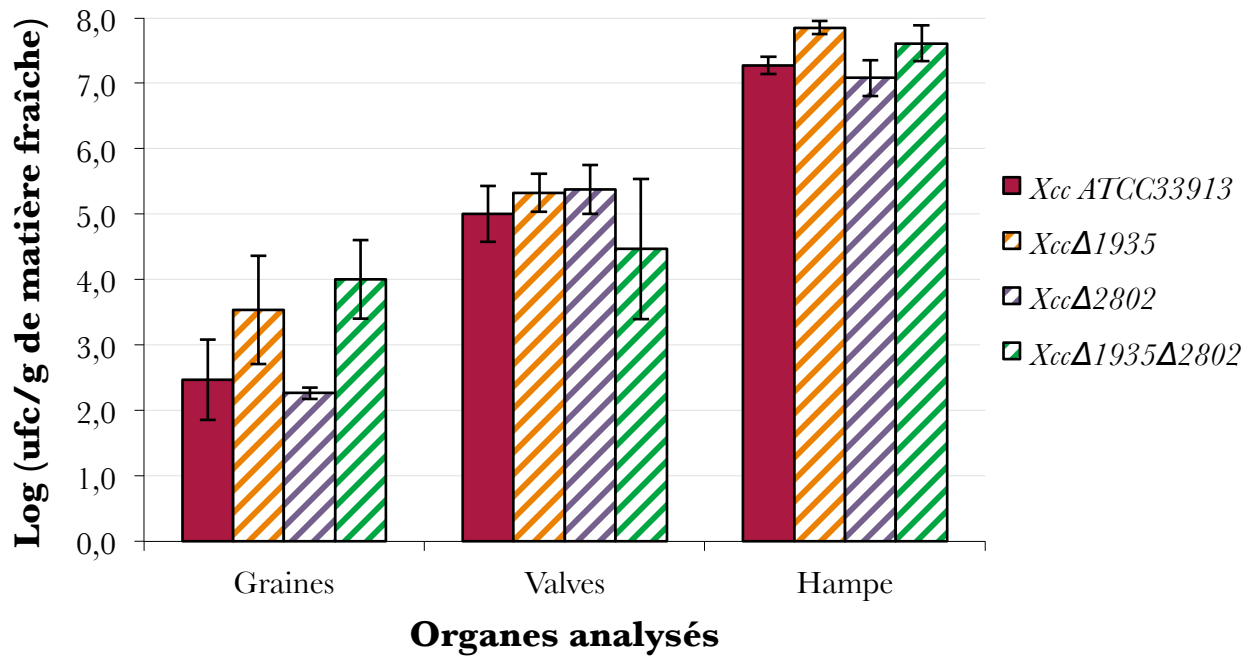
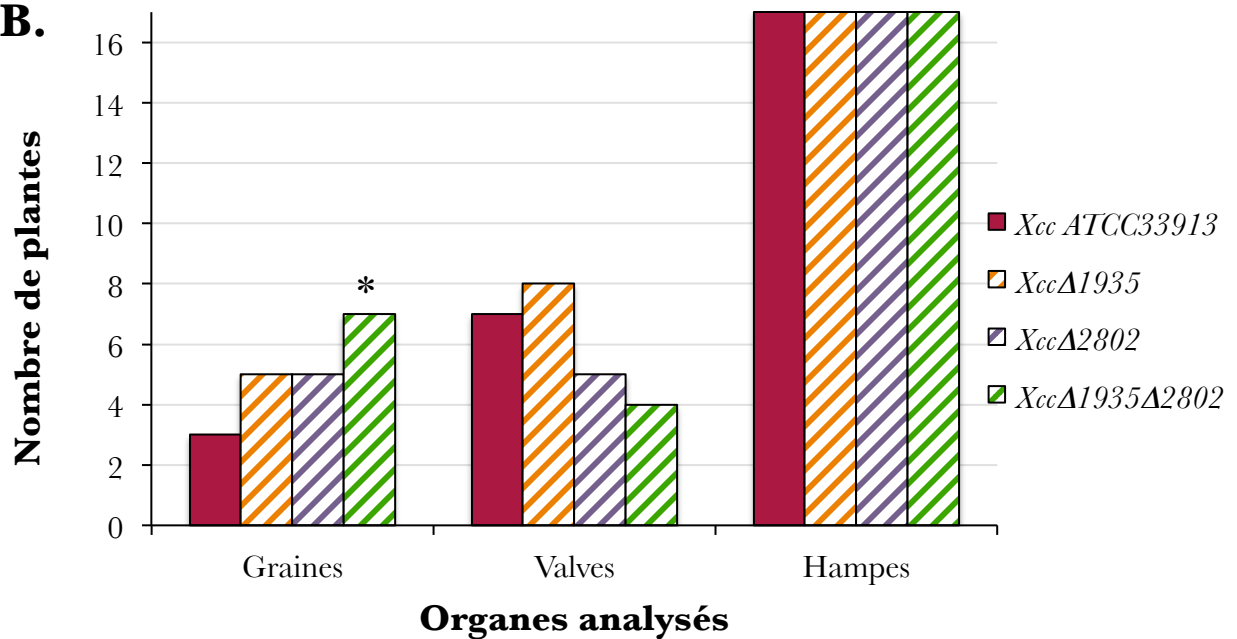
A.**B.**

Figure 71. Analyse de la transmission à la semence d'*A. thaliana* par voie vasculaire de souches de *X. campestris* pv. *campestris* mutées au niveau de facteurs σ^{54} (les simples mutants *XccΔ1935* et *XccΔ2802* et le double mutant *XccΔ1935Δ2802*). **A.** Moyenne des tailles des populations bactériennes associées à chaque organe contaminé analysé et pour chaque souche. **B.** Proportion de plantes contaminées pour chaque organe analysé. Dans cette expérience, 18 plantes ont été analysées pour chaque souche. Les * indiquent que les proportions sont significativement différentes de celles de la souche sauvage selon le test du Khi².

composé de deux sous-groupes qui sont à l'inverse chacun fortement soutenu (87% et 98%). Ils regroupent, respectivement, d'une part l'ensemble des séquences des souches de *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas* et *Xylella* et d'autre part, les séquences des souches de *Pseudomonas*, d'*Erwinia*, de *Salmonella* et d'*Escherichia*. La présence au sein des différents représentants des genres bactériens proches de *Xanthomonas* d'une ou de deux copies d'un gène *rpoN* pose la question de leur histoire évolutive, y a-t-il eu plusieurs événements de duplication indépendants, y a-t-il eu plusieurs événements de perte ? La **Figure 70** retrace le scénario évolutif le plus parcimonieux en terme d'acquisitions et de pertes que l'on a établi sur la base de l'arbre obtenu en maximum de vraisemblance (Figure 66B). Dans ce scénario, il y aurait eu 2 événements de duplication indépendants le premier au sein des *Agrobacterium* et le second chez l'ancêtre commun aux genres *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas* et *Xylella*. Le genre *Xylella* aurait ensuite perdu la copie correspondant à l'homologue de *Xcc1935*.

2.3. Rôles des facteurs σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 dans la transmission à la graine

L'influence de la capacité à former des biofilms par *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 dans la transmission à la semence a été étudiée à partir du pathosystème mis en place et par l'intermédiaire de souches mutées au niveau des facteurs σ^{54} : les deux simples mutants *Xcc Δ 1935*, *Xcc Δ 2802* et le double mutant *Xcc Δ 1935Xcc Δ 2802*.

Les tailles de population associées aux différents organes analysés sont similaires pour chaque type d'organe et pour chaque souche entre chaque répétition biologique (**Figure 71A**). En revanche, des différences significatives apparaissent au niveau des fréquences de transmission à la graine entre la souche sauvage et le double mutant *Xcc Δ 1935 Δ 2802* (**Figure 71B**) : cette dernière souche se transmet significativement de manière plus efficace que la souche sauvage. Les simples mutants *Xcc Δ 1935* et *Xcc Δ 2802* ne présentent pas de différence significative en terme de fréquence de transmission aux graines par rapport à la souche sauvage. Les fréquences de contamination des valves et des hampes florales sont non significativement différentes de celles de la souche sauvage.

2.4. Rôles des facteurs σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 dans la survie sur graines

Pour étudier la ou les fonctions de ces protéines chez *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913, une approche fonctionnelle par mutagenèse dirigée a été menée. Grâce à une

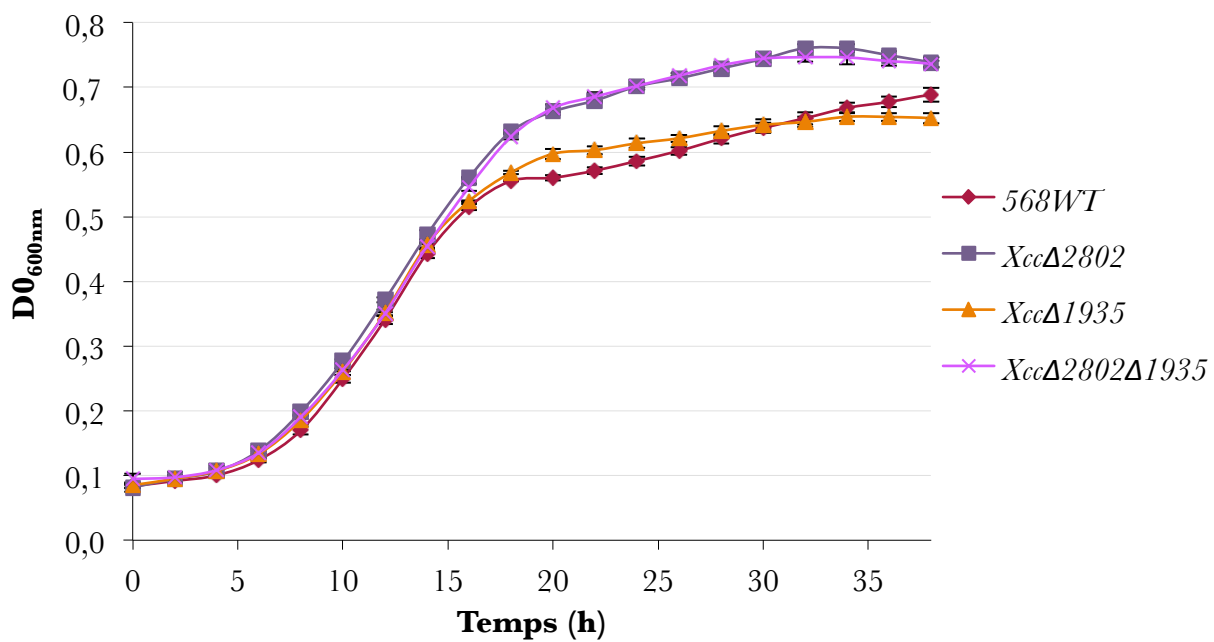


Figure 72. Dynamique de croissance par spectrophotométrie de la souche sauvage *Xcc* ATCC33913, des simples mutants *Xcc*Δ1935, *Xcc*Δ2802 et du double mutant *Xcc*Δ1935*Xcc*Δ2802 en TSB 10% (p/v).

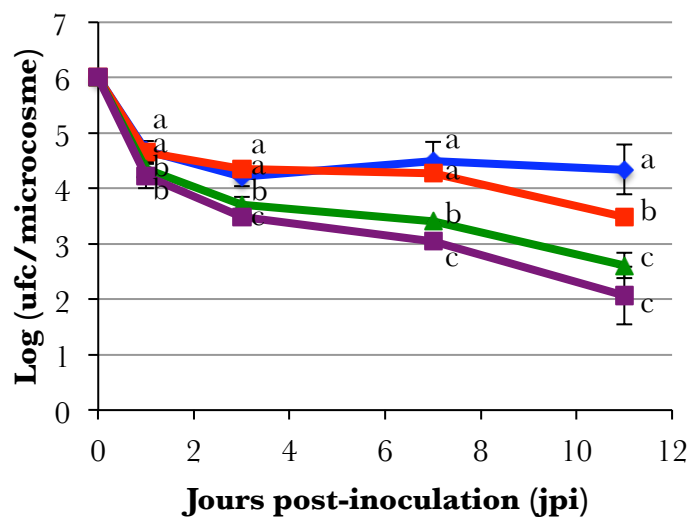
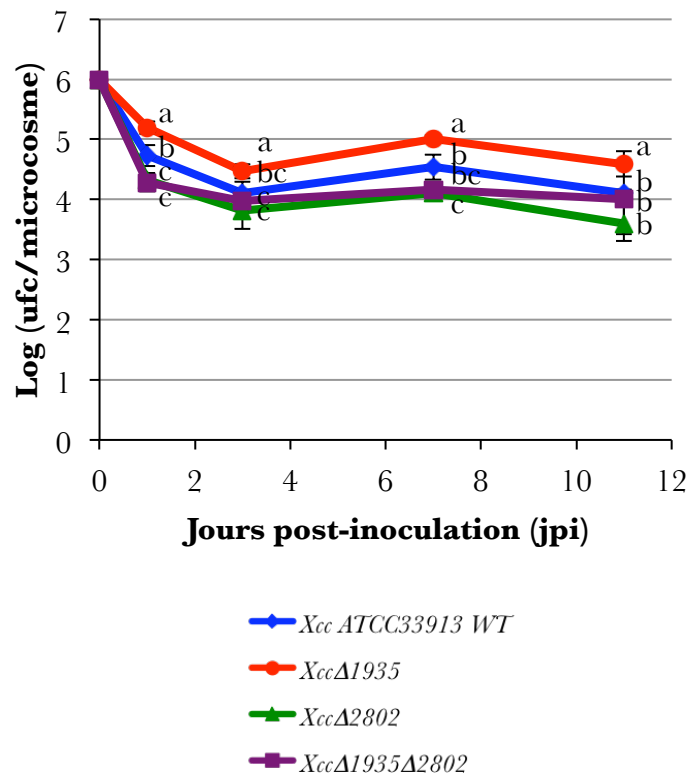


Figure 73. Dynamique des tailles de populations bactériennes associées aux microcosmes de la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ1935*, *XccΔ2802* et du double mutant *XccΔ1935XccΔ2802* à 4°C (A.) et 25°C (B.) selon une cinétique de temps. Les lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement ($p < 0,05$) différentes au sein d'un prélèvement entre souches pour un même traitement, sur la base des tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney.

collaboration avec l'équipe de Matthieu Arlat et Emmanuelle Lauber du LIPM de Toulouse, nous disposons des mutants de délétion simples dans chacun des gènes (*Xcc1935*, *Xcc2802*) codant un facteur σ^{54} et du double mutant. L'absence d'effet pléiotrope des mutations a été vérifiée par la dynamique de croissance *in vitro* des mutants par rapport au parent (**Figure 72**). Les courbes obtenues montrent qu'en phase exponentielle (entre 0 h et 18 h), en milieu TSB 10 %, la croissance des mutants est inchangée par rapport à celle de la souche sauvage. Cependant, la délétion du gène *Xcc1935* semble entraîner un léger effet bénéfique, en début de phase stationnaire visible jusqu'à 36 h de culture.

2.4.1. Capacité de survie des mutants σ^{54} en microcosmes

La capacité de survie *in vitro* de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 et des mutants *Xcc Δ 1935*, *Xcc Δ 2802* et *Xcc Δ 1935 Δ 2802* sur des microcosmes a été évaluée par un suivi des dynamiques de populations associées à ces microenvironnements. L'influence de la température de conservation a également été évaluée en quantifiant la survie des différentes souches à 4°C et à 25°C (**Figure 73**).

A 4°C, les tailles des populations bactériennes, comprises entre 1×10^4 et 1×10^5 ufc/microcosme, restent stables au cours du temps pour les quatre souches. En revanche, les souches *Xcc Δ 2802* et *Xcc Δ 1935 Δ 2802* voient leur capacité de survie, à 25°C, significativement diminuées par rapport à celle de la souche sauvage, et cela, dès le premier jour de conservation. Cette différence significative s'accroît dès trois jours de conservation, où la souche *Xcc Δ 1935 Δ 2802* présente une taille de population significativement inférieure à celle du mutant *Xcc Δ 2802*, et se confirme sept jours après conservation. Cette différence entre ces deux génotypes s'atténue au bout de 11 jours de conservation. Le simple mutant *Xcc Δ 1935*, quant à lui, présente un comportement intermédiaire par rapport à la souche sauvage et aux souches *Xcc Δ 2802* et *Xcc Δ 1935 Δ 2802*. En effet, les populations dans les macérats (5×10^3 ufc/microcosme) diminuent significativement uniquement à partir de 11 jours de conservation. Cette expérimentation a été menée une seconde fois de manière indépendante et des tendances similaires ont été observées.

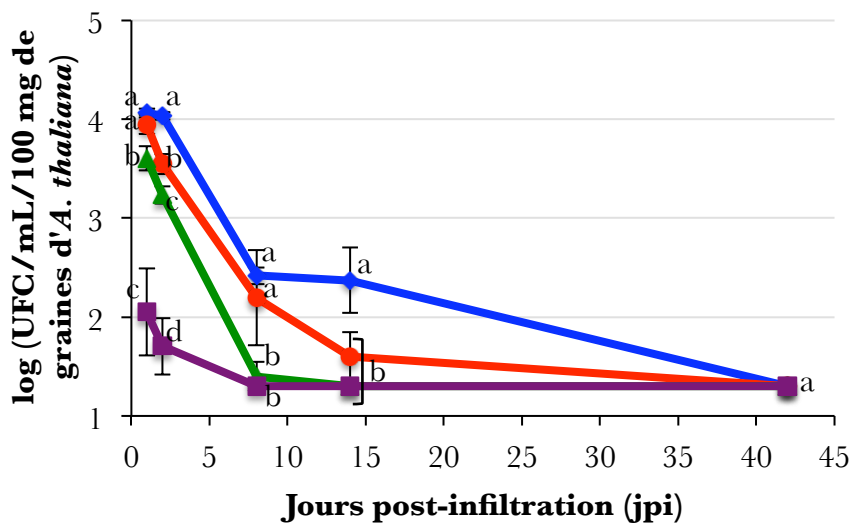
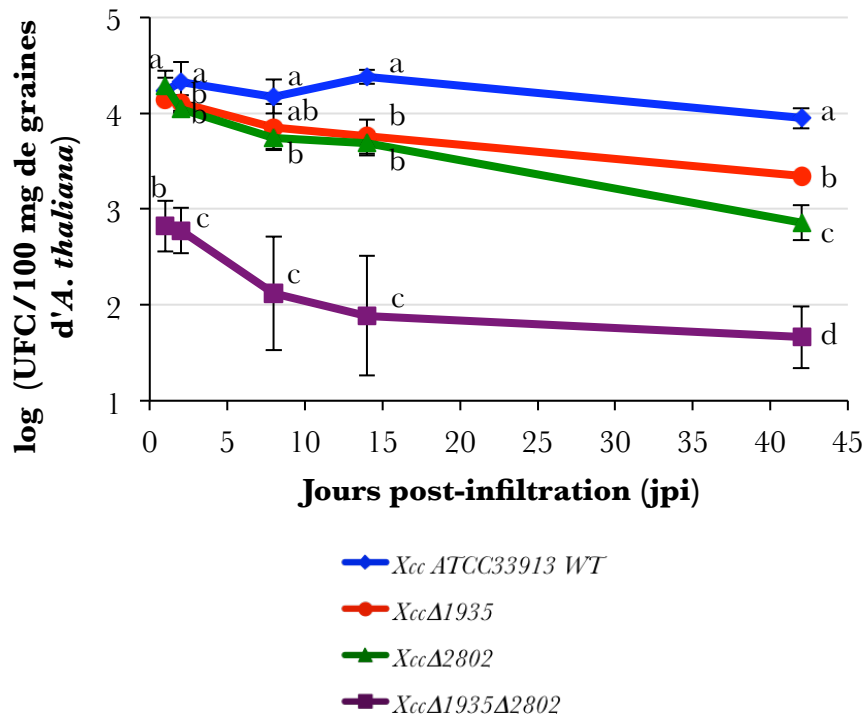


Figure 74. Dynamique des tailles de populations bactériennes de la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ1935*, *XccΔ2802* et du double mutant *XccΔ1935XccΔ2802* lors d'une cinétique de survie sur des graines d'*A. thaliana* à 4°C (**A.**) et 25°C (**B.**). Les lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement ($p < 0,05$) différentes au sein d'un prélèvement entre souches pour un même traitement, sur la base des tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney.

2.4.2. Survie des mutants σ^{54} sur des graines d'*A. thaliana* artificiellement contaminées

Dans le but de confirmer les observations précédentes effectuées *in vitro* en microcosmes, il est indispensable d'étudier la capacité de survie des différentes souches *in vivo* sur des graines d'*A. thaliana* Sf-2. Des graines artificiellement contaminées avec chacune des souches par infiltration sous vide sont conservés dans pièces où la température est maintenue soit à 4°C soit à 25°C.

La survie de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* est stable à 4°C au cours du temps. Les populations associées avoisinent 1×10^4 ufc/100 mg de graines. En revanche, les simples mutants *Xcc* Δ 1935 et *Xcc* Δ 2802 sont significativement affectés dans leur capacité de survie sur des graines dès le troisième jour suivant l'infiltration par rapport à la souche sauvage (**Figure 74**). Cette tendance s'accroît au cours du temps pour ces deux souches. En effet, au bout de 14 jours de conservation sur des graines, les tailles de population bactériennes associées aux macérâts sont environ 5 fois inférieures à celles de la souche sauvage pour les deux simples mutants. A 42 jours post-infiltration, le parent sauvage présente toujours une capacité de survie plus élevée par rapport à *Xcc* Δ 1935 et *Xcc* Δ 2802, mais une différence de phénotype apparaît entre ces deux dernières souches. Les tailles de population du mutant *Xcc* Δ 2802 sont trois fois inférieures à celles de la souche *Xcc* Δ 1935. La souche *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 présente également des difficultés à se conserver à 4°C au cours du temps sur des graines d'*A. thaliana* (**Figure 74A**). Une caractéristique intéressante de cette souche concerne son comportement dans les 20 premières heures suivant l'infiltration. Alors que les trois autres souches présentent des tailles de population supérieures à 1×10^4 ufc/100 mg de graines, celles du double mutant sont dix fois inférieures.

Ce même phénotype est observé, de manière significative, pour la souche *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 à 25°C mais, également pour le simple mutant *Xcc* Δ 2802 (**Figure 74B**). Les tailles de populations associées pour ces deux souches sont, respectivement 50 et 2 fois inférieures à celles de la souche sauvage et du simple mutant *Xcc* Δ 1935 sont de 1×10^4 ufc/100 mg de graines. Pour l'ensemble des quatre souches, une forte diminution des tailles de population est constatée entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour de conservation à 25°C. Dans le cas de la souche sauvage, les populations associées au 3^{ème} jour de conservation sont d'environ 1×10^4 ufc/100 mg de graines et chutent à $2,6 \times 10^2$ ufc/100 mg de graines au bout de 7 jours.

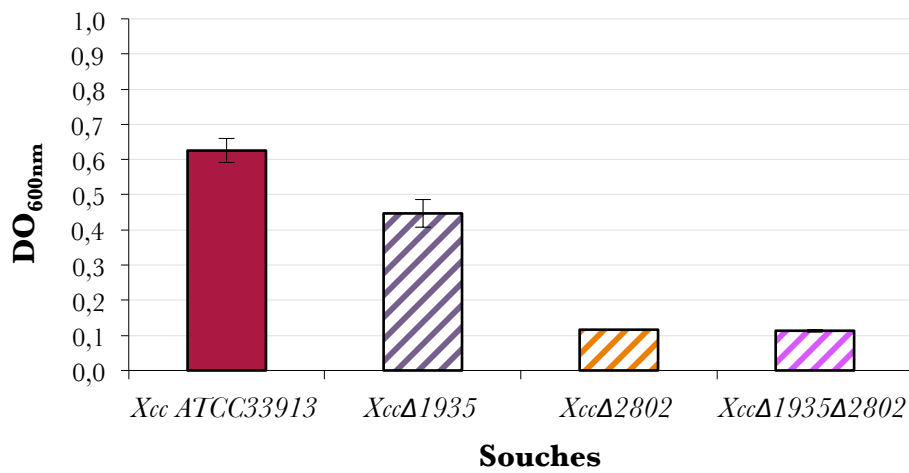


Figure 75. Capacité d'adhésion sur une plaque de polypropylène de la souche sauvage *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ1935*, *XccΔ2802* et du double mutant *XccΔ1935XccΔ2802*.

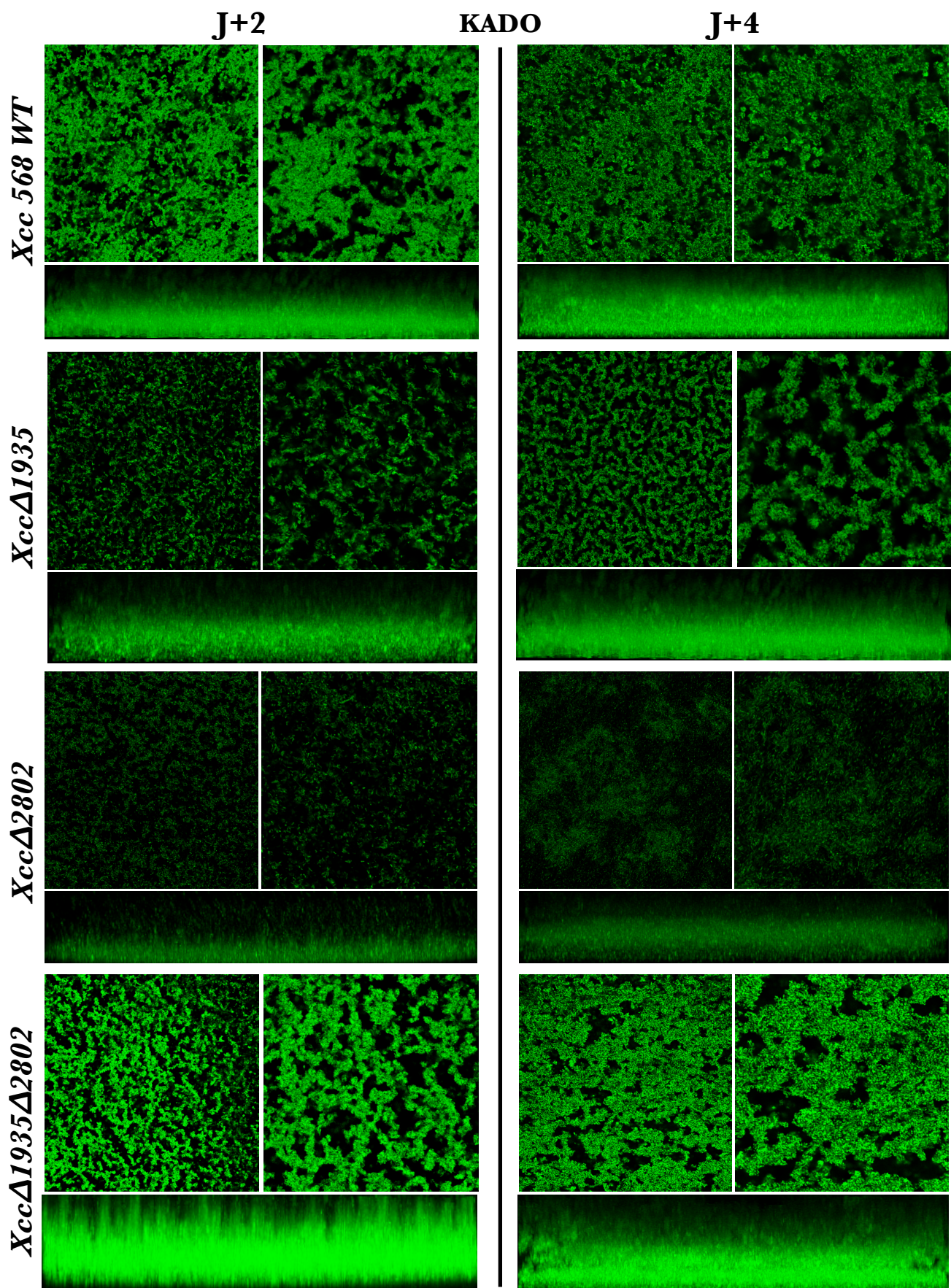


Figure 76. Cinétique d'observation (J+2 et J+4) au microscope confocal à balayage laser d'agrégats bactériens formés sur une lame de verre après une culture des souches *Xcc ATCC33913* WT, *Xcc*Δ1935, *Xcc*Δ2802 et *Xcc*Δ1935*Xcc*Δ2802 exprimant constitutivement la GFP dans du milieu KADO. Pour chaque condition, une photo d'un plan focal et d'un empilement de plans verticaux permet de visualiser le biofilm. (Photos IMAC)

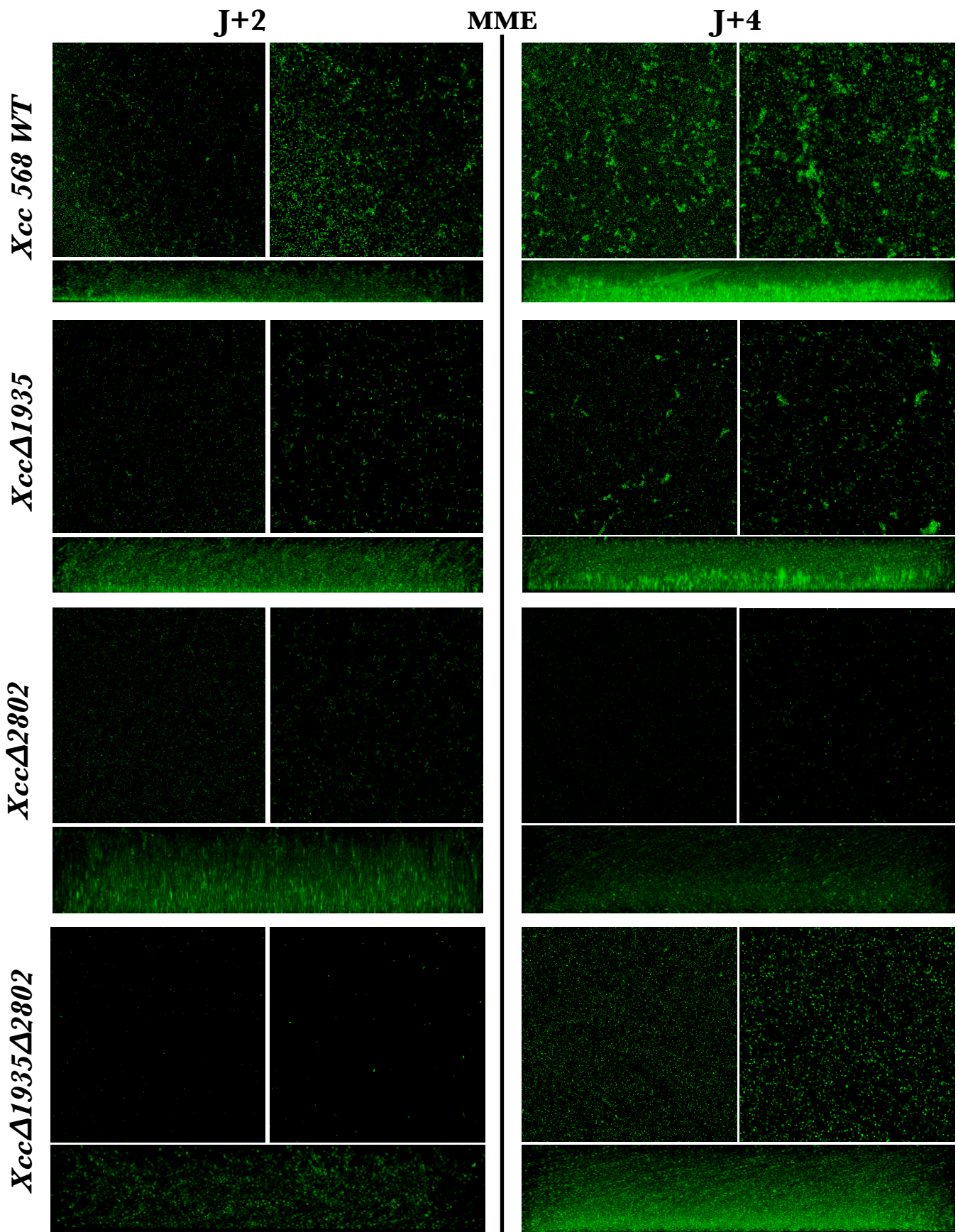


Figure 77. Cinétique d'observation (J+2 et J+4) au microscope confocal à balayage laser d'agrégats bactériens formés sur une lame de verre après une culture des souches *Xcc ATCC33913* WT, *Xcc* Δ1935, *Xcc* Δ2802 et *Xcc* Δ1935*Xcc* Δ2802 exprimant constitutivement la GFP dans du milieu MME. Pour chaque condition, une photo d'un plan focal et d'un empilement de plans verticaux permet de visualiser le biofilm. (Photos IMAC)

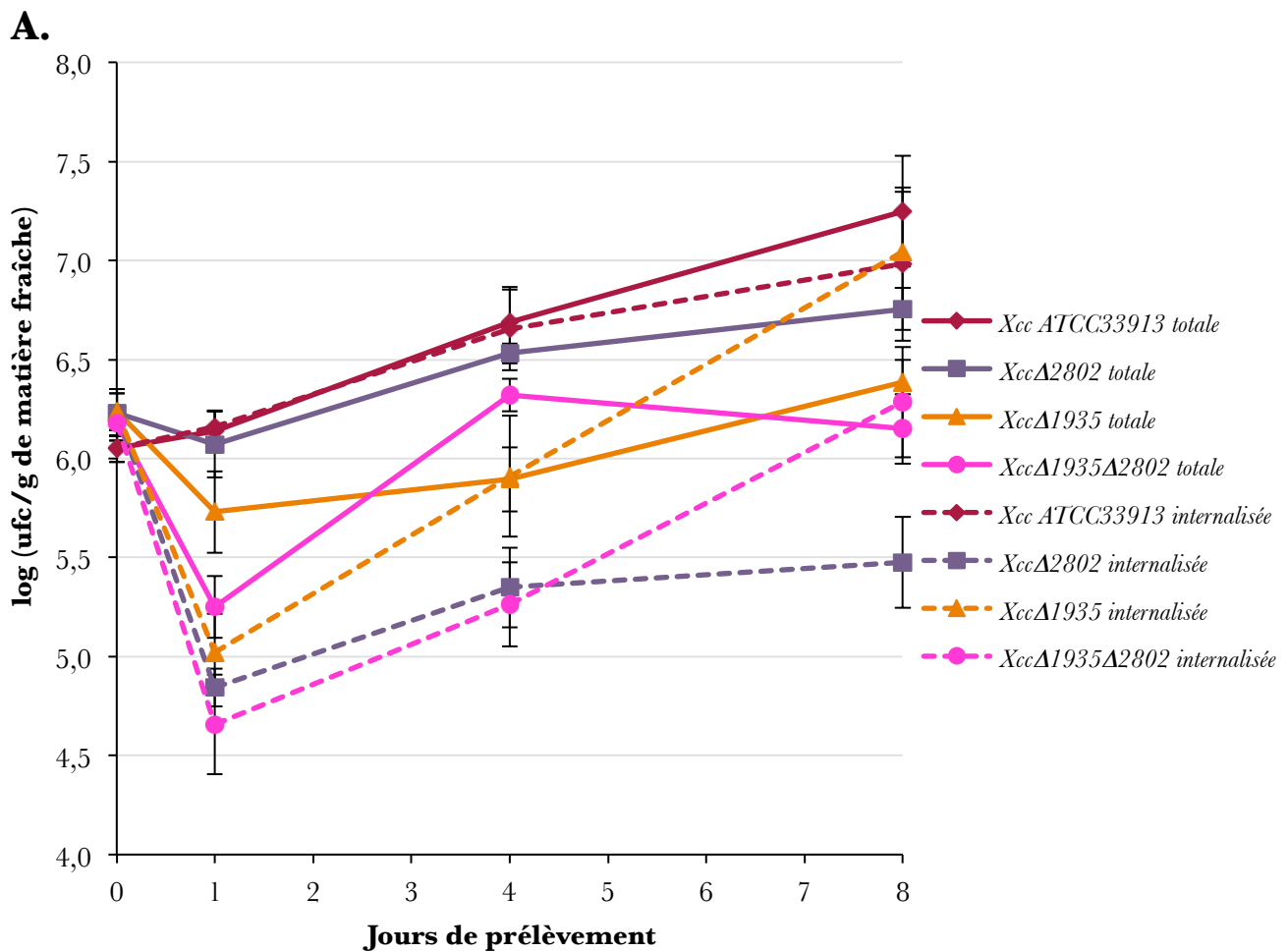
2.4.3. Capacité d'adhésion des mutants σ^{54} *in vitro*

La survie du double mutant *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 sur des graines d'*A. thaliana* est significativement altérée quelle que soit la température de conservation, et cela, dès les premières heures suivant l'infiltration. Ainsi, l'hypothèse d'une déficience au niveau de ses capacités d'adhésion a été émise et a, ainsi, été quantifiée *in vitro*.

La capacité d'adhésion des bactéries à une surface abiotique est mesurée par la quantification au spectrophotomètre du crystal violet incorporé dans les cellules adhérentes au polypropylène (PP). L'adhésion du mutant *Xcc* Δ 1935 au polypropylène est significativement réduite par rapport à celle de la souche sauvage (**Figure 75**). De plus, les mutants *Xcc* Δ 2802 et *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 semblent ne plus être capables d'adhérer *in vitro* au polypropylène. Leur capacité d'adhésion est significativement inférieure à la fois au mutant *Xcc* Δ 1935 et à la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*.

2.4.4. Capacité d'agrégation des mutants σ^{54} *in vitro*

L'agrégation des cellules bactériennes entre elles, étape qui suit directement l'adhésion, permet la formation d'une structure tridimensionnelle (biofilm). La souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* et les mutants σ^{54} ont été marqués de manière stable et constitutive avec la protéine fluorescente GFP. La capacité d'agrégation des différents mutants σ^{54} et de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* a été évaluée en observant directement les agrégats par microscopie confocale à balayage laser suite à une culture statique sur une lamelle de verre. L'influence de la richesse du milieu de culture sur la formation d'agrégats bactériens a également été prise en compte car les souches ont été mises en culture à la fois dans du milieu KADO (**Figure 76**) et MME (**Figure 77**). La formation d'agrégats bactériens est visible dès le deuxième jour de culture sur lame de verre dans du milieu KADO pour la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* (**Figure 76**). Au bout de 4 jours de culture, l'épaississement du biofilm *via* la synthèse d'exopolysaccharides est visible. Aucun agrégat bactérien n'a été observé dans le cas de la souche *Xcc* Δ 2802 au cours de la cinétique d'observation. Des regroupements de cellules bactériennes sont visibles quatre jours après l'inoculation sans pour autant que ces cellules soient enchâssées dans une matrice exopolysaccharidique. Le mutant *Xcc* Δ 1935 présente un comportement intermédiaire par rapport aux deux souches précédentes. Même si des agrégats bactériens sont clairement visibles, la densité du biofilm reste toutefois inférieure à celle du biofilm de la souche sauvage



B.

Souches	Jours de prélèvement		
	J+1	J+4	J+8
<i>Xcc</i> ATCC33913	>100	>100	65
<i>Xcc</i> Δ2802	5	9	9
<i>Xcc</i> Δ1935	20	>100	>100
<i>Xcc</i> Δ1935 Δ2802	34	13	52

Figure 78. Dynamique des tailles de populations de *Xcc* et des mutants σ^{54} dans la phyllosphère d'*A. thaliana*. **A.** La flore totale (traits pleins) et internalisée (traits pointillés) de chaque souche a été dénombrée 2 h, 1 j, 4 j et 8 jours après l'inoculation. Les points indiquent la moyenne obtenue pour trois échantillons indépendants à chaque date. Les lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement ($p < 0,05$) différentes au sein d'un prélèvement entre souches pour un même traitement, sur la base des tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney. **B.** Evolution des pourcentages de population bactérienne internalisée par rapport à la population totale calculés sur les moyennes de population pour chacune des souches et à chaque point de prélèvement. Les valeurs supérieures à 100% signifient que les populations internalisées sont supérieures aux populations totales.

de *X. campestris* pv. *campestris*. De manière surprenante, le biofilm formé par le double mutant présente un aspect similaire à celui de la souche sauvage après une culture de deux et quatre jours dans du milieu KADO.

Le développement d'agrégats semble plus lent après une culture dans un milieu tel que le MME (**Figure 77**). Au bout de quatre jours de culture, de petits agrégats sont visibles dans la culture de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. L'absence totale et une plus faible quantité d'agrégats sont, respectivement, visibles pour les souches *XccΔ2802* et *XccΔ1935* comme dans le cas du milieu KADO. Enfin, la culture du double mutant dans du milieu MME permet d'obtenir un phénotype différent de celui de la souche sauvage. En effet, des agrégats de très petite taille de la souche *XccΔ1935XccΔ2802* sont visibles à 4 jours de culture dans du milieu MME et la structure du biofilm apparaît très peu dense dans le plan vertical lorsqu'une vue en Y d'empilements de plans est réalisée.

2.5. Survie et colonisation de feuilles d'*A. thaliana*

Le suivi de la dynamique des populations bactériennes, suite à un dépôt d'un inoculum sur des nervures préalablement perforées, permet d'étudier les différentes phases de colonisation en surface puis de manière interne dans les tissus foliaires. Cela nous a permis d'étudier le comportement des différents mutants σ^{54} dans la phyllosphère. Un traitement au chloroforme de certaines feuilles permet d'avoir accès uniquement aux populations internalisées dans les tissus foliaires. Les tailles des populations bactériennes épiphytes et internalisées de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* augmentent au cours des jours qui suivent l'inoculation (**Figure 78**). En revanche, les tailles de populations bactériennes totales associées aux mutants *XccΔ1935* et *XccΔ1935Δ2802* sont significativement inférieures à celle de la souche sauvage dès le premier jour suivant l'inoculation et tout au long de la cinétique de temps (**Figure 78A**). La taille des populations internalisées des trois mutants est significativement inférieure à celle du parent dès le premier jour de l'expérimentation. Bien que leurs populations augmentent au cours des jours suivants, celles des mutants *XccΔ2802* et *XccΔ1935Δ2802* restent significativement inférieures à celles de la souche sauvage au cours du temps (**Figure 78B**). En revanche, les populations internalisées du mutant *XccΔ1935* retrouvent un niveau similaire à celui de la souche sauvage huit jours après inoculation. Ainsi, la totalité de la population de la souche sauvage et internalisée représente 65% de la population totale. En proportion, le mutant *XccΔ2802* est très affecté par rapport à la souche sauvage dans sa capacité d'internalisation et/ou de colonisation du système vasculaire de

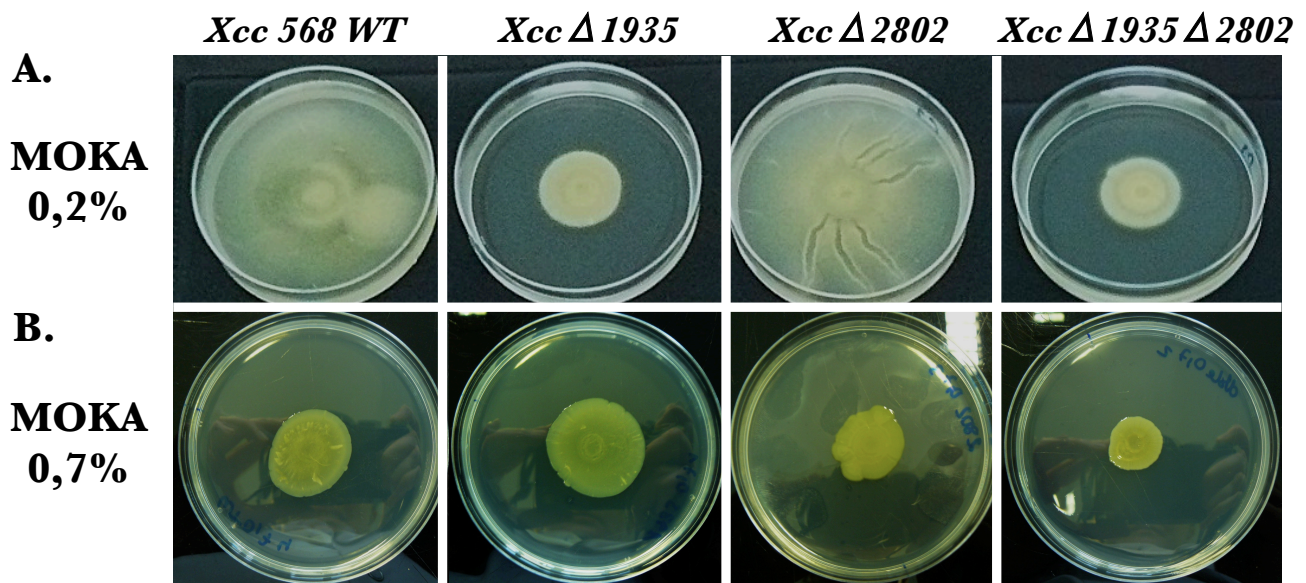


Figure 79. Mobilité de *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔ1935*, *XccΔ2802* et du double mutant *XccΔ1935XccΔ2802* sur **A.** MOKA 0,2% d'agar (p/v) et **B.** MOKA 0,7% d'agar (p/v).

l'arabette. En effet, la proportion de la population totale de *Xcc*Δ2802 internalisée est de 9%. En revanche, pour les autres mutants *Xcc*Δ1935 et *Xcc*Δ1935Δ2802 seule la capacité totale de croissance est affectée, mais pas la capacité d'internalisation et ou de colonisation du système vasculaire (52%). L'évolution de ces pourcentages de population internalisée par rapport à la population totale illustre que dès le premier jour de survie, tous les mutants sont clairement affectés dans leur survie comparativement à la souche sauvage. Bien que le mutant *Xcc*Δ2802 parvienne à croître *in planta*, les populations internalisées associées à cette souche n'augmentent pas au cours du temps. Le double mutant parvient à atteindre des proportions de populations internalisées semblables à celle de la souche sauvage de la même manière que le mutant *Xcc*Δ1935.

2.6. Mobilité par nage (swimming) et essaimage ou contraction-rétraction (swarming/twitching) des mutants σ^{54}

Des expériences de mobilité de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* et des trois mutants σ^{54} ont été menées sur des milieux plus ou moins gélifiés (0,2% et 0,7%). Cela permet d'étudier deux types de mobilité : le swimming sur 0,2% d'agar et le swarming sur 0,7% d'agar, toutes deux dépendantes du flagelle. La mobilité par retraction-contraction (twitching) est également visualisable en surface d'un milieu solide et dépend d'un pilus de type IV

Dans le cas d'une souche parfaitement mobile par swimming, telle que la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 ou du mutant *Xcc*Δ2802, un voile jaunâtre est visible dans le milieu de culture semi-liquide (**Figure 79A**) dès quatre jours après inoculation du milieu. En revanche, dans le cas des mutants *Xcc*Δ1935 et *Xcc*Δ1935Δ2802, aucun trouble n'est visible, ce qui semble indiquer que ces souches sont incapables de se mouvoir par swimming.

Une mobilité par twitching se visualise par l'accroissement circulaire de la goutte d'inoculum bactérien déposée à la surface du milieu visqueux. En comparant la mobilité par twitching de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* avec celles des mutants, une diminution de celle-ci est observable uniquement pour les souches *Xcc*Δ2802 et *Xcc*Δ1935Δ2802 (**Figure 79B**). Le simple mutant *Xcc*Δ1935 semble ne pas être affecté dans sa capacité à se mouvoir par twitching. Aucune mobilité de type swarming repérable par des formes particulières de colonies en surface (Kearns, 2010) n'a été observée.

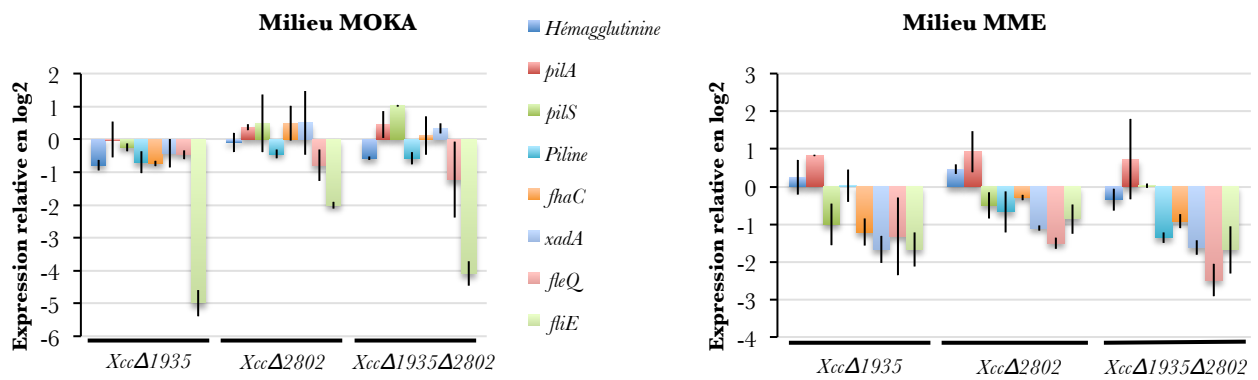
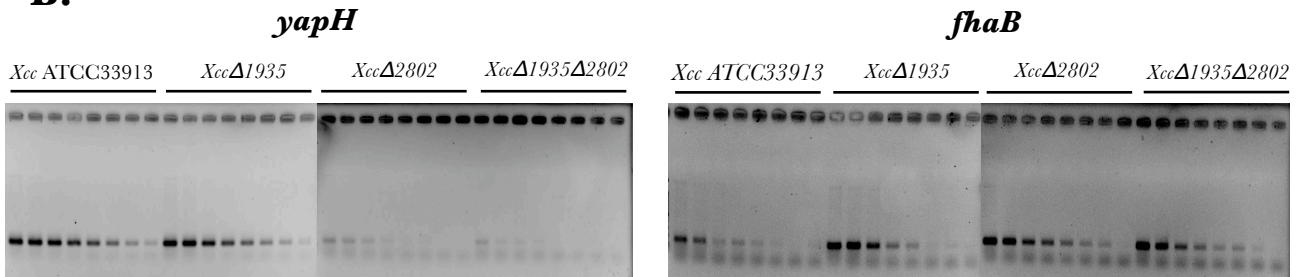
A.**B.**

Figure 80. Suivi de l'expression des gènes en RT-PCR quantitative (**A.**) et semi-quantitative (**B.**) dans les souches *XccΔ1935*, *XccΔ2802* et *XccΔ1935Δ2802* cultivées en milieu MOKA ou MME. Les résultats présentés en RT-PCR semi-quantitative représentent les expressions dans du milieu MOKA.

2.7. Etude du régulon des facteurs σ^{54} par RT-PCR quantitative et semi-quantitative

Le phénotypage des mutants σ^{54} a permis de mettre en lumière une implication possible de ces protéines dans la régulation de mécanismes moléculaires eux-mêmes impliqués dans les étapes d'adhésion et de formation de biofilms. Dans le but de déterminer le niveau d'implication des facteurs σ^{54} dans la régulation de ces étapes, la mise en place d'une approche transcriptionnelle avec *a priori* peut permettre de quantifier et de comparer l'expression de gènes cibles dans les différents fonds génétiques *Xcc* Δ 1935, *Xcc* Δ 2802, *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 par rapport à la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*.

A partir de données bibliographiques et d'observations phénotypiques, nous avons choisi de cibler l'expression de gènes impliqués dans la mise en place du système flagellaire (*fliE* et *fleQ*) et de structures adhésives de type fibrillaires (*pilA*, *pilS*, piline) et non fibrillaires (hémagglutinine, *fhaB*, *fhaC*, *xadA*, *yapH*) dans deux milieux de culture distincts : le milieu MOKA et le milieu MME. Les données d'expression par RT-PCR quantitative issues de trois répétitions biologiques (**Figure 80A**) permettent d'observer des tendances et des résultats très tranchés. En effet, l'expression du gène *fliE*, un des constituants du corps basal du flagelle, est fortement réprimée dans les souches *Xcc* Δ 1935 et *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 et dans une moindre mesure dans la souche *Xcc* Δ 2802 dans le milieu MOKA. Dans une moindre mesure, nous pouvons également observer que l'expression du gène *fleQ*, régulateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle, est réprimée dans le double mutant cultivé en milieu MOKA. L'expression de ces deux gènes est également réprimée, dans une moindre mesure, en milieu MME dans chacune des trois souches. Des différentiels d'expression au niveau des gènes codant certaines structures adhésives peuvent être observés. L'expression d'un gène codant une piline (*Xcc*3098), intervenant dans la structure du pilus de type IV, est réprimée dans le double mutant. L'expression du gène *xadA*, codant une adhésine non-fibrillaire, est réprimée dans les trois fonds génétiques.

Certains gènes tels que *yapH* et *fhaB* présentent des niveaux trop faibles pour pouvoir obtenir des résultats exploitables en RT-PCR quantitative. Ainsi, une approche par RT-PCR semi-quantitative a été envisagée. La **Figure 80B** illustre les profils d'expression obtenus en PCR sur une gamme de dilutions de matrice d'ADNc et chez les différentes souches étudiées. Dans le cas du gène *yapH*, les profils indiquent nettement que l'expression de gène semble diminuée dans les souches *Xcc* Δ 2802 et *Xcc* Δ 1935 Δ 2802 par rapport au génotype sauvage et

au mutant *XccA1935*. Les profils sont identiques que ce soit dans du milieu MOKA et MME-glutamate (résultat non montré). Les résultats concernant le gène *phaB* semblent moins tranchés et il est difficile de dégager des tendances dans le cas de l'expression de ce gène chez les différentes souches et dans les deux milieux.

Tableau 4. Séquences protéiques homologues utilisées pour les différents TBLASTN pour l'identification des déhydrines chez *A. brassicicola*. Tous les numéros d'accèsion proviennent de la base de données protéique NCBI à l'exception de SNU00161 et Q7S6B0. Ils proviennent respectivement du Broad Institute Accession Number et de la base de données Swiss Protein (d'après Abba *et al.*, 2006).

Organisme		Numéros d'accèsion
<i>Aspegillus</i>	<i>fumigatus</i>	EAL89059
		EAL84332
		EAL87020
	<i>nidulans</i>	EAA62484
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	EAK95850
		EAK94909
<i>Gibberella</i>	<i>zeae</i>	EAA70367
<i>Magnaporthe</i>	<i>grisea</i>	EAA55454
		EAA54716
<i>Neurospora</i>	<i>crassa</i>	CAD70810
		Q7S6B0
<i>Stagonospora</i>	<i>nodorum</i>	SNU00161
<i>Tuber</i>	<i>borchii</i>	DQ308610.1

Tableau 5. Analyse des séquences nucléotidiques de trois gènes codant des déhydrines mis en évidence chez *A. brassicicola*.

Gènes	Taille du cadre ouvert de lecture (pb)	Nombre d'introns	Position par rapport à l'ATG	Taille (pb)	Motif introniques consensus	
					5'	3'
<i>abdhn1</i>	585	1	46/156	111	GTAAG	TAG
<i>abdhn2</i>	1 473	4	23/76	54	GTAAG	TAG
			261/338	78	CAGCA	CAG
			1 112/1 270	159	GTGAG	CAG
			1 367/1 446	57	GTAAG	CAG
<i>abdhn3</i>	2997	2	90/141	52	GTTAG	TAG
			687/736	50	GTCAG	CAG

III. Protection face aux stress conférée par des protéines intrinsèquement déstructurées

1. Les déhydrin-like chez *A. brassicicola*

1.1. Identification de déhydrines chez *A. brassicicola*

L'étude du rôle des déhydrines chez *A. brassicicola* dans la réponse à des stress abiotiques a débuté suite à l'identification d'un transcrite dans une banque SSH (*CmxP3E9*, numéro d'accèsion GenBank DY543081), codant une protéine de type LEA du groupe 2, surexprimé en présence de camalexine (Sellam *et al.*, 2007). La première étape de ce travail a consisté en un inventaire des gènes codant des déhydrines putatives dans le génome séquencé d'*A. brassicicola*. Une recherche par TBLASTN et BLASTP, à partir de séquences de référence de différents champignons (**Tableau 4**) et du motif CSP (Conserved Signature Pattern) spécifique aux déhydrines fongiques (Abba *et al.*, 2006), a permis d'identifier trois contigs candidats distincts contenant des gènes codant de potentielles déhydrines.

1.2. Analyse structurale des séquences nucléotidiques

La localisation des gènes au sein des contigs et des séquences introniques au sein des gènes a été prédite à l'aide du logiciel GENSCAN. Cependant, ce logiciel n'est pas conçu pour l'analyse de données issues de génomes fongiques. Les résultats obtenus ont donc été corrigés manuellement, en se basant sur des critères d'identification spécifiques des champignons. Entre autre, la taille des introns n'excède généralement pas 150 pb chez les champignons filamenteux. En outre, ces introns sont bordés par des séquences consensus d'épissage en 5' et 3', et possèdent des séquences internes conservées (points de branchement internes). La présence de ces introns prédits a ensuite été confirmée expérimentalement par RT-PCR sur des ADNc grâce à des amorces encadrant ces séquences introniques supposées puis par séquençage.

Trois gènes (nommés respectivement *abdhn1*, *abdhn2* et *abdhn3*) codant des déhydrines potentielles ont été identifiés et localisés sur trois contigs distincts. Les résultats de l'analyse des séquences nucléotidiques des trois gènes sont présentés dans le **Tableau 5**.

L'analyse structurale de la séquence nucléotidique du gène *abdhn2* a permis de mettre en évidence un probable mécanisme d'épissage alternatif. L'intégralité de la séquence codante de ce gène a été amplifiée, à partir d'ADNc, et génère deux produits de taille différente (environ

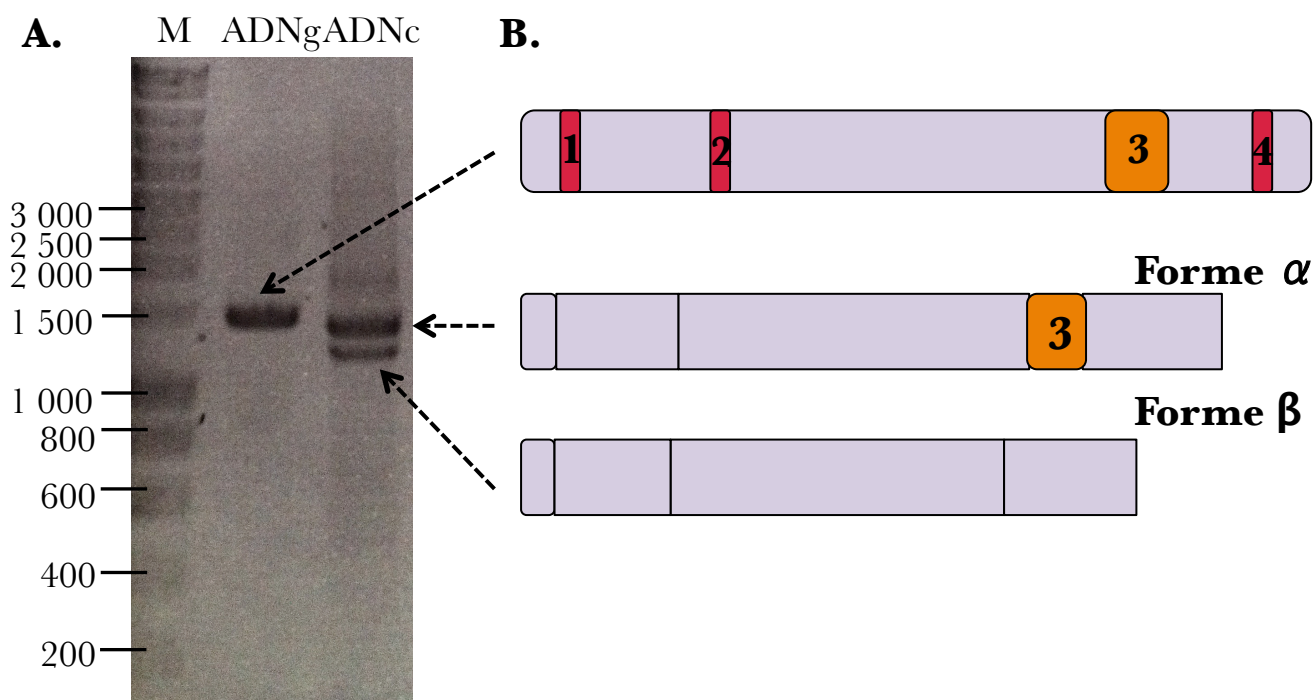


Figure 81. Mise en évidence de l'épissage alternatif du gène *abdhn2* chez *A. brassicicola*. **A.** Résultat de l'amplification par PCR de la séquence codante du gène *abdhn2* sur une matrice d'ADN génomique et d'ADNc de la souche *Abra43WT* en présence de NaCl 2% (p/v). **B.** Représentation schématique de l'épissage alternatif du gène *abdhn2* à partir de la forme totale qui peut donner deux formes d'ADN complémentaires.

Tableau 6. Analyse des séquences protéiques d'AbDHN1, AbDHN2 α , AbDHN2 β et AbDHN3 mises en évidence chez *A. brassicicola*.

Protéines	Taille (en acides aminés)	Masse moléculaire (en kDa)
AbDHN1	157	16,57
AbDHN2 α	427	41,65
AbDHN2 β	374	36,1
AbDHN3	964	100,26

Tableau 7. Pourcentages des identités des séquences protéiques codant les déhydrines entre chacune d'entre elles. Le premier pourcentage indique le pourcentage d'identité par rapport au pourcentage de couverture (entre parenthèses).

		Query sequence			
		AbDHN1	AbDHN2 α	AbDHN2 β	AbDHN3
Subject sequence	AbDHN1		55% (40%)	52% (54%)	67% (25%)
	AbDHN2 α	67% (34%)		100% (87%)	64% (9%)
	AbDHN2 β	67% (33%)	100% (76%)		64% (9%)
	AbDHN3	67% (47%)	58% (41%)	58% (49%)	

Tableau 8. Composition en acides aminés caractérisant les déhydrines (valeurs exprimées en pourcentage de la composition totale).

	Cystéine	Glycine	Sérine	Thréonine	Tryptophane
AbDHN1	0	14	7	10,2	0,6
AbDHN2 α	0	21,1	12,4	15,2	0
AbDHN2 β	0	22,5	12,8	16,8	0
AbDHN3	0,1	10,3	10,3	9,4	0

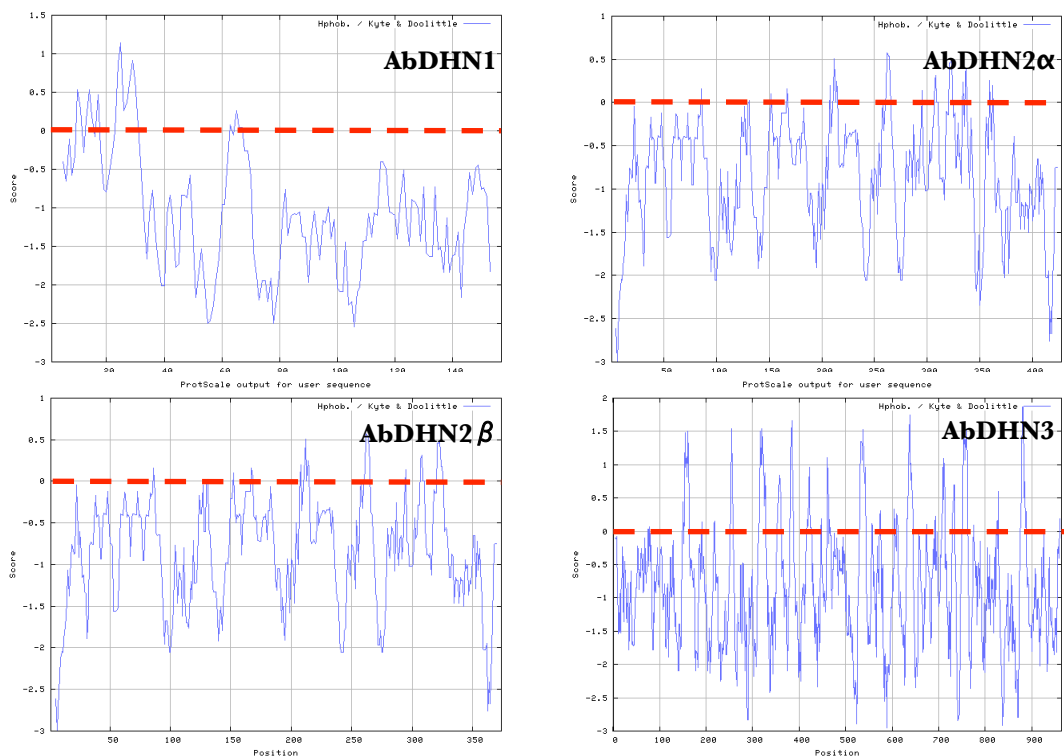


Figure 82. Profils d'hydrophilie des déhydrines AbDHN1, AbDHN2 α , AbDHN2 β et AbDHN3 identifiées chez *A. brassicicola* et réalisés à l'aide du logiciel ProtScale. Les résidus ayant un score inférieur à 0 sont considérés comme hydrophiles.

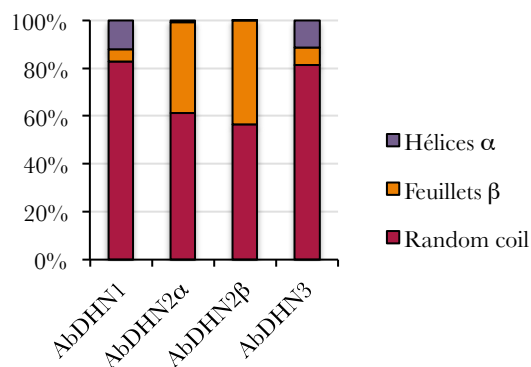


Figure 83. Prédictions de structures secondaires à partir de la séquence primaire des déhydrines d'*A. brassicicola* (réalisée à l'aide du programme PELE).

150 pb) (**Figure 81A**). Le clonage et le séquençage de ces produits ont permis de comparer les séquences obtenues à celle de la séquence génomique correspondante. Trois introns conventionnels de 54, 78 et 57 pb ont été, respectivement, identifiés près des extrémités N et C-terminales (**Figure 81B**). Ces derniers semblent épissés de manière régulière du fait de leur absence dans l'ensemble des séquences amplifiées à partir d'ADNc. En revanche, un quatrième intron de 159 pb a été identifié uniquement dans certaines séquences, correspondant au produit d'amplification de taille la plus élevée. Une recherche par BLAST et des expériences de Southern-blot n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence d'une seconde copie du gène *abdhn2* ce qui semble suggérer que les deux types de transcrits sont produits par un épissage alternatif du pré-ARNm d'*abdhn2*.

1.3. Analyse des séquences protéiques

Les protéines prédites déduites des trois séquences nucléotidiques ont été décrites à différents niveaux afin de confirmer, entre autre, leur appartenance au groupe 2 des protéines LEA.

Le gène *abdhn1* produit une protéine de 157 acides aminés. La traduction *in silico* des deux types de transcrits d'*abdhn2* permet d'obtenir les deux isoformes de la protéine AbDHN2. Ces deux isoformes seront nommées respectivement par la suite α et β , la forme α , correspondant à la traduction du transcrit le plus long. La région C-terminale du gène *abdhn3*, situé sur deux contigs successifs, a été identifiée par la technique de 3'RACE. Cela a permis de définir une protéine AbDHN3 possédant 960 acides aminés.

Les prédictions de leur taille et leur masse moléculaire théorique sont indiquées dans le **Tableau 6** et révèlent une forte hétérogénéité de taille entre les AbDHN1 (157 AA), AbDHN2 α (427 AA), AbDHN2 β (374 AA) et AbDHN3 (964 AA). Les pourcentages d'identité entre chacune des trois protéines s'avèrent être relativement faibles (**Tableau 7**).

Leur composition en acides aminés (**Tableau 8**) correspond aux caractéristiques des déhydrines végétales. En effet, celles-ci sont riches en résidus glycine, sérine et thréonine, et contiennent peu ou pas de cystéine et de tryptophane. Les protéines LEA sont connues pour être en grande partie hydrophiles. Selon les profils d'hydrophilie (**Figure 82**), nous pouvons constater qu'AbDHN1, AbDHN2 α , AbDHN2 β et AbDHN3 sont hydrophiles sur toute leur longueur.

Différents logiciels d'analyse de la séquence primaire nous ont permis de prédire leur structure secondaire. Les résultats sont présentés sur la **Figure 83**. En supplément de ces

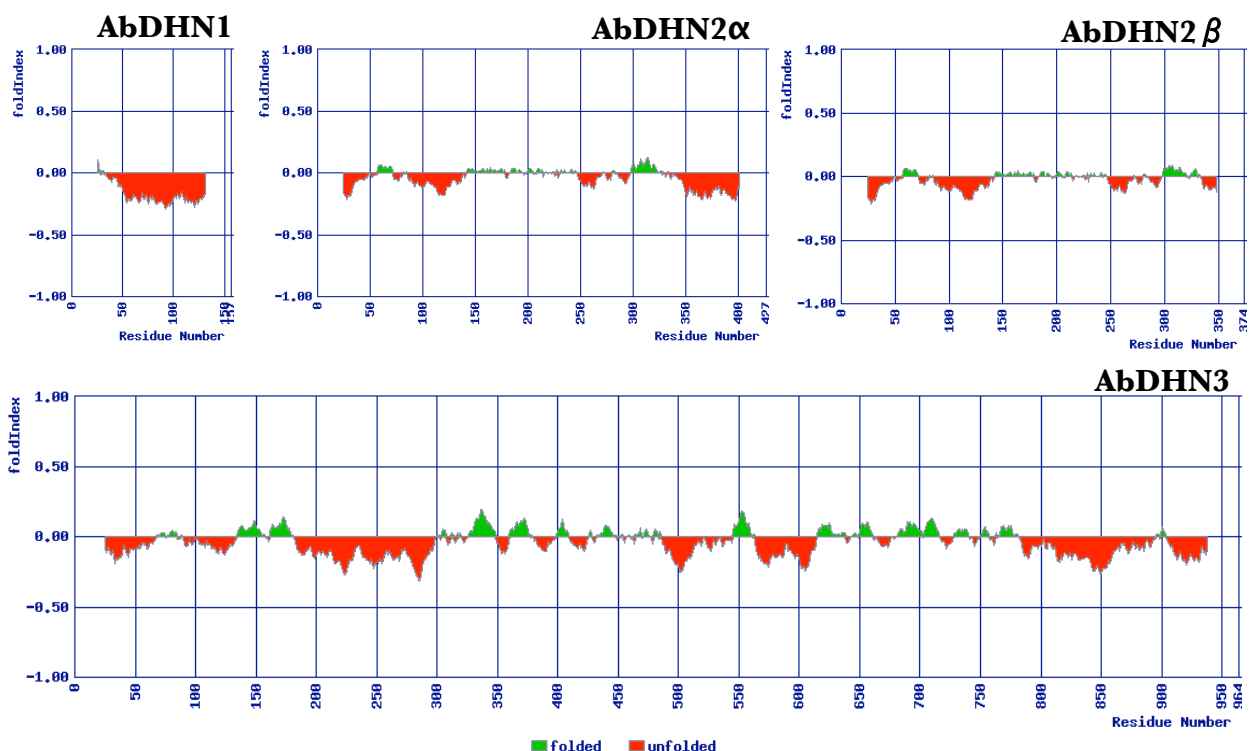


Figure 84. Prédiction du repliement global des déhydrines AbDHN1, AbDHN2 α , AbDHN2 β et AbDHN3 d'*A. brassicicola* à partir du logiciel FOLDINDEX. Un score inférieur à 0 indique l'absence de repliement dans la région concernée.

Tableau 9. Analyse des dégénérescences des motifs CSP retrouvés chez les protéines AbDHN1, AbDHN2 et AbDHN3 d'*A. brassicicola*, des protéines DprA et DprB d'*A. fumigatus* et de la protéine TbDHN1 de *Tuber borchii*.

<i>Tuber borchii</i>	TbDHN1	G P H R S D M A N R A D P T V D S
		G P H D S N I A N K V D P R V D S
		R P H D S R A M N E L D P R V D S
		G P H K S D L M N K L D P R V D S
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DprA	G H H D S R A A D K V D P R V D S
		G P H T S D T A N K L D P R V D S
		G P H G S N I A N K L D P R V G S
		G P H D S N I G N K L D P R V D S
		G P H S S N I A N K L D P R V D S
		G P H H S K L A N K L D P R V D S
	DprB	G P H S S K A A N K L D P R V D S
		G P H S S N I A N K V D P R V D S
		G P H N S N M L N K V D P R I D S
		G P H G S S I A N K M D P R V D S
		G P H N S S M M N K V D P R V D S
		G P H S S N L A N K I D P R V D S
<i>Alternaria brassicicola</i>	AbDHN1	G S H N S N I G N K L D P R V D S
		G P H S T N V G N K L D P R F D S
	AbDHN2	G P H S S H T A N T A D P T V H N
		G P H S S H M M N K A D P R V D S
		G P H S S R M A N Q V D P R V G G
		G P H S S H M A N S A D P R V G G
	AbDHN3	G P H S S N A T N I M D P R V Q P
		G P H D S N I A N V L D P R V K P
		G P H Q S D T L N R L D P K V D E

données qui confirment une forte proportion de structures désordonnées avec plus de 50% de random coil, le logiciel FOLDINDEX permet de visualiser le caractère désordonné de ces protéines (**Figure 84**). Cette déstructuration est la conséquence d'un faible nombre d'interactions favorables entre les acides aminés. En conséquence, les protéines déstructurées n'ont pas une structure tertiaire stable et bien définie.

Ces différentes prédictions bioinformatiques nous permettent de classer ces quatre protéines dans la catégorie des « déhydrin-like ».

L'identification de la première déhydrine fongique en 2006 chez *Tuber borchii* par Abba *et al.* (2006) a permis de définir un motif consensus (nommé « Conserved Signature Pattern », CSP) chez toutes les protéines homologues à cette déhydrine chez les champignons. Ce motif de 17 acides aminés présente quelques dégénérescences dans sa séquence et peut être répété plusieurs fois dans une même protéine. Nous avons pu identifier des motifs CSP en nombre variable dans la séquence primaire des quatre séquences protéiques d'*A. brassicicola*. Des dégénérescences supplémentaires sont apparues lors de l'analyse de ces motifs (**Tableau 9**).

Cette dernière analyse nous permet de classer ces trois protéines, de manière plus précise et fiable, dans le groupe des déhydrines fongiques.

1.4. Analyse de l'expression des gènes en conditions de stress abiotiques

Les profils d'expression des trois gènes ont été analysés dans différentes conditions de stress osmotique, thermique (froid), et en présence de molécules de défense antimicrobiennes.

1.4.1. Profils d'expression caractéristiques des déhydrines fongiques

Lors du processus de colonisation des graines, *A. brassicicola* est confronté à un environnement extrêmement pauvre en eau. Cette faible teneur en eau représente un stress hydrique pour le champignon, qui doit se protéger rapidement pour survivre à un état latent sur la graine. Ce stress hydrique est associé à un stress osmotique en raison de l'augmentation de la concentration en solutés dans la cellule. De ce fait, nous avons suivi l'expression des gènes des trois déhydrines 15 minutes, 1, 4 et 24 heures après un stress osmotique obtenu par une application de sorbitol 1M dans une culture liquide d'*A. brassicicola* (**Figure 85A**). Le niveau d'expression maximal est obtenu une heure après l'application de sorbitol 1M pour les trois gènes *abdhn1*, *abdhn2* (quantification de la forme totale) et *abdhn3*. Le gène *abdhn2* présente les niveaux d'induction les plus forts tout au long de la cinétique. L'expression des gènes

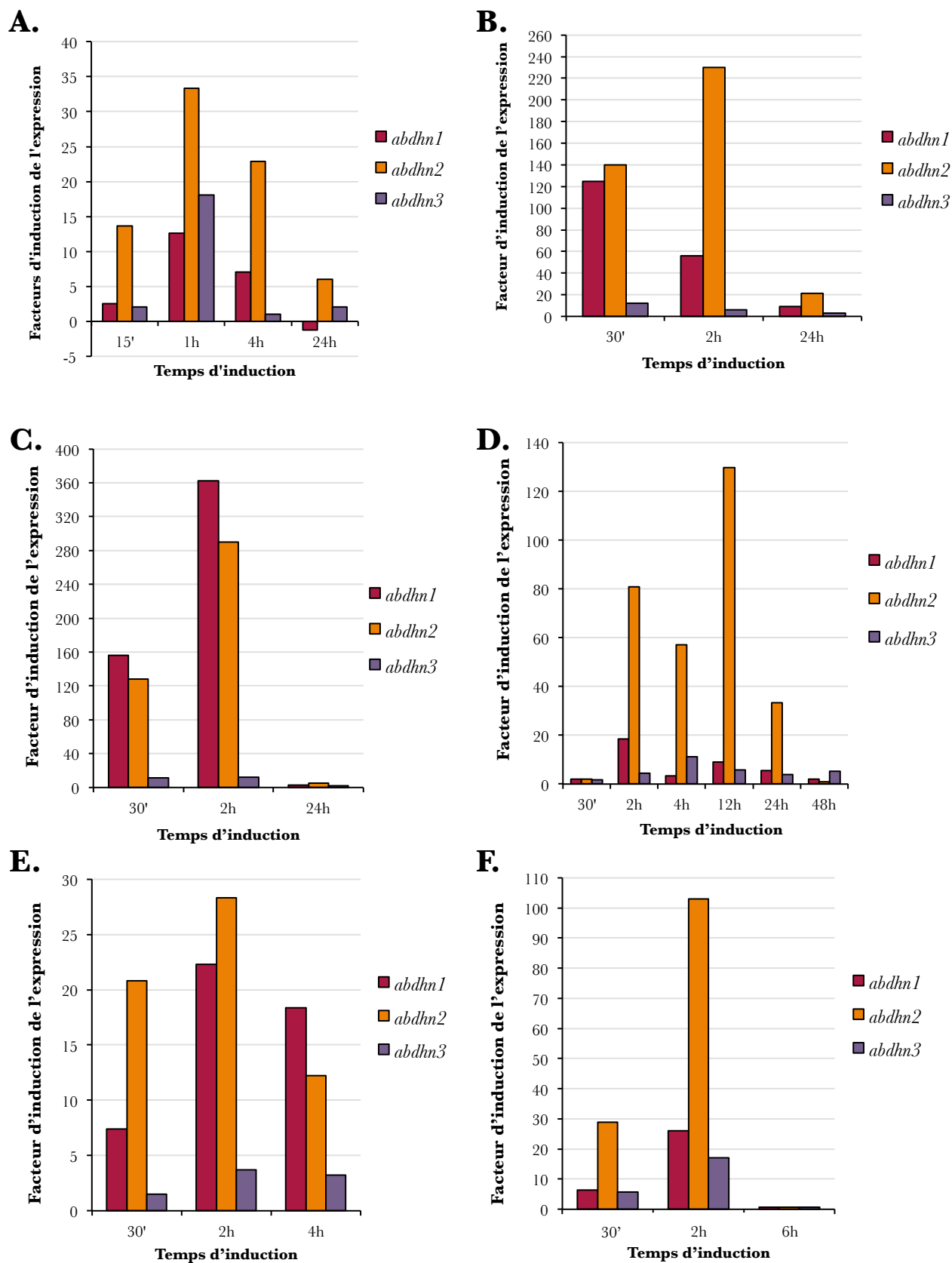


Figure 85. Suivi de l'évolution de l'expression des gènes codant les trois déhydrines d'*A. brassicicola* en présence de sorbitol 1 M (A.), de NaCl 2% (p/v) et 4% (p/v) (B. et C. respectivement), à 4°C (D.), en présence de camalexine 125 μM (E.), de brassinine 100 μM (F.). Le taux d'induction de l'expression des gènes est exprimé par rapport au niveau de l'expression d'un gène de référence codant la tubuline.

abdhn1 et *abdhn3* est induite de manière plus transitoire, une heure et quatre heures (uniquement pour *abdhn1*) après le traitement.

Les déhydrines ont généralement comme caractéristique d'être synthétisées en réponse à un stress ionique provoqué par un stress salin. Ainsi, l'expression des 3 gènes a été quantifiée en présence de NaCl à deux concentrations (2 et 4%) (**Figure 85B-C**). Nous pouvons remarquer, qu'à l'exception du gène *abdhn3*, les gènes *abdhn1* et *abdhn2* sont très fortement exprimés lors d'un stress salin, et ceci d'autant plus que la concentration est élevée. De plus, il s'agit d'une réponse très rapide car elle intervient dès 30 minutes après l'application du stress et n'est plus visible à 24 heures.

Enfin, les déhydrines, principalement dans le règne végétal mais également dans le règne fongique (Abba *et al.*, 2006), sont connues pour être surexprimées en condition de basses températures (4°C). Le gène *abdhn2* présente de forts niveaux d'expression lorsque le stress est appliqué pendant 2 heures jusqu'à 24 heures. Les gènes *abdhn1* et *abdhn3* sont, quant à eux, exprimés de manière beaucoup plus faibles tout au long de la cinétique (**Figure 85D**).

1.4.2. Profils d'expression des déhydrines fongiques en présence de phytoalexines

Lors de l'interaction avec une plante hôte et lors du processus de transmission aux graines, *A. brassicicola* est confronté aux défenses chimiques de la plante telles que des composés antimicrobiens comme les phytoalexines.

Le criblage d'une banque SSH en présence de la phytoalexine camalexine a permis de sélectionner des transcrits surexprimés lors de l'exposition du champignon à ce composé (Sellam *et al.*, 2007). Parmi eux se trouve le transcrit *CmxP3E9* correspondant au gène *abdhn1*. Le suivi des niveaux d'expression des trois gènes *abdhn* a été réalisé 30 minutes, 2 et 4 heures après l'application de 125 µM de camalexine dans une culture liquide d'*A. brassicicola* (**Figure 85E**). Les gènes *abdhn1* et *abdhn2* suivent le même profil d'expression au cours du temps. Ils sont surexprimés dès 30 minutes d'exposition à la camalexine et atteignent un pic d'expression après 2 heures de traitement. En revanche, l'expression du gène *abdhn3* n'est que faiblement induite en présence de camalexine.

La brassinine est une autre phytoalexine indolique produite, entre autres, par *Brassica oleracea*, et qui possède une activité antifongique (Pedras *et al.*, 2007 ; Sellam *et al.*, 2007). Le suivi des niveaux d'induction d'expression d'*abdhn1*, *abdhn2* et *abdhn3* a été réalisé 30 minutes, 2 et 6 heures après l'application de 100 µM de brassinine dans une culture liquide d'*A. brassicicola* (**Figure 85F**). Les trois gènes suivent le même profil d'expression au cours du

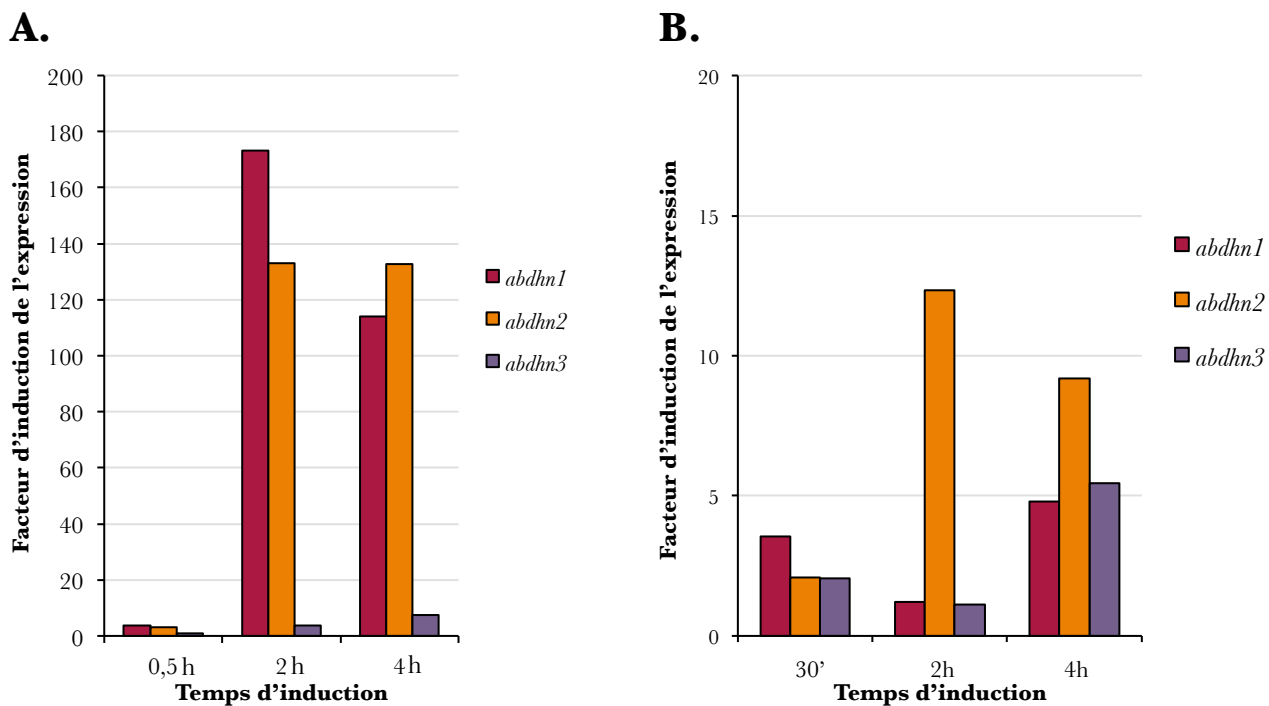


Figure 86. Suivi de l'évolution de l'expression des gènes codant les trois déhydrines d'*A. brassicicola* en présence d'allyl-ITC 2,5 mM (**A.**) et de ménadione 5mM (**B.**). Le taux d'induction de l'expression des gènes est exprimé par rapport au niveau de l'expression d'un gène de référence codant la tubuline.

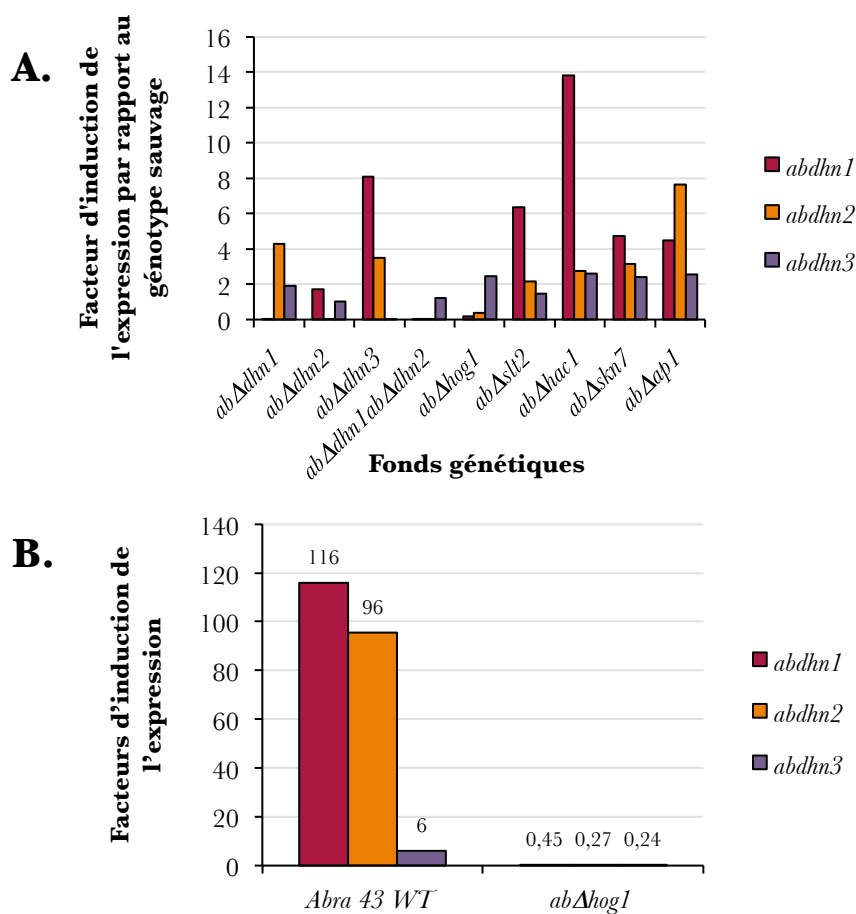


Figure 87. Suivi de l'évolution de l'expression des gènes codant les trois déhydrines **A.** dans différents fonds génétiques par rapport à la souche sauvage, **B.** dans la souche sauvage d'*A. brassicicola* le mutant *abΔhog1* en condition induite par un stress salin.

temps et leurs pics d'expression se situent 2h après l'application de brassinine. Le gène *abdhn2* présente les niveaux d'expression les plus élevés avec un pic d'expression après 2 heures de traitement de la même manière qu'après une application de camalexine. Les gènes *abdhn1* et *abdhn3* présentent des niveaux d'expression semblables après 30 minutes et 2 heures de traitement. En revanche, après 6 heures de contact avec la brassinine, l'expression des trois gènes n'est plus détectable.

1.4.3. Profils d'expression des déhydrines fongiques en présence de molécules induisant un stress oxydatif

Lors de l'interaction avec une plante hôte et lors de la transmission aux graines et de la survie sur celles-ci, *A. brassicicola* est confronté aux défenses chimiques préexistantes de la plante telles que les glucosinolates, phytoanticipines des plantes de la famille des Brassicacées. Ces composés sont dégradés par des myrosinases, lors d'une rupture de l'intégrité cellulaire consécutive à une attaque de pathogène, en isothiocyanates (ITC) à forte activité antimicrobienne (Sellam *et al.*, 2007). Des études menées récemment au laboratoire ont permis de démontrer que les ITC induisent un stress oxydatif sur *A. brassicicola* (Calmes, 2011).

Un suivi de l'expression des gènes *abdhn* en présence d'ITC a été réalisé 30 minutes, 2 heures et 4 heures après l'application de 2,5 mM d'allyl-ITC dans une culture liquide d'*A. brassicicola* (**Figure 86A**). Les gènes *abdhn1* et *abdhn2* sont très fortement exprimés suite à une application de 2 et 4 heures d'Al-ITC (facteur d'induction supérieur à 100). L'expression du gène *abdhn3* suit un profil différent. Celle-ci n'est que faiblement induite en présence d'Al-ITC : le pic d'expression du gène *abdhn3* se situe 4 heures après l'application du stress, avec un facteur d'induction de l'ordre de 7.

Dans le but de conforter ces résultats, l'expression de ces gènes en présence de ménadione, molécule qui induit également un stress oxydatif intracellulaire par la formation d'ions superoxydes (Jamieson, 1992), a été quantifiée suite à l'application de 5 mM de ce composé dans une culture liquide d'*A. brassicicola* (**Figure 86B**). Même si les gènes sont globalement moins induits en présence de ménadione qu'en présence d'ITC, des différences de profils d'expression apparaissent entre les gènes. Une application de 30 minutes de ménadione n'induit que très faiblement l'expression des gènes *abdhn*. Le gène *abdhn2* présente les niveaux d'expression les plus élevés, avec un pic d'expression après 2 heures de traitement. Les gènes *abdhn1* et *abdhn3* présentent, quant à eux, des niveaux d'expression semblables et un pic d'expression 4 heures après l'application de ménadione.

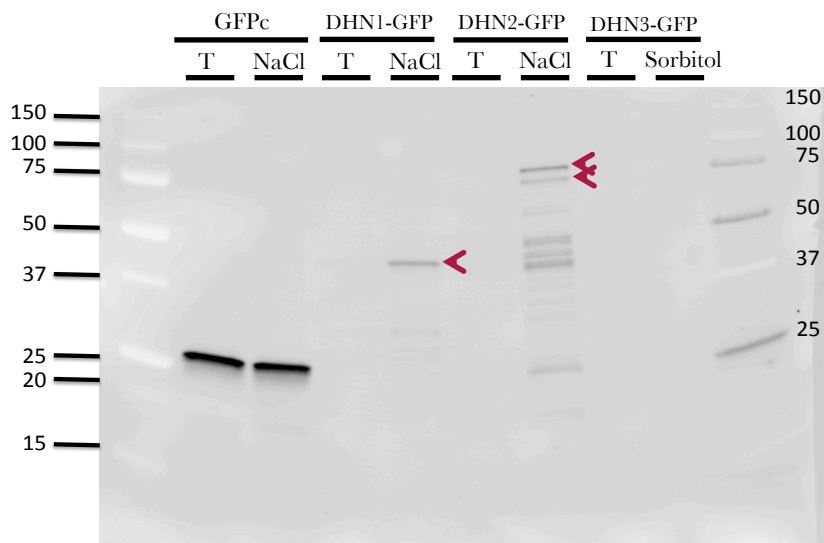


Figure 88. Western blot réalisé à partir de la souche d'*A. brassicicola* GFPc (exprimant constitutivement la GFP), FG-AbDHN1, FG-AbDHN2 et FG-AbDHN3 en condition non induite et induite soit au NaCl 2 h 2% (p/v) soit au sorbitol 1 h 1M. Mise en évidence des protéines par l'anti-GFP:HRP. Tailles attendues: GFP: 27 kDa, AbDHN1-GFP: 44 kDa, AbDHN2 α -GFP : 71 kDa, AbDHN2 β -GFP: 65,5 kDa et AbDHN3-GFP: 127 kDa.

1.5. Expression des gènes *dhn* d'*A. brassicicola* dans différents fonds génétiques

L'expression des trois gènes codant les déhydrines d'*A. brassicicola* a été suivie dans différents fonds génétiques dans l'optique d'identifier des gènes impliqués dans la régulation de l'expression des déhydrines. Cette étude a été réalisée à l'aide de différents mutants déficients soit pour des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*abΔskn7* et *abΔap1*) ou au stress de sécrétion (*abΔhac1*), soit pour des MAPK intervenant dans l'osmorégulation (*abΔhog1*) ou l'intégrité pariétale (*abΔslt2*) (**Figure 87A**). L'expression des trois gènes a également été quantifiée chez les trois simples mutants (*abΔdhn1*, *abΔdhn2* et *abΔdhn3*) et le double mutant (*abΔdhn1Δdhn2*). Cela nous a permis de vérifier l'absence d'expression d'*abdhn1* dans le mutant *abΔdhn1* et *abΔdhn1Δdhn2*, d'*abdhn2* dans *abΔdhn2* et *abΔdhn1Δdhn2* et d'*abdhn3* dans *abΔdhn3*. L'expression basale du gène *abdhn1* est accrue dans les mutants *abΔslt2*, *abΔhac1*, *abΔskn7* et *abΔap1* par rapport à l'expression dans un fond génétique sauvage. Celle du gène *abdhn2* ne l'est significativement que dans le mutant *abΔap1*. Ces résultats peuvent être dus à la présence d'un stress oxydatif (cas d'*ap1* et *skn7*) et de sécrétion (cas de *hac1*) et constitutif en conditions standards de culture. Aucune de ces mutations dans des gènes régulateurs ne semble avoir un effet significatif sur l'expression basale du gène *abdhn3*. De manière intéressante, l'expression basale des gènes *abdhn1* et *abdhn2* est fortement diminuée chez le mutant *abΔhog1* par rapport au génotype sauvage. Cela suggère que la MAPK Hog1 pourrait réguler l'expression des gènes codant certaines déhydrines chez *A. brassicicola*. Pour étayer cette hypothèse, un suivi de l'expression des trois gènes a été réalisé en conditions inductrices des gènes *abdhn* à la fois chez la souche sauvage Abra43 WT et, chez le mutant *abΔhog1* (**Figure 87B**). Ainsi, nous avons pu observer que l'expression des trois gènes *abdhn* n'est plus inductible par le NaCl chez un mutant *abΔhog1* renforçant l'hypothèse d'une régulation de l'expression de ces gènes par la MAPK Hog1.

1.6. Régulation post-transcriptionnelle : cas du gène *abdhn2*

La mise en évidence d'un mécanisme d'épissage alternatif du gène *abdhn2* a été confirmée en Western-blot en visualisant les deux isoformes protéiques distinctes par immuno-détection (par l'utilisation d'anticorps ciblant la GFP) à partir de protéines totales issues d'une souche d'*A. brassicicola* dont le gène *abdhn2* a été fusionné en C-terminal à la GFP (**Figure 88**). Les résultats du Western Blot montrent qu'en condition non induite, aucune protéine ABDHN2-GFP n'est révélée par les anticorps. En revanche, en conditions inductrices (stress

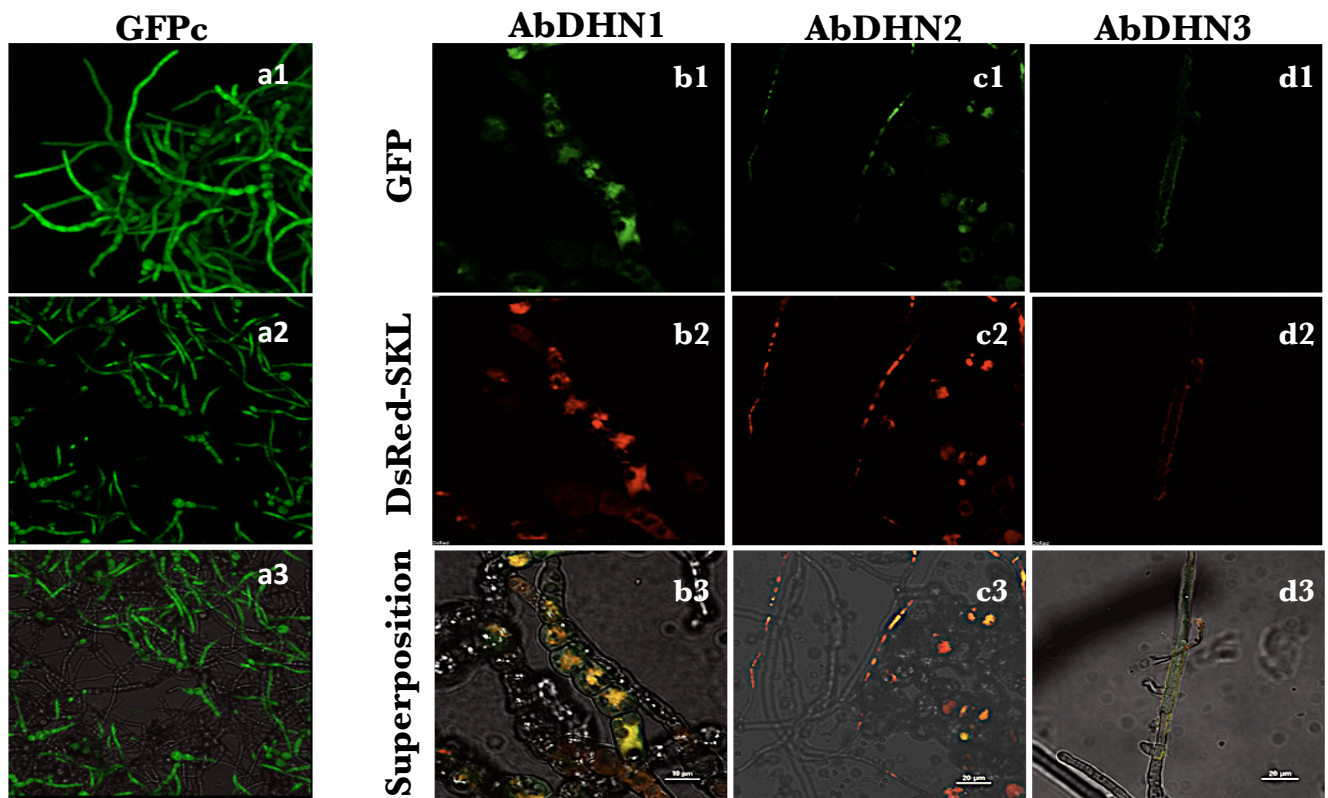


Figure 89. Observations en microscopie confocale à balayage laser de 4 souches d'*A. brassicicola*, GFPc: GFP constitutive (**a**), *Abdhn1* fusionné GFP+DsRed-SKL (**b**), *Abdhn2* fusionné GFP+DsRed-SKL (**c**), *Abdhn3* fusionné GFP+DsRed-SKL (**d**). Reconstitution tridimensionnelle par projection du maximum d'intensité (**a1**) Plan focal en fond noir (**a2**). Plan focal avec lumière blanche (**a3**). Plan focal en fond noir illustrant la localisation des déhydrines (**b1, c1, d1**). Plan focal en fond noir illustrant la localisation des peroxysomes (**b2, c2, d2**). Plan focal en lumière blanche de la superposition des deux marquages (**b3, c3, d3**). Barre échelle = 10 μm (b) et 20 μm (a, c et d). (Photos IMAC)

salin), plusieurs signaux apparaissent, dont deux à 71 et 65 kDa, correspondant respectivement aux tailles attendues pour les deux isoformes protéiques d'AbDHN2 (AbDHN2 α -GFP et AbDHN2 β -GFP). Dans le cas d'AbDHN1, la protéine fusionnée n'est également visible qu'en conditions inductrices lors d'un stress salin. En revanche, la protéine AbDHN3-GFP n'a pas pu être détectée que ce soit en conditions basales et inductrices.

1.7. Localisation subcellulaire des protéines AbDHN1, AbDHN2 et AbDHN3

Dans le but de mieux comprendre le rôle des déhydrines chez *A. brassicicola* dans la réponse à différents stress abiotiques chez *A. brassicicola*, l'analyse de leur localisation cellulaire a été envisagée. Pour cela, les extrémités C-terminales des trois gènes *abdhn* ont été fusionnées à une séquence codant une protéine GFP. L'expression de ces gènes reste donc sous le contrôle des promoteurs natifs. Une souche témoin exprimant de manière constitutive la sGFP sous le contrôle du promoteur ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis* (Lorang *et al.*, 2001) a été construite pour servir de contrôle. L'étude de la localisation subcellulaire des trois protéines AbDHN a été conduite par microscopie confocale à balayage laser.

Les résultats de l'observation des souches par microscopie confocale sont présentés sur la (**Figure 89**). L'image a1 montre une reconstitution tridimensionnelle par projection du maximum d'intensité. La fluorescence verte spécifique de la GFP est présente sur l'ensemble du mycélium. Cette souche (GFPc) constitue un témoin positif permettant de visualiser le caractère constitutif de l'expression de la GFP. Les images a2 et a3 permettent d'observer uniquement la fluorescence sur un plan focal, respectivement en fond noir et en lumière blanche. Les images présentées par la suite pour les autres souches seront également des vues de plans focaux.

Les signaux d'AbDHN1-GFP et d'AbDHN2-GFP forment des points fluorescents verts dans les conidies et les hyphes tandis que, dans la souche contrôle, l'expression de la GFP forme une fluorescence diffuse dans la cellule. Ces observations suggèrent que ces deux déhydrines pourraient être compartimentées dans la cellule. D'après les résultats publiés pour les déhydrines d'*Aspergillus* une localisation dans les peroxysomes a été envisagée. L'observation de la souche AbDHN1-GFP indique une co-localisation d'AbDHN1 avec les peroxysomes visible par la superposition de la fluorescence verte de la GFP avec celle émise par la protéine DsRed-SKL co-exprimée dans cette souche (b3). La même démarche a été utilisée pour la souche AbDHN2-GFP et indique également une localisation peroxysomale

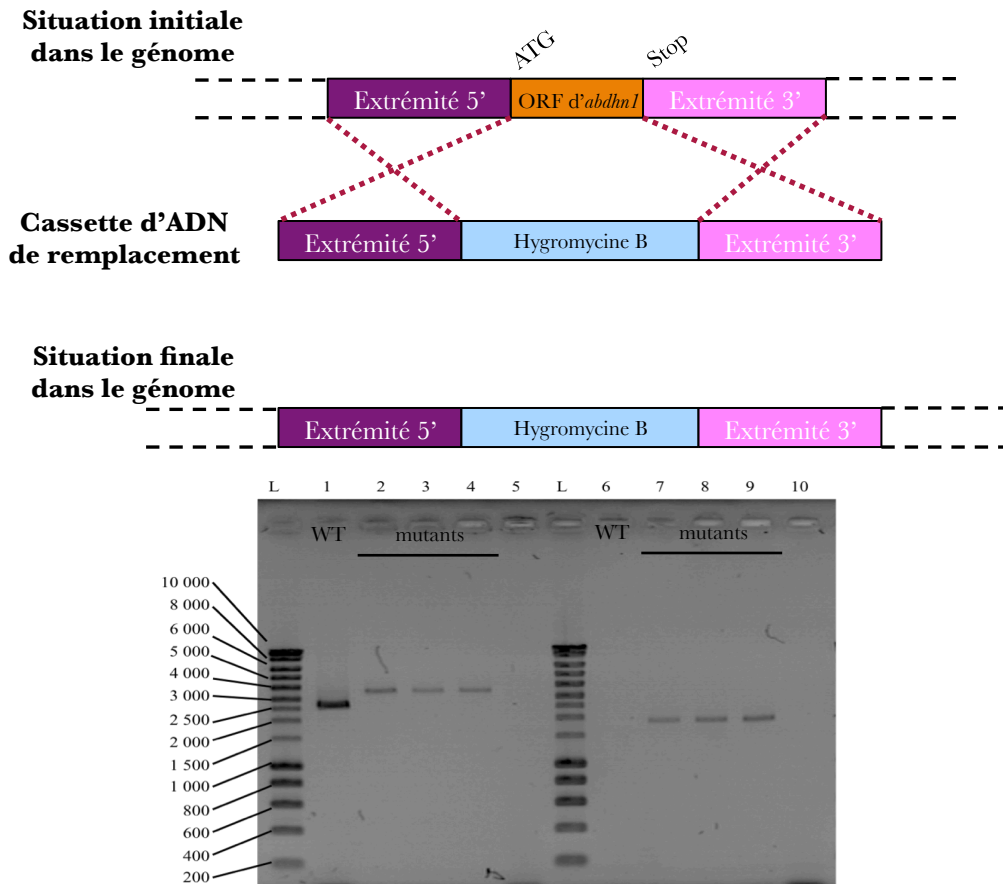


Figure 90. Mise en évidence de l'insertion de la cassette de remplacement chez un mutant d'*A. brassicicola*. **A.** Représentation schématique de la recombinaison homologue dans le cas d'une mutation par un remplacement de gène **B.** Confirmation de l'insertion de la cassette de remplacement. Pistes 1 à 4 : amorces situées dans les zones flanquant le gène à déléter. Pistes 6 à 9 : couple d'amorces situées dans la région flanquant le gène cible et dans le gène de l'hygromycine B.

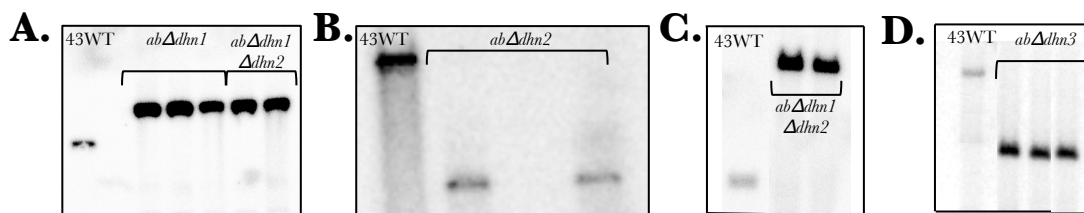


Figure 91. Résultats d'hybridation par Southern-blot à partir d'ADN génomiques du génotype sauvage (43 WT) et des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et *abΔdhn1Δdhn2* digérés avec SacI (**A.**), (**B.**), PstI (**C.**) et PstI (**D.**).

semblable à celle d'AbDHN1 (c3). Dans le cas de la souche AbDHN3-GFP (d), l'intensité de la fluorescence est faible (d1) en comparaison avec les autres souches. De manière inattendue, la fluorescence émise par la souche AbDHN3-GFP DsRed-SKL est localisée en périphérie des hyphes (d2). La faible fluorescence d'AbDHN3 a nécessité d'augmenter la puissance des lasers du microscope, induisant la présence d'un bruit de fond plus important pouvant expliquer de tels résultats.

1.8. Approche fonctionnelle par mutagenèse dirigée

1.8.1. Construction et validation des mutants

Afin de réaliser l'étude de la fonction des trois protéines AbDHN, les trois simples mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2* et *abΔdhn3* et le double mutant *abΔdhn1abΔdhn2* ont été construits. Le choix de la construction de la souche doublement mutée a été réalisé en raison des similitudes observées au niveau des profils d'expression de ces deux gènes chez la souche sauvage.

La stratégie adoptée est celle décrite par Yu *et al.* (2004), et conduit au remplacement du gène d'intérêt par un marqueur conférant la résistance à l'hygromycine B (dans le cas de simple mutant) ou à la nouséothricine (dans le cas d'un double mutant).

Pour chaque mutant, l'ADN issu de trois clones potentiellement transformants, a été extrait et utilisé comme matrice pour réaliser une PCR conventionnelle à l'aide d'amorces permettant de vérifier le caractère homologue de l'intégration de la cassette. Ces amorces ont été définies, soit au sein du gène de résistance à l'hygromycine B, soit sur les parties flanquantes de la cassette de remplacement. Une première analyse a permis de vérifier l'intégration de la cassette dans le génome par l'utilisation d'une amorce interne de la cassette et une amorce spécifique du gène de résistance à l'hygromycine B. D'autre part, l'insertion à l'endroit ciblé dans le génome par recombinaison homologue a été vérifiée en utilisant soit deux amorces adjacentes, soit une amorce adjacente à la cassette et une amorce spécifique du gène de résistance à l'hygromycine B (**Figure 90**).

La vérification de l'intégration unique de la cassette de remplacement au locus ciblé est réalisée par Southern-blot. L'annexe 2 présente la stratégie employée pour le choix des sondes pour chacun des gènes. Ces vérifications ont été réalisées pour chacun des simples mutants et le double mutant *abΔdhn1abΔdhn2* (**Figure 91**). La sonde utilisée est spécifique de la région cible de la cassette de mutation. La validation de l'insertion se fait par la mesure d'une différence de taille entre les signaux spécifiques du génotype sauvage et des génotypes

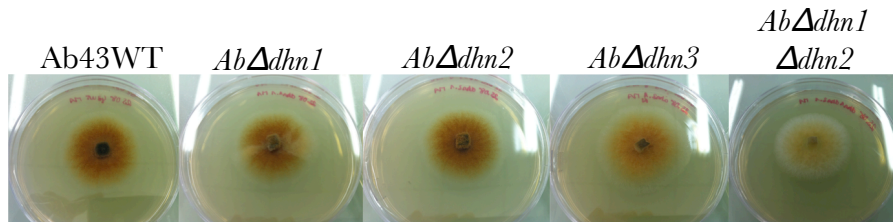


Figure 92. Aspects macroscopiques de la souche sauvage d'*A. brassicicola* et des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et du double mutant *abΔdhn1abΔdhn2*.

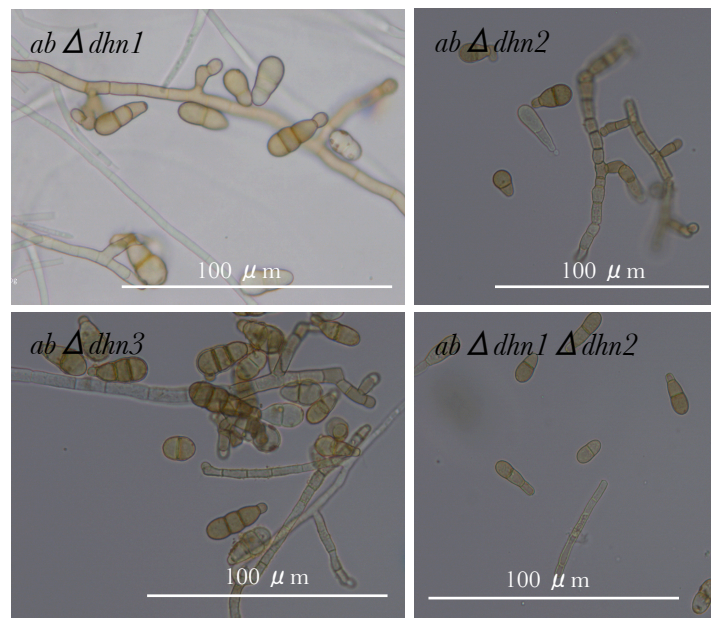


Figure 93. Aspects microscopiques des conidies et des hyphes de la souche sauvage d'*A. brassicicola* et des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et du double mutant *abΔdhn1abΔdhn2*.

transformés. Cette différence observée et la présence des signaux aux tailles attendues attestent de l'insertion de la cassette dans la région ciblée du génome. L'absence de signaux supplémentaires à des tailles non prévues écarte la possibilité d'insertion multiple ou aléatoire dans une région non ciblée du génome d'*A. brassicicola*.

1.8.2. Analyse phénotypique des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et *abΔdhn1abΔdhn2*

Dans le but d'identifier un éventuel effet de la mutation d'un ou de deux gène(s) codant une déhydrine sur la croissance des mutants en conditions de stress abiotiques et sur leur capacité à se transmettre à et par les graines, différentes méthodes phénotypage ont été réalisées. L'absence d'effet pléiotrope sur leur croissance *in vitro* en condition standard est systématiquement vérifiée.

1.8.2.1. Caractères macro- et microscopiques des différentes souches

La souche parentale sauvage Abra43 forme un thalle de couleur orange puis marron au cours de sa croissance. Ce thalle est entouré d'une zone de couleur vert olive due à la présence de conidies. Ces caractéristiques sont également observées sur les trois simples mutants. De la même manière, la morphologie de leurs conidies et de leurs hyphes est identique à celle de la souche sauvage. En outre, ils produisent des conidies en quantité équivalente à la souche sauvage Abra43 après 15 jours de culture sur un milieu PDA (**Figure 92**). En revanche, le double mutant *abΔdhn1abΔdhn2* a des caractéristiques phénotypiques plus contrastées : son thalle est plus blanchâtre, sans doute en partie en raison d'une production de conidies en plus faible quantité que le génotype sauvage. L'aspect morphologique des hyphes et des conidies est identique à la souche sauvage (**Figure 93**).

1.8.2.2. Analyse de la croissance des mutants en conditions de stress osmotique et salin

Dans le but d'identifier un éventuel effet de la simple mutation *abdhn1*, *abdhn2* ou *abdhn3* et de la double mutation *abdhn1abdhn2* sur la capacité des mutants à croître en conditions de stress osmotique, des tests de croissance radiale ont été réalisés sur milieu contenant du sorbitol à différentes concentrations.

En présence de sorbitol, la croissance de la souche sauvage n'est pas altérée par l'augmentation des concentrations de ce composé. De la même manière, les simples mutants

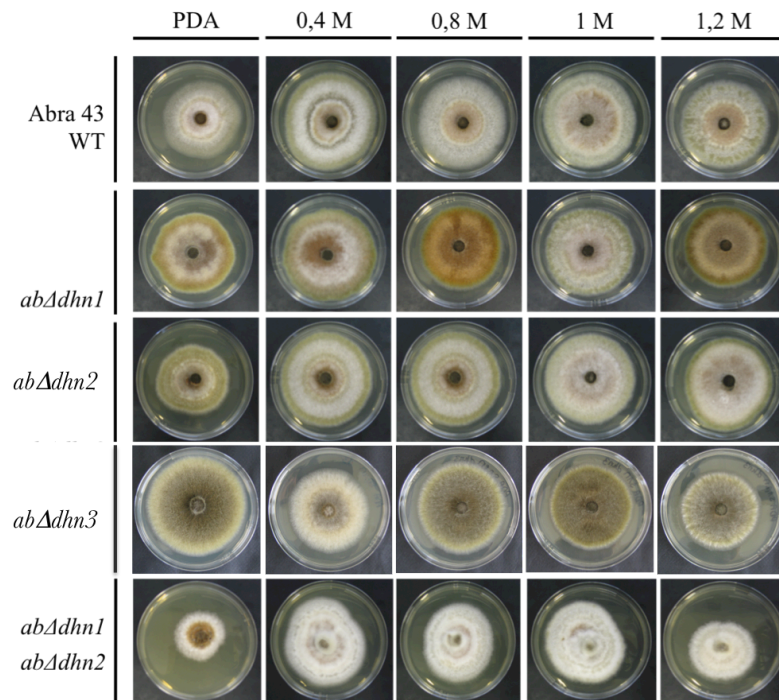


Figure 94. Analyse de la croissance radiale de la souche sauvage, des trois simples mutants *ab Δdhn1*, *ab Δdhn2* et *ab Δdhn3* du double mutant *ab Δdhn1ab Δdhn2* en présence de concentrations croissantes de sorbitol (0,4 M à 1,2M).

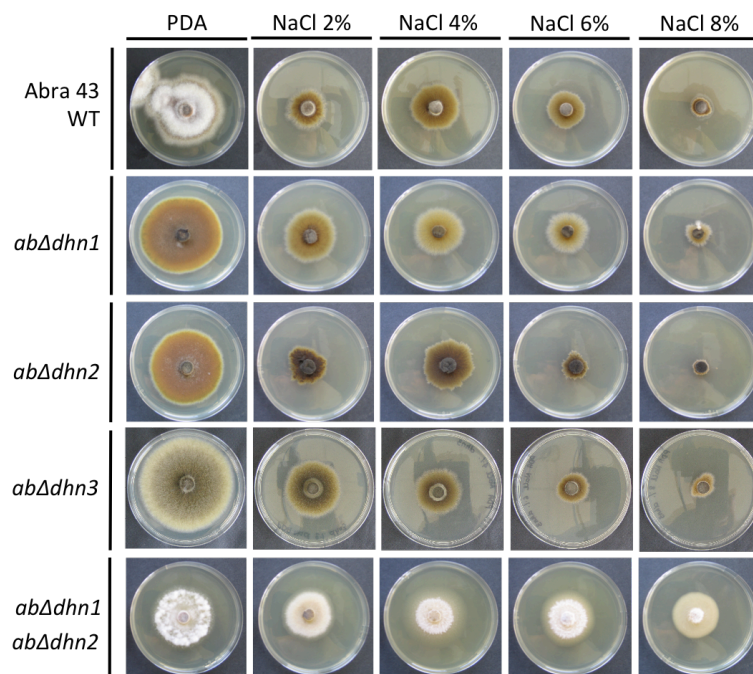


Figure 95. Analyse de la croissance radiale de la souche sauvage, des trois simples mutants *ab Δdhn1*, *ab Δdhn2* et *ab Δdhn3* du double mutant *ab Δdhn1ab Δdhn2* en présence de concentrations croissantes de NaCl (2% à 8%).

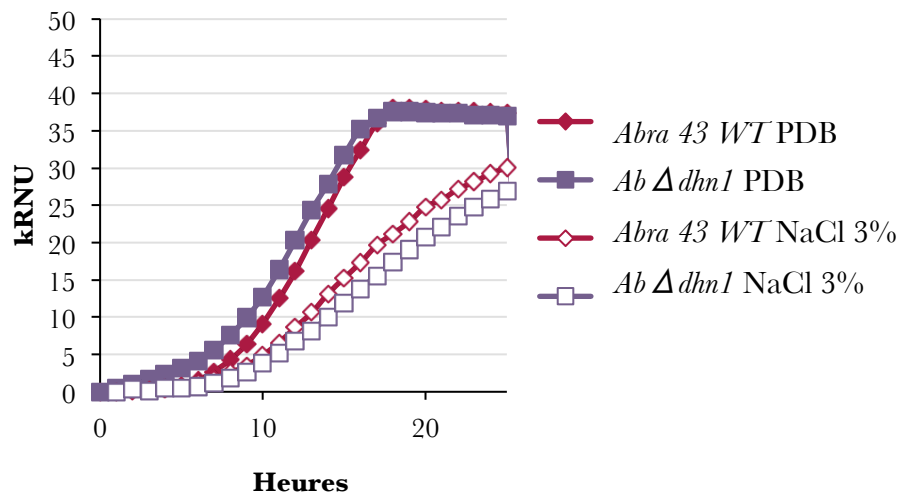


Figure 96. Croissance par néphélométrie de la souche sauvage Abra 43 WT et du mutant *ab Δdhn1* en présence de 3% NaCl (p/v). Le même type de résultats est obtenu pour les souches *ab Δdhn2*, *ab Δdhn3* et *ab Δdhn1ab Δdhn2* en présence de NaCl à 3% (p/v).

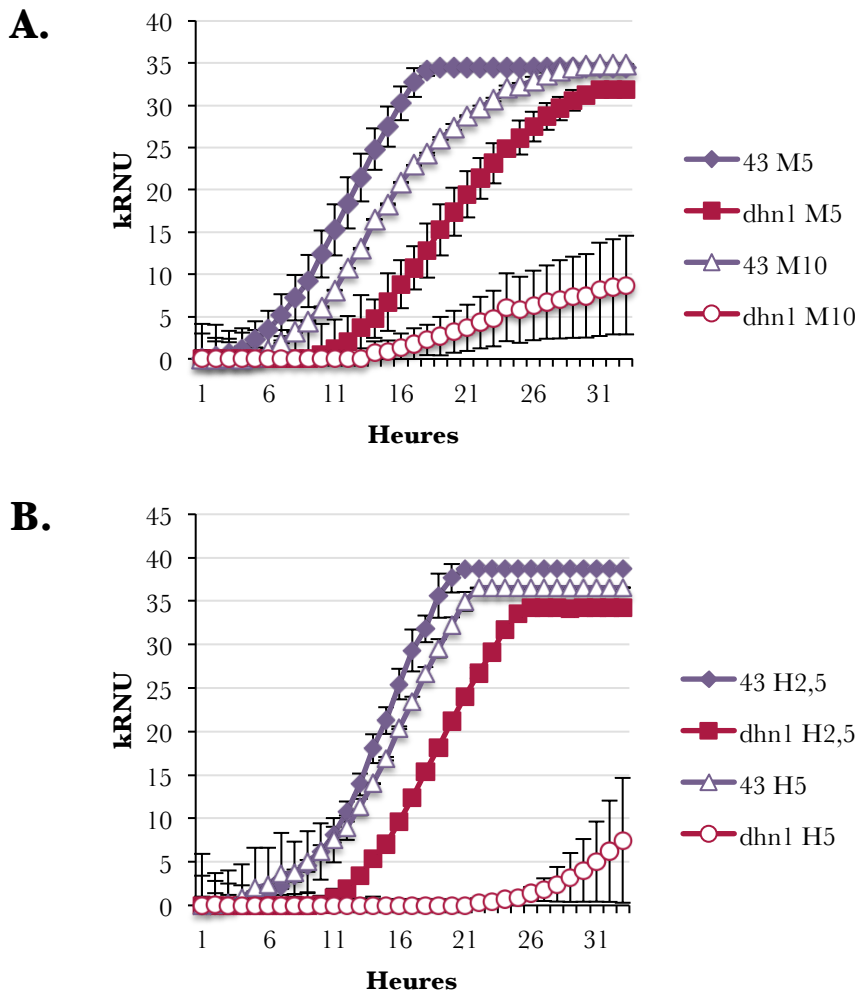


Figure 97. Croissance par néphélométrie de la souche sauvage Abra 43 WT et du mutant *ab Δdhn1* en présence de ménadione (**A.**) et d' H_2O_2 (**B.**). Le même type de résultats est obtenu pour les souches *ab Δdhn2*, *ab Δdhn3* et *ab Δdhn1ab Δdhn2*.

et le double mutant présentent le même phénotype que la souche sauvage en présence de fortes concentrations en sorbitol (**Figure 94**).

Le même type de test a été réalisé en présence de chlorure de sodium (NaCl). Les simples mutants n'ont pas un comportement différent de celui de la souche sauvage. En effet, leur croissance est ralentie lorsque les concentrations en NaCl augmentent (2% à 6%) et est totalement inhibée à la concentration la plus élevée de NaCl (8%). Curieusement, le double mutant semble, quant à lui, plus tolérant au NaCl que les autres génotypes (**Figure 95**). En général, en conditions fortement stressantes les champignons filamenteux ont tendance à favoriser la conidiation au détriment de la croissance hyphale. La faible capacité de ce mutant à sporuler même en situation de stress pourrait expliquer ce résultat.

La croissance de ces mutants a été également analysée par néphélométrie pour étudier leur sensibilité face à un stress salin. Cette technique d'analyse, mise au point au laboratoire (Joubert *et al.*, 2010), permet d'étudier les phases précoces de la croissance du champignon. En présence d'un stress salin, caractérisé par l'application de NaCl à 3%, ni les simples mutants ni le double mutant ne semblent altérés au niveau de leur croissance par rapport à la souche sauvage lorsque des critères comme l'augmentation de la durée de lag-phase (temps nécessaire pour obtenir une pente de la courbe égale à 1) et la diminution de la pente de la courbe sont analysés (**Figure 96**).

1.8.2.3. Analyse de la croissance des mutants en conditions de stress oxydatif

Aux vues des profils d'expression des gènes *abdhn* en réponse à l'application d'un stress oxydatif, les phases précoces de croissance des différents mutants ont été analysées en présence de deux composés capables de générer un stress oxydatif. Il s'agit de la ménadione et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Ces expérimentations, menées en néphélométrie, ont été réalisées uniquement sur les génotypes simples mutants. En effet, la souche *abΔdhn1abΔdhn2* ne sporule que très faiblement. Or, ces tests requièrent une quantité importante de spores pour leur réalisation.

Les mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2* et *abΔdhn3* sont tous caractérisés par une forte sensibilité face au stress oxydatif provoqué par les deux molécules testées (**Figure 97**). Une inhibition totale de la croissance des mutants est observée en présence de 10 mM de ménadione et de 5 mM d'H₂O₂ alors que, dans les mêmes conditions de culture, la croissance de la souche sauvage n'est pas significativement affectée.

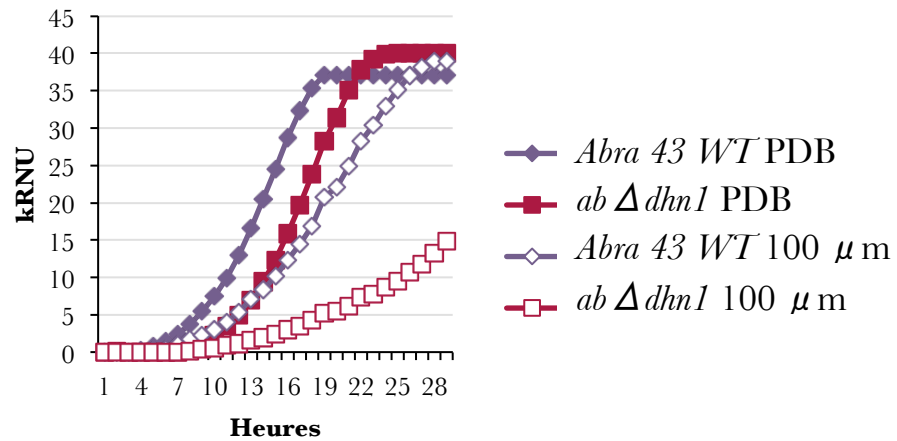


Figure 98. Croissance par néphélométrie de la souche sauvage Abra 43 WT et du mutant *ab Δdhn1* en présence de 100 μ m de la phytoalexine brassinine. Le même type de résultats est obtenu pour les souches *ab Δdhn2*, *ab Δdhn3*.

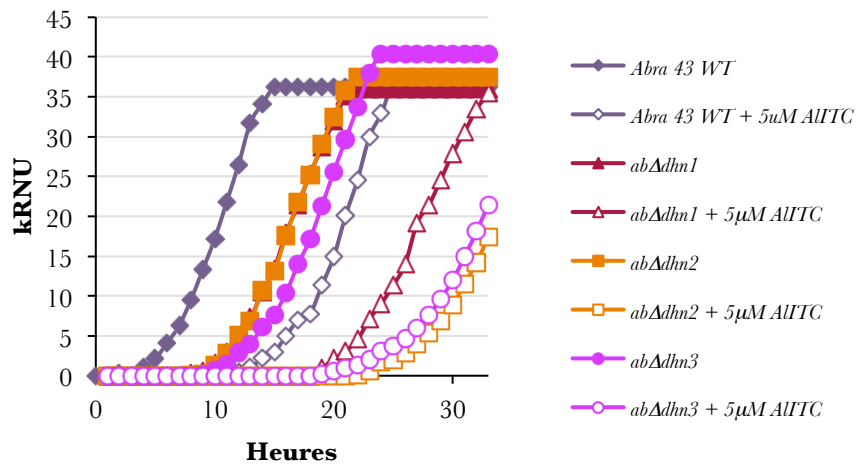


Figure 99. Croissance par néphélométrie de la souche sauvage Abra 43 WT et des trois simples mutants *ab Δdhn* en présence de 5 mM d'allyl-isothiocyanates.

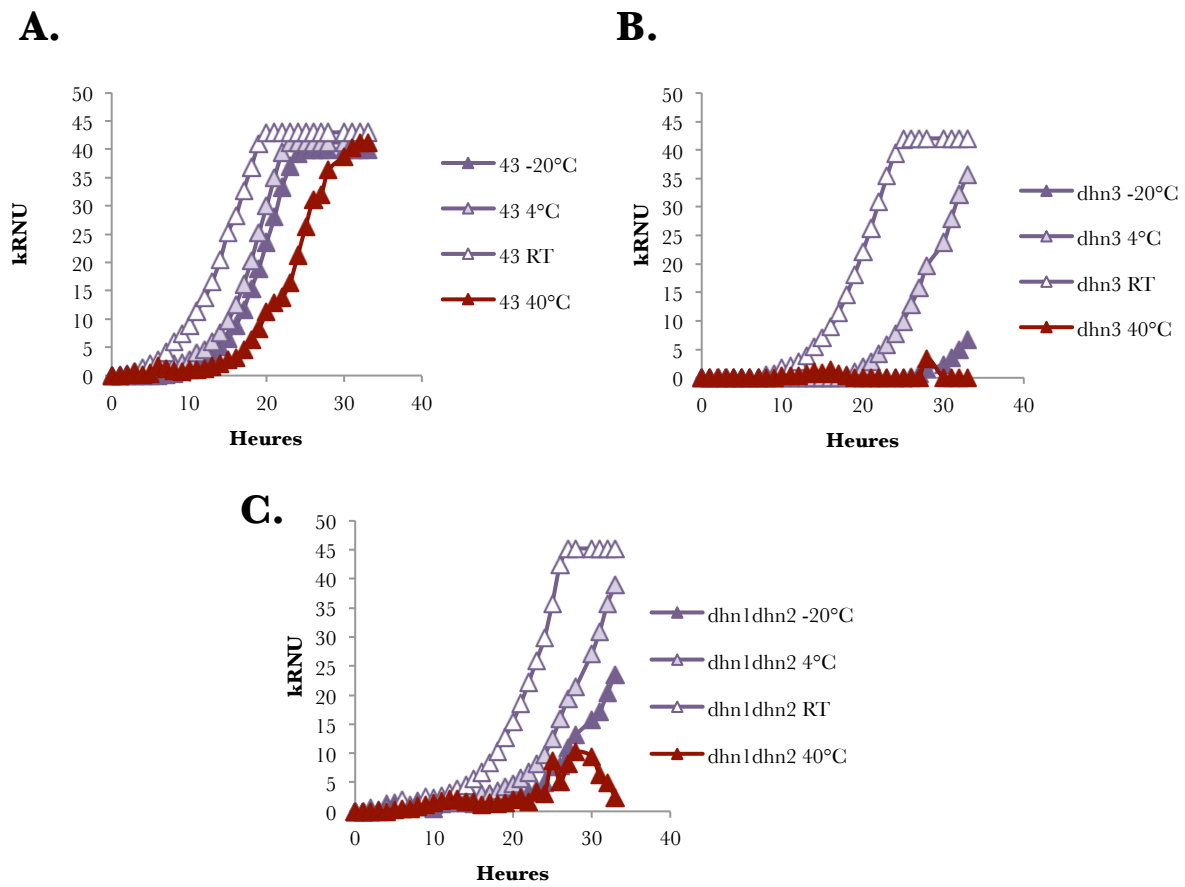


Figure 100. Croissance par néphélométrie de la souche sauvage Abra 43 WT (**A.**), du simple mutant *ab Δdhn3* (**B.**) et du double mutant *ab Δdhn1 Δdhn2* (**C.**) après l'application de différents stress thermiques pendant 10 heures.

1.8.2.4. Analyse de la croissance des mutants en présence de métabolites antimicrobiens de défense des végétaux

De la même manière, les phases précoces de croissance des différents mutants ont été analysées en présence de phytoalexines (camalexine et brassinine) et d'une phytoanticipine (allyl-isothiocyanate). Une augmentation de la sensibilité face à la camalexine et la brassinine est observée pour tous les mutants comparativement à la souche sauvage (**Figure 98**). Dans un souci de clarté, un seul exemple, illustratif de l'ensemble des données, est présenté dans le cas d'une souche pour une concentration donnée de brassinine.

Les AI-ITC, aux concentrations étudiées, n'ont que très peu d'effet sur la cinétique de croissance de la souche sauvage. En revanche, ils provoquent un retard de germination visible par le doublement de la lag-phase chez les mutants *abAdhn1*, *abAdhn2* et *abAdhn3* (**Figure 99**).

1.8.2.5. Analyse de la croissance des mutants suite à une application d'un stress thermique

L'implication des déhydrines dans la résistance aux basses températures est décrite pour les déhydrines végétales (Guo *et al.*, 1992) et également chez les déhydrines fongiques (Abba *et al.*, 2006 ; Wong Sak Hoi *et al.*, 2012).

L'incidence d'une application de différentes températures (24°C, 4°C, -20°C et 40°C) pendant 10 heures sur la capacité germinative des conidies, à l'état hydraté, a été évaluée par néphélométrie (**Figure 100**). L'intérêt de cette technique est d'évaluer un retard de germination consécutif à l'application du stress. Ces différents stress ne semblent pas affecter de manière significative la germination des mutants *abAdhn1* et *abAdhn2* (résultats non montrés). En revanche, un stockage à des températures basses (-20°C) et des températures élevées (40°C) diminue fortement la capacité germinative des conidies des mutants *abAdhn3* et *abAdhn1abAdhn2* (uniquement pour les températures élevées) par rapport à celle de la souche sauvage.

1.9. Expression hétérologue des déhydrines chez *S. cerevisiae*

Afin de mieux comprendre la ou les fonctions des déhydrines, les séquences codantes pour AbDHN1, AbDHN3 et les deux isoformes α et β d'AbDHN2 ont été introduites dans le vecteur d'expression pYes2/CT fonctionnel chez *S. cerevisiae*. L'expression de ces protéines hétérologues fusionnées à l'épitope V5 chez les levures transformées a été vérifiée par Western-blot (non montré). Ces souches de levure ont été soumises à différents traitements

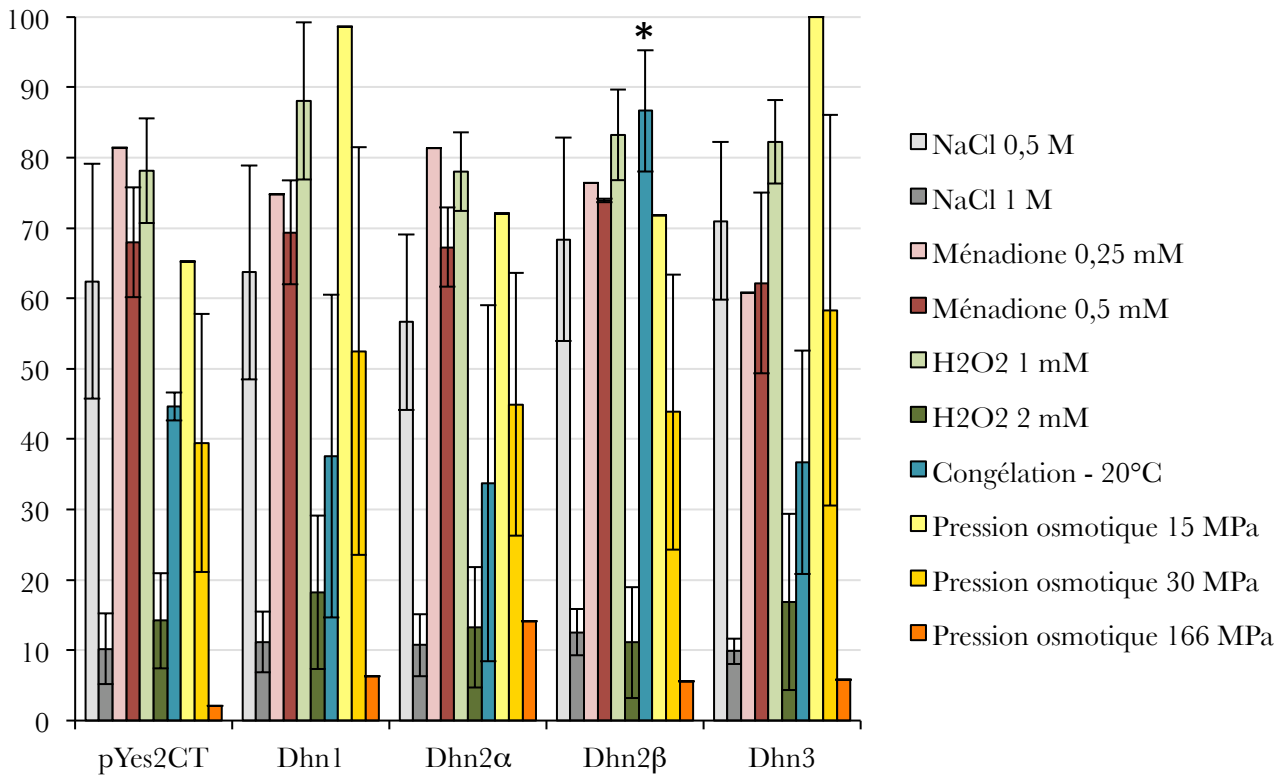


Figure 101. Histogramme représentant les pourcentages de viabilité obtenus lors des tests de résistance aux stress abiotiques sur les souches de levures.

afin de tester si l'expression des déhydrines d'*A. brassicicola* leur conférerait une résistance accrue à différents stress (salin, osmotique, oxydatif, basses température).

Les valeurs obtenues après réalisation des tests de viabilité ont été testées statistiquement par le test de Student. Les résultats obtenus n'ont pas montré de différence significative entre les souches testées et le témoin, hormis pour le test de résistance à la congélation. Les résultats non significatifs sont expliqués par une variabilité des résultats obtenus entre chaque répétition biologique pouvant être liée à des différences de niveau d'expression des protéines hétérologues chez les différentes souches de levure. Il apparaît néanmoins que des tendances se dessinent, l'analyse des résultats s'appuiera donc sur ces observations.

La **Figure 101** présente les résultats des tests de viabilité sur levures transformées après l'application de différents stress abiotiques. Pour ces expériences, la souche transformée avec le vecteur pYes vide représente la souche témoin

1.9.1. Test de résistance au NaCl

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les pourcentages de viabilité des souches étudiées. A une concentration de 0,5 M de NaCl, une faible tolérance de la souche pYdhn3 est observée en comparaison à la souche témoin pYes. Cette tendance n'est pas retrouvée à 1 M de NaCl. Cette expérience ne montre pas de phénomène de tolérance au stress salin des autres souches transformées.

1.9.2. Test de résistance au stress oxydatif

1.9.2.1. Test de résistance à la ménadione

Les résultats présentés comprennent deux doses de traitement (0,25 et 0,5M de ménadione). Les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes entre elles aux deux doses appliquées. Les résultats obtenus lors des répétitions biologiques se sont avérés peu reproductibles. De ce fait, les valeurs obtenues ne permettent pas de mettre en évidence un effet significatif des déhydrines dans la tolérance à la ménadione.

1.9.2.2. Test de résistance à l'H₂O₂

L'application d'une dose de 1 mM d'H₂O₂ sur les souches transformées semble provoquer pour certaine une inhibition plus faible que sur la souche témoin. Cette tendance semble plus marquée pour la souche pYdhn1 avec une inhibition réduite de 9,9%. A une dose

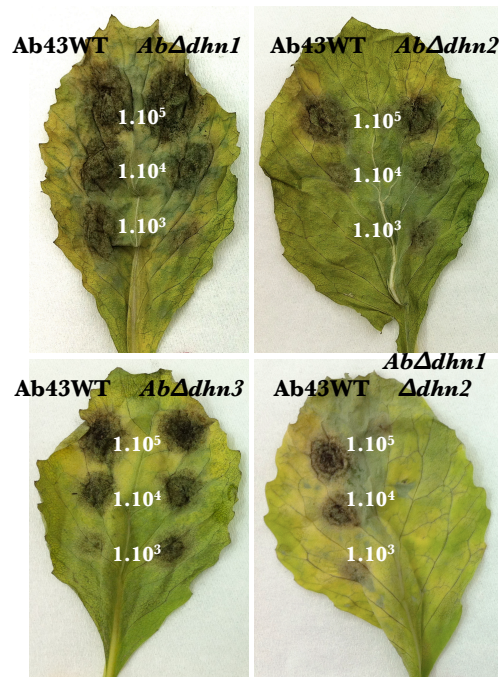


Figure 102. Tests de pouvoir pathogène et d'agressivité de la souche sauvage d'*A. brassicicola* et des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et du double mutant *abΔdhn1abΔdhn2* sur des feuilles de *B. oleracea*. Les symptômes se développent suite au dépôt de gouttes d'une suspension de spores calibrée à 1×10^3 , 1×10^4 et 1×10^5 conidies/mL.

de 2 mM, toutes les souches sont fortement inhibées. Néanmoins, pYdhn1 apparaît comme la plus tolérante.

1.9.3. Test de résistance à la congélation (-20°C)

Les résultats des tests de viabilité montrent une tolérance plus accrue à la congélation de la souche pYdhn2 β (86,6% de viabilité) en comparaison à la souche témoin pYes (44,7%). D'après l'analyse statistique, cette différence est significative.

1.9.4. Test de résistance à un stress osmotique

Les tests ont été réalisés avec trois doses de traitement. La condition à 15 MPa montre une viabilité supérieure des 4 souches de levures exprimant les déhydrines par rapport à la souche témoin. Néanmoins, ces résultats ne découlent que d'une expérience unique sans répétition biologique. Celle-ci sera nécessaire pour valider l'effet observé. Cette tendance semble toutefois se confirmer à une dose de 30 MPa avec des pourcentages de viabilité supérieurs des souches transformées en comparaison de pYes. A une dose de 166 MPa, les 5 souches sont fortement inhibées. Au regard de ces résultats, on note une tendance de tolérance à la pression osmotique supérieure avec les souches exprimant une déhydrine de manière hétérologue.

1.10. Pouvoir pathogène des mutants *abΔdhn* au stade végétatif sur feuilles

Afin d'étudier l'implication des trois déhydrines dans la capacité d'*A. brassicicola* à former des symptômes sur une plante hôte sensible, des tests de pouvoir pathogène ont été réalisés sur des feuilles de chou. La **Figure 102** présente les symptômes obtenus 6 jours après l'inoculation. Les nécroses provoquées par les trois simples mutants sont identiques à celles obtenues suite à l'inoculation de la souche sauvage. En revanche, la souche *abΔdhn1abΔdhn2* présente une agressivité fortement diminuée par rapport à la souche sauvage, quelle que soit la dose d'inoculum appliquée.

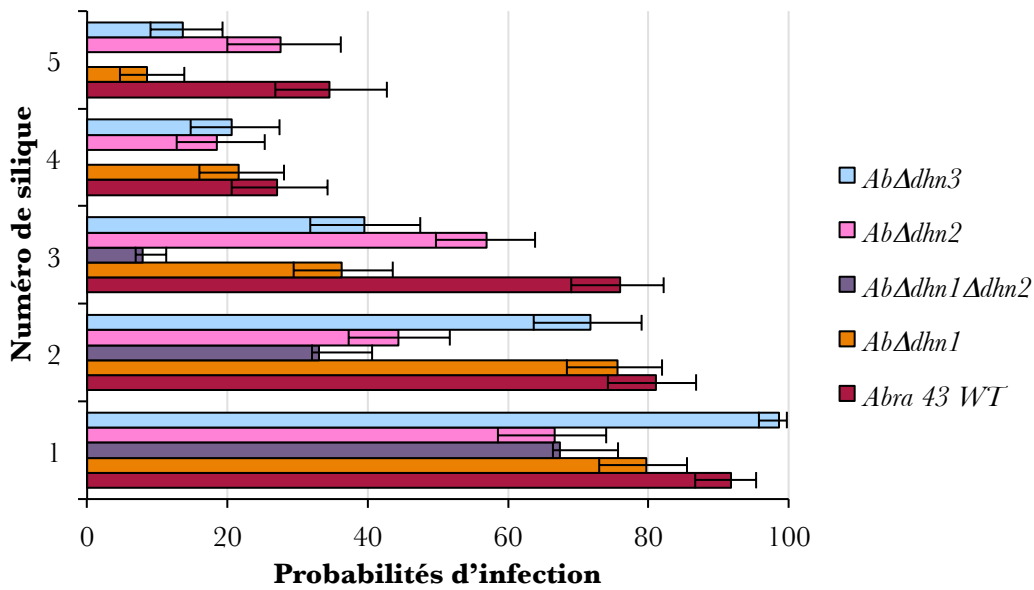


Figure 103. Influence du génotype d'*A. brassicicola* sur sa capacité à se transmettre aux graines d'*A. thaliana*. La capacité de transmission de cinq génotypes d'*A. brassicicola*, *Abra43 WT*, *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et *abΔdhn1abΔdhn2* aux graines d'*A. thaliana* (*Ler*). Capacités de transmission de chaque génotype selon l'étage de la plante. La récolte a eu lieu 10 jours après l'inoculation (jpi). Les valeurs de probabilités d'infection présentées possèdent un intervalle de confiance de 95%.

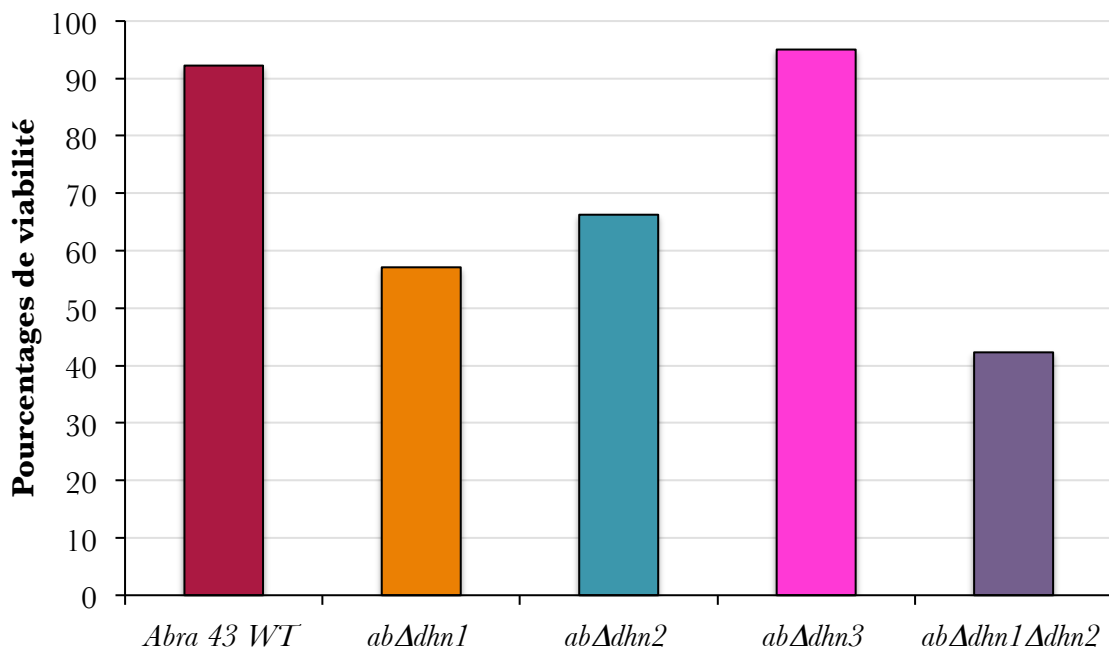


Figure 104. Proportion de conidies viables des souches *Abra43 WT*, *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et *abΔdhn1abΔdhn2* d'*A. brassicicola* après une phase de conservation à l'état sec pendant un jour.

1.11. Capacité des mutants *abΔdhn* à se transmettre aux graines d'*A. thaliana*

L'objectif de ce travail de thèse est d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de transmission d'*A. brassicicola* à et par les graines. Le pathosystème modèle *A. brassicicola* / *A. thaliana* mis en place dans ce travail a été utilisé, dans un premier temps, pour déterminer si les déhydrines jouent un rôle dans la transmission du champignon aux graines.

La capacité des souches *abΔdhn1*, *abΔdhn2*, *abΔdhn3* et *abΔdhn1abΔdhn2* à se transmettre aux graines d'*A. thaliana* a été évaluée selon la méthodologie décrite précédemment dans ce travail (**Figure 103**). Les probabilités d'infection obtenues pour chaque génotype indiquent que le double mutant se transmet, de manière significativement moins efficace que la souche sauvage et que les simples mutants qui ont un phénotype intermédiaire. La capacité d'infection des graines d'*A. thaliana* des simples mutants est également significativement plus faible que celle de la souche sauvage.

1.12. Capacité des mutants *abΔdhn* à se conserver à l'état sec *in vitro*

Dans le cas où le champignon parvient jusqu'aux graines de sa plante hôte, l'étape suivante consiste pour cet organisme à survivre sur cet organe déshydraté. Afin de déterminer si les déhydrines sont impliquées dans la réussite de cette phase du cycle de vie du champignon, la capacité des quatre souches mutantes à se conserver *in vitro* et à l'état sec a été quantifiée. Pour cela, des spores de chacune des souches ont été séchées puis conservées à température ambiante. Après réhydratation, la viabilité des conidies a été évaluée au cours d'une cinétique de conservation ; seuls les résultats de viabilité des conidies après un seul jour de conservation sont illustrés (**Figure 104**). Une forte diminution de la viabilité des conidies des mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2* et *abΔdhn1Δdhn2* est observée dès le premier jour de conservation à l'état sec contrairement à la souche sauvage d'*A. brassicicola*. Le simple mutant *abΔdhn3* présente quant à lui un phénotype identique à celui du parent sauvage. Une répétition biologique associée à des mesures par néphélométrie d'augmentation de la lag-phase (traduisant une diminution de la viabilité des conidies) consécutive au stress induit par cette conservation à sec permettra de préciser de manière quantitative les phénotypes observés.

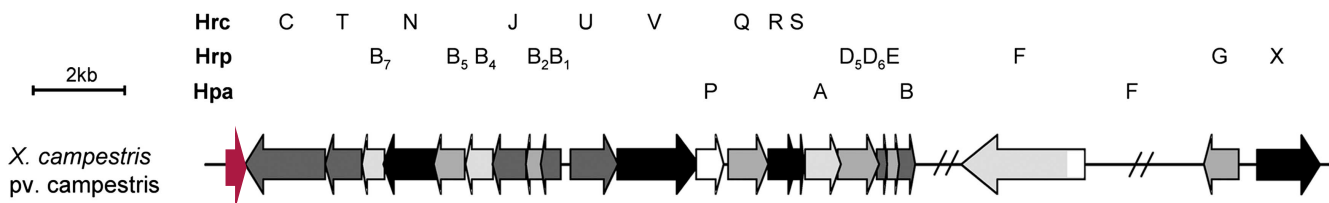


Figure 105. Représentation schématique du cluster de gènes codant le système de sécrétion de type III chez *Xcc ATCC33913*. Le gène *Xcc1240* codant une harpine bactérienne est indiqué par une flèche rouge.

GATTGATCCAACGCTTCGCTCGATCGCAGCACCATAACGGTGCTGCGCAC
ACGCATGCGCACGCTGGACGAAGCGTCTATGACGTAAACGAAATCACAGC
GCGCACCGTTGCAACGCAGCTGTTTTTCAGTGTGTTTCCGATGTTTTGCG
CAATCATGT**TTCGCAAGCAAAGCGCGCCTTCGCG**TCCTGGAAGATGCACC
GCCGTTGCCTCTTCTACTTTGCGCTCGGGGGCAGCACAGCGCCCCGGTTG
CGATCTTGCCGTTGCAACTTCCCCGGCAATCAGCGATGCATCCAGTTCAA
CCACATGAGACGAGAATCACC**ATGGACTCATCTATCGGAAACAAATTTTC**
CAACTTCATCAACCTGCAGACGATGGGCATCGGGCCCAGCAAACCCAGA
ACTCCAGTCAGCGCTCGCCTTCGGCTGACTCCGAGCAGCAGCTGGATCAG
CTGCTCGCCATGTTTCATCATGATGATGCTCCAACAGAGCCAGGGCAGCGA
TGCCGATCAGGAGTGCGGAGACGAACAACCGCAGAGCGGTCAACAGGACG
GTGTGAGTCCGTTGACGCAGATGCTGATGCAGATCGTGATGCAGCTGATG
CAGAACCAAGGCGGCGCCGGCATGGGCGGCACCAGCTTGGGTGGCGGCTT
CAATGCCAACCTGTGAGCATCACCGGCCAAGCCTGATTGACCATGCGTG
CAGGCTGCCGCGCCGTGCGGCAGCCTGCACGTTGTACCCGTATCGCGTGC
AGCCCGACGCGTTGCTCAGGGCGAGACGATATGCGGGGTGAGCAGGAACA
ACCGCTGCAACCGCGACCCGCTCTGCTGGCGATGCTTGAACAGGTTGCCG
ACCAATGGAATCCTGGACAGCCCGGGGACGTTGTTTCAGATCTGTCTGATC
GGTGTGCGGAAGCATAACCGGCGATCAGCAGGCTCTGGCCCTCGTTGACGA
AGGCCTGCGTGGTGATCTCGCTGGAGGTGATGACGGGAATGCCATCGACG

Figure 106. Séquence nucléotidique codant la protéine Xcc1240 (indiquée en rouge). La localisation de la PIP-box dans la séquence promotrice est indiquée en orange.

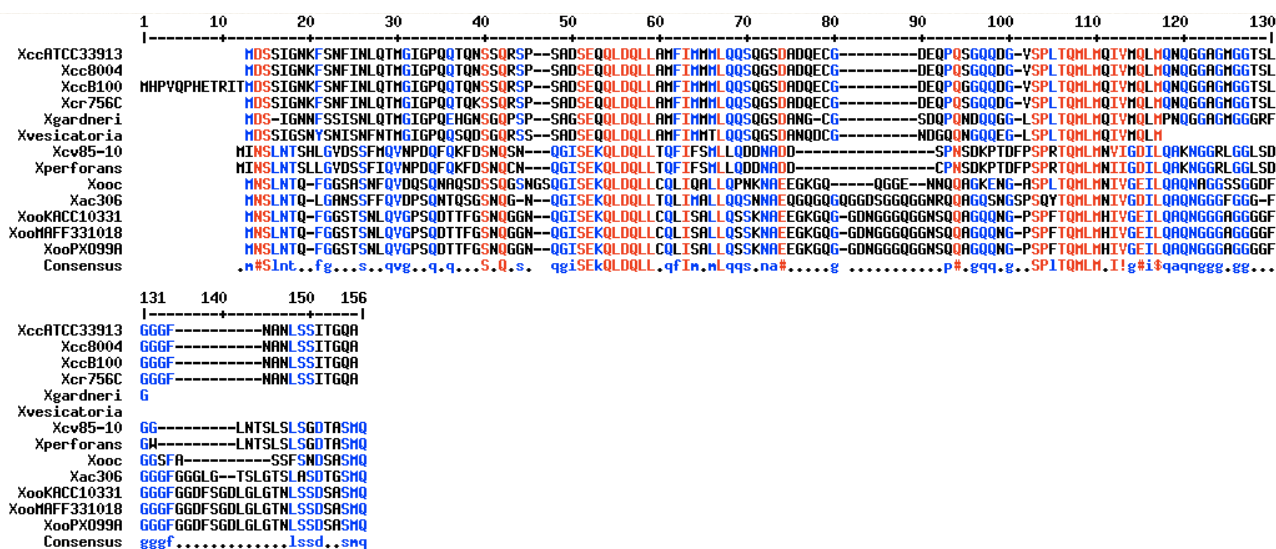


Figure 107. Alignement réalisé avec le logiciel MultAlin à partir des séquences protéiques des harpinines de différentes souches de *Xanthomonas* séquencées. Le domaine protéique QLQDQLL est consensus à l'ensemble des souches.

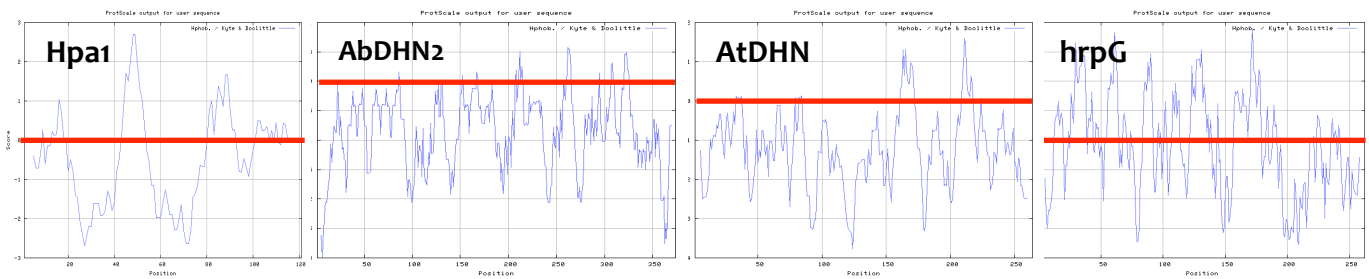


Figure 108. Profils d'hydrophilie de la harpine de *Xcc ATCC33913*, de la déhydrine AbdDHN2 d'*A. brassicicola*, d'une déhydrine d'*A. thaliana* et de la protéine HrpG codant un régulateur de l'expression de gènes impliqués dans la formation du SST3 des bactéries réalisé à l'aide du logiciel ProtScale. Les résidus ayant un score à 0 sont considérés comme hydrophiles.

Tableau 10. Composition en acides aminés caractérisant la harpine de *Xcc ATCC33913*, de la déhydrine AbdDHN2 d'*A. brassicicola*, d'une déhydrine d'*A. thaliana* et de la protéine HrpG codant un régulateur de l'expression de gènes impliqués dans la formation du SST3 des bactéries (valeurs exprimées en pourcentage de la composition totale).

	Cystéine	Glycine	Sérine	Thréonine	Tryptophane
Hpa1	0,8	13,2	12,4	4,1	0
AbdDHN2	0	22,5	12,8	16,8	0
AtDHN	0	3,8	6,8	8,3	0
HrpG	3,8	4,2	7,6	6,1	1,9

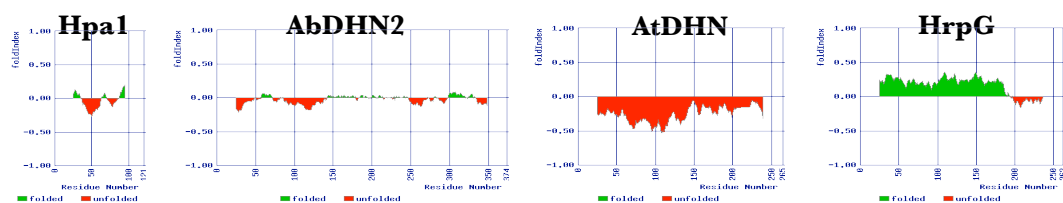


Figure 109. Prédiction du repliement global de la harpine de *Xcc ATCC33913*, de la déhydrine AbdDHN2 d'*A. brassicicola*, d'une déhydrine d'*A. thaliana* et de la protéine HrpG codant un régulateur de l'expression de gènes impliqués dans la formation du SST3 des bactéries à partir du logiciel FOLDINDEX. Un score inférieur à 0 indique l'absence de repliement dans la région concernée.

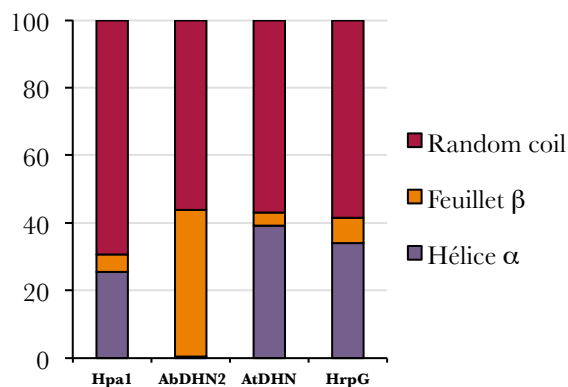


Figure 110. Prédiction de structures secondaires à partir de la séquence primaire de la harpine de *Xcc ATCC33913*, de la déhydrine AbdDHN2 d'*A. brassicicola*, d'une déhydrine d'*A. thaliana* et de la protéine HrpG codant un régulateur de l'expression de gènes impliqués dans la formation du SST3 des bactéries (réalisée à l'aide du programme PELE).

2. La harpine de *X. campestris* pv. *campestris*

2.1. Analyse structurale de la séquence nucléotidique codant une harpine chez *X. campestris* pv. *campestris*

La souche de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 possède un gène qui code une protéine de type « harpine ». Ce gène est situé au locus *Xcc1240* (*hpa1*) du génome séquencé de cette souche. La longueur de la séquence nucléotidique est de 366 pb. Cette séquence code une protéine de 121 acides aminés.

Ce gène est situé de manière proximale au cluster de gènes qui code le système de sécrétion de type III (**Figure 105**). L'analyse de la séquence promotrice du gène *hpa1* révèle l'existence d'une « PIP-box » (Plant Inducible Promoter) (**Figure 106**).

2.2. Analyse structurale de la séquence protéique de Hpa1 chez *X. campestris* pv. *campestris*

2.2.1. Domaines protéiques de Hpa1 spécifiques aux harpines bactériennes

L'alignement de séquences protéiques de différentes harpines d'espèces de *Xanthomonas* dont les génomes sont séquencés à ce jour permettent d'identifier des domaines fortement conservés caractéristiques des harpines bactériennes (**Figure 107**). Le premier domaine comprenant les six acides aminés très conservés « QLDQLL » qui fait partie d'un plus grand domaine protéique déjà identifié dans la littérature comme étant indispensable à l'élicitation d'une réponse hypersensible chez une plante non hôte (Kim *et al.*, 2004).

2.2.2. Caractéristiques physico-chimiques de la protéine Hpa1

Le gène *hpa1* (*Xcc1240*) code une protéine de 121 acides aminés et de 12,8 kDA. Le profil d'hydrophilie indique l'existence de trois domaines hydrophiles (**Figure 108**). La séquence primaire de cette protéine est caractérisée par une forte proportion de résidus glycine (Gly), sérine (Ser), thréonine (Thr) ; une faible proportion de résidus cystéine (Cys) ; et une absence de résidus tyrosine (Tyr) et tryptophane (Trp) (**Tableau 10**). La prédiction *in silico* de la présence de régions désordonnées dans la séquence protéique d'Hpa1 a permis de révéler que la majeure partie de sa séquence est intrinsèquement désordonnée (**Figure 109**). Cela est appuyé par la faible proportion de structures secondaires prédite : 5% de feuillets β et 25% d'hélices α (**Figure 110**) même si les différences observées avec une protéine structurée telle que HrpG ne sont pas tranchées.

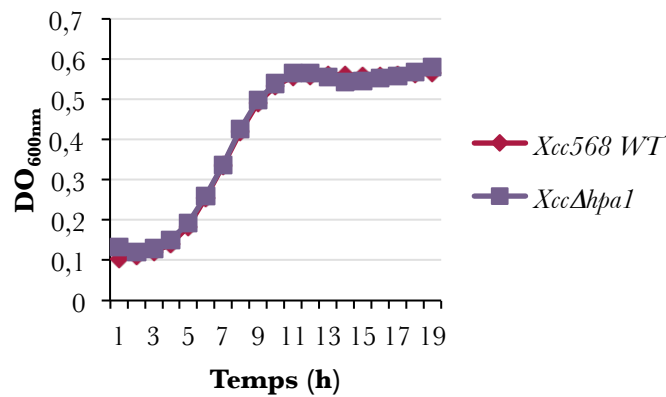


Figure 111. Dynamique de croissance par spectrophotométrie de la souche sauvage *Xcc ATCC33913* et du simple mutant *XccΔhpa1* en milieu TSB 10%.

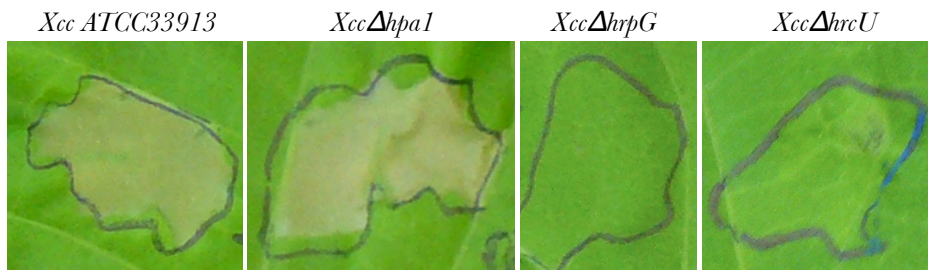


Figure 112. Réactions du tabac (*Nicotiana tabacum*) deux jours après l'inoculation par infiltration du limbe avec *Xcc ATCC33913* et des mutants *XccΔhpa1*, *XccΔhrpG* et *XccΔhrcU*. Ces deux dernières souches, altérées au niveau du système de sécrétion de type III, respectivement au niveau de la régulation et de la sécrétion, sont incapables de former une HR sur une plante non hôte. Des HR sont nettement visibles *Xcc ATCC33913* et *XccΔhpa1*.

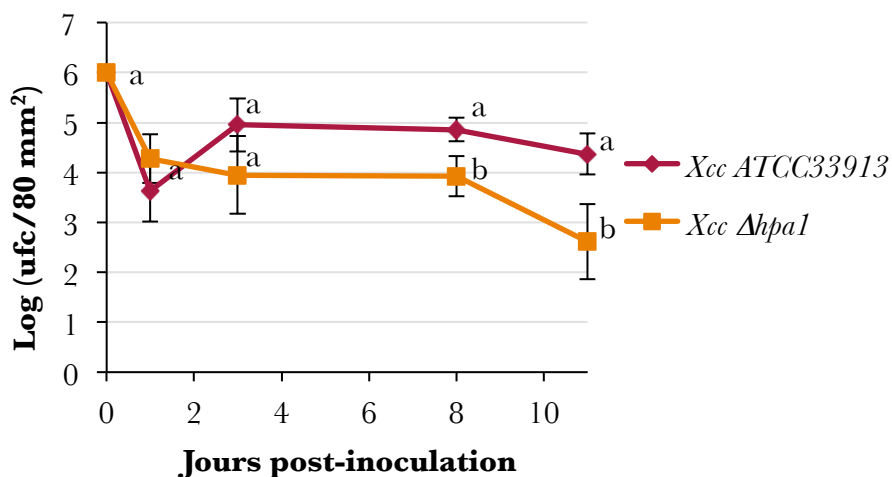


Figure 113. Dynamique des tailles de populations bactériennes associées aux microcosmes de la souche sauvage de *Xcc ATCC33913* et du mutant *XccΔ1240* à 25°C selon une cinétique de temps. Les lettres différentes indiquent que les valeurs sont significativement ($p < 0,05$) différentes au sein d'un prélèvement entre souches pour un même traitement, sur la base des tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney.

2.3. Analyse fonctionnelle de Hpa1 chez *X. campestris* pv. *campestris*

Pour étudier de manière plus précise la fonction de la protéine Hpa1 dans le cycle de vie de *X. campestris* pv. *campestris*, un mutant de délétion a été construit par mutagenèse dirigée dans la souche *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. La construction a été vérifiée de la même manière que pour les mutants affectés dans des régulateurs des systèmes de transduction du signal à deux composantes.

L'absence d'effet pléiotrope de cette mutation a été vérifiée par la dynamique de croissance *in vitro* des mutants par rapport à la souche sauvage (**Figure 111**).

2.3.1. Tests de réaction d'hypersensibilité sur tabac

Le développement d'une réaction hypersensible (HR) est très visible sur *Nicotiana tabacum* pour la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. Des symptômes évolutifs provoqués par *X. campestris* pv. *campestris* sur *Nicotiana benthamiana* sont visibles principalement sur la face inférieure des feuilles. La souche *XccΔhpa1* provoque les mêmes réactions que la souche sauvage, que ce soit sur *N. tabacum* et *N. benthamiana* (**Figure 112**). Les souches *Xcc::hrpG* et *Xcc::hrcU*, utilisées comme témoin, ne provoquent aucune réaction d'hypersensibilité sur les deux espèces de tabac en raison de l'absence d'un système de sécrétion de type III complet.

2.3.2. Capacité de survie du mutant *XccΔhpa1* en microcosmes

La capacité de survie *in vitro* de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 et du mutant *XccΔhpa1* sur des microcosmes a été évaluée par un suivi des dynamiques de populations associées à ces microenvironnements. L'influence de la température de conservation a également été évaluée en quantifiant la survie des différentes souches à 4°C et à 25°C. La capacité de survie du mutant *XccΔhpa1* reste inchangée au cours du temps à 4°C (résultats non montrés) alors qu'elle varie à 25°C (**Figure 113**). Le mutant *XccΔhpa1* présente des difficultés à se conserver dans le temps sur des microcosmes à 25°C par rapport à la souche sauvage à partir du septième jour de conservation. En fin de cinétique de conservation, un différentiel de plus d'un log est observable entre la souche sauvage et le mutant.

***D**iscussion générale*

CHAPITRE 4 : Discussion générale

La transmission à et par la semence, étape clé du cycle de vie de nombreux agents phytopathogènes, nécessite d'être mieux comprise pour agir de manière préventive et efficace sur les maladies occasionnées par ces microorganismes. Ce travail de thèse avait pour ambition de poursuivre l'identification de mécanismes moléculaires impliqués spécifiquement dans ce processus. Les travaux antérieurs, essentiellement réalisés au sein des deux équipes d'accueil de cette thèse, avaient été essentiellement réalisés sur des pathosystèmes en conditions agronomiques. La première étape a donc consisté à mettre en place des pathosystèmes au stade reproducteur avec des organismes modèles et de mieux comprendre les interactions histologiques entre les agents pathogènes et la plante hôte : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*/*Arabidopsis thaliana* et *Alternaria brassicicola*/*Arabidopsis thaliana*. La seconde étape a consisté à caractériser par une approche ciblée à la fois des gènes clés codant des déterminants de cette phase du cycle infectieux chez les pathogènes et des gènes impliqués chez l'hôte dans la modulation de la colonisation par le champignon.

• La mise en place des pathosystèmes modèles

Trois voies de transmission des agents pathogènes aux semences sont décrites dans la littérature (Maude, 1996). La voie préférentielle de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* et d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana* a été le premier point à déterminer. Dans le cas du pathosystème bactérien, la voie florale a tout d'abord été testée par le dépôt d'une suspension bactérienne calibrée à différentes concentrations sur chacune des fleurs présentes au moment de l'inoculation. En effet, pour nombre de microorganismes phytopathogènes, les fleurs sont connues pour être des voies d'entrée privilégiées dans la plante (Van der Wolf et van der Zouwen, 2010 ; Köhl et van der Wolf, 2005). Différentes expériences indépendantes nous ont permis de montrer que la voie florale n'est pas la voie préférentielle de transmission de *X. campestris* pv. *campestris* aux graines d'*A. thaliana*. Ce résultat est cohérent avec la nature du stigmate d'*A. thaliana*. En effet, les *Brassicaceae* possèdent des stigmates secs (UpdeGraff *et al.*, 2009) composés essentiellement de protéines, glycoprotéines et lipides. L'hydratation de ces stigmates constitue un mécanisme finement régulé et est consécutive à l'adhésion et à la reconnaissance du grain de pollen. A l'inverse, les stigmates humides couverts d'exsudats lipophiles et exopolysaccharidiques (Heslop-Harrison et Shivanna, 1977) permettent une

meilleure adhésion du pollen, de bactéries ou de spores fongiques. C'est par exemple le cas de *Nicotiana tabacum* qui possède un stigmate humide (Allen *et al.*, 2010). Le rôle de l'hydratation du stigmate dans la colonisation du système floral de Pomoïdées par *Erwinia amylovora* a également déjà été démontré (Pusey, 2000). De plus, le caractère autogame strict de la fécondation d'*A. thaliana* ne favorise pas la pollinisation via des insectes, vecteurs potentiels de bactéries transmissibles aux semences (Van der Wolf et van der Zouwen, 2010 ; Kaiser et Vakili, 1978). Une étude récente menée sur chou-fleur a permis de démontrer que *X. campestris* pv. *campestris* est capable de se transmettre par voie florale après une inoculation par un insecte vecteur, *Calliphora vomitora*. Suite à des désinfections de surface, ces auteurs ont suggéré que la bactérie puisse se trouver sous l'enveloppe de la graine. Cette localisation interne est dépendante du cultivar de chou-fleur car aucune bactérie n'est détectée sur des graines de certains cultivars après un traitement des graines à l'eau chaude (Van der Wolf et van der Zouwen, 2010). Malgré la nature sèche des stigmates des *Brassicaceae*, ces résultats de transmission par voie florale de *X. campestris* pv. *campestris* nous amènent à penser que des mécanismes physiologiques spécifiques à chaque plante hôte d'une même famille botanique permettent ou non la transmission de cette bactérie par la voie florale. Nous pouvons également émettre comme hypothèse que l'insecte ouvre une voie physique naturelle, lors de sa phase de nutrition, qui permette à *X. campestris* pv. *campestris* d'accéder à l'ovule de la fleur sans devoir s'adapter aux conditions défavorables liées à la nature du stigmate.

La mise en évidence de la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* par voie vasculaire a été envisagée par deux stratégies d'inoculation distinctes : l'injection de l'inoculum soit dans les feuilles, soit dans la hampe florale. Le dépôt de l'inoculum dans les hampes florales a permis d'obtenir des fréquences de transmission optimales et répétables contrairement à l'injection de l'inoculum dans les feuilles. Aucune corrélation entre la concentration d'inoculum et les fréquences de transmission aux graines d'*A. thaliana* n'a été observée. En effet, les meilleures fréquences de transmission (0,5) ont été obtenues avec une concentration d'inoculum de 1×10^7 ufc/mL alors qu'une augmentation de cette concentration (1×10^8 ufc/mL) diminue significativement la fréquence de transmission (0,13). Cet apport important de cellules bactériennes entraîne soit l'arrêt du développement total de la plante, soit l'avortement des fleurs et l'absence de formation de siliques. Cela confirme le fait que la transmission à la semence se fait préférentiellement en conditions asymptomatiques. Des études menées sur d'autres pathosystèmes indiquent également une transmission de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Darsonval *et al.*, 2008) et d'*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Walcott *et al.*, 2003) respectivement aux graines de haricot et de pastèque en conditions asymptomatiques

même suite à une inoculation des fleurs avec un fort inoculum bactérien (10^9 ufc/mL).

Dans notre pathosystème, bien que l'ensemble des hampes florales soit colonisé par de fortes populations bactériennes, la transmission à la graine de *X. campestris* pv. *campestris* est toujours restreinte à un certain nombre de plantes. Ceci suggère que des conditions physiologiques de la plante bien particulières sont requises pour assurer cette phase du cycle de vie de *X. campestris* pv. *campestris*. Ces conditions pourraient être liées entre autres au stade de développement de la plante et aux défenses constitutives qu'elle possède.

Dans le cas du pathosystème fongique, la vascularisation d'*A. brassicicola* n'ayant jamais été observée, deux méthodes d'inoculation distinctes ont été envisagées : la voie florale et la voie par contact direct avec le fruit. La voie florale ne nous a pas permis d'obtenir une transmission d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana*. Le caractère nécrotrophe de ce champignon l'amène à tirer profit immédiatement des tissus des pièces florales dont il se sert comme substrat nutritif grâce à son arsenal de toxines et d'enzymes lytiques. Dans notre cas, cela entraîne l'arrêt immédiat du développement de la plante. La mise en évidence d'une transmission d'*A. brassicicola* par la voie florale a cependant été déjà décrite dans le cadre du pathosystème *Cakile maritima*/*A. brassicicola* (Oliver *et al.*, 2001). Cependant, les taux d'infection des graines restent très faibles et sont de l'ordre de 4,27% (n=351). La fragilité et la petite taille des pièces florales d'*A. thaliana* comparée à celles de la roquette de mer (*C. maritima*) peut également être un facteur explicatif à cette sensibilité accrue. La voie de transmission par contact direct des spores d'*A. brassicicola* avec les siliques est le mode de colonisation le plus efficace (Oliver *et al.*, 2001 ; Maude et Humpherson-Jones, 1980). Ainsi, dans le cadre du pathosystème modèle *A. thaliana*/*A. brassicicola*, la seconde méthode d'inoculation envisagée a consisté à déposer des conidies d'*A. brassicicola* directement sur les siliques d'*A. thaliana*. Celle-ci nous a permis d'obtenir des probabilités d'infection satisfaisantes d'un point de vue global par plante nous permettant ainsi d'envisager des comparaisons phénotypiques entre différents génotypes fongiques. Le stade de développement de la plante au moment de l'inoculation est primordial. En effet, celle-ci doit avoir lieu lorsque la plante possède 10 siliques afin d'obtenir des résultats exploitables et reproductibles. De la même manière, l'influence du délai entre la date d'inoculation et la date de récolte a été évaluée. Que la récolte intervienne 10 ou 20 jours après l'inoculation, aucune différence significative n'a été observée sur les probabilités d'infection obtenues. Dans le but d'optimiser la durée des expérimentations, notre choix s'est porté sur un délai de 10 jours entre l'inoculation et la récolte. Un gradient de transmission sur la plante a été observé : les siliques les plus âgées sont toujours les plus contaminées et les

probabilités d'infection diminuent sur les étages les plus hauts. Ceci est également observable en conditions naturelles, a été préalablement décrit dans le cadre d'une étude épidémiologique sur *A. brassicicola* dans une culture de *B. oleracea* (Humpherson-Jones et Maude, 1982). Le confinement de l'infection dans les étages les plus bas de la plante permettrait au champignon d'être protégé par la végétation environnante lors de la colonisation des siliques. De manière plus générale, le mouvement des spores serait maintenu sur les feuilles pendant la croissance des plantes à l'intérieur de la canopée et les mouvements verticaux seraient ainsi réduits. La contamination des siliques interviendrait à la base de la plante pour remonter progressivement vers la canopée. L'observation précoce des siliques les plus jeunes constitue donc un élément de choix pour la mise en place d'une lutte prophylactique (Humpherson-Jones et Maude, 1982).

L'impact de facteur génétique chez l'hôte, telle que la composition en flavonoïdes des graines, sur la modulation de la transmission a également été envisagé uniquement dans le cas du pathosystème fongique. Celui-ci a été mis en place avec l'écotype *Ler* d'*A. thaliana* pour lequel de nombreux mutants sont disponibles, contrairement à l'écotype Sf-2 utilisé dans le pathosystème bactérien. La résistance de l'écotype *Ler* à *X. campestris* pv. *campestris* et la quasi-absence de mutants construits dans l'écotype Sf-2 ne nous a pas permis d'étudier les facteurs génétiques de la plante qui influence la transmission de la bactérie aux graines.

Les flavonoïdes, molécules du métabolisme secondaire, ont diverses fonctions de protection reconnues chez les plantes (Moore *et al.*, 2004 ; Tattini *et al.*, 2004 ; Barcelo and Poschenrieder, 2002) et sont considérés comme pouvant avoir un rôle de défense contre les pathogènes des plantes, y compris au niveau des semences (Treutter, 2006). Les flavonoïdes pourraient jouer un rôle de défense au niveau des semences en contribuant à la résistance mécanique des téguments contre l'infection par des micro-organismes, mais également en contribuant à l'imperméabilité des téguments, ce qui limiterait la diffusion des nutriments (oses ou acides aminés) permettant la prolifération des micro-organismes, à partir de la graine (Mohamed-Yaseen *et al.*, 1994 ; Debeaujon *et al.*, 2000). Les flavonoïdes pourraient également avoir une action directe sur les champignons. Par exemple, chez le blé, outre un rôle de barrière mécanique, les flavonoïdes aurait une action inhibitrice d'enzymes de dégradation des parois produites par le champignon (cellulases, xylanases et pectinases). La naringénine, le kaempférol, la quercétine et la dihydroquercétine inhibent la croissance mycélienne chez le champignon *Magnaporthe grisea* (Mohamed-Yaseen *et al.*, 1994 ; Treutter, 2006). Les mutants d'*A. thaliana* dépourvus de flavonoïdes sont nommés « transparent testa » (*tt*) en référence à une perte partielle ou complète des pigments de l'enveloppe de la graine. Les graines

dépourvues de flavonoïdes présentent une modification de la couleur : chez *A. thaliana*, les graines produites par les mutants dans la voie de synthèse des flavonoïdes sont jaune pâle à brun pâle (selon le type de mutation), alors que les graines sont brunes chez les génotypes sauvages (Debeaujon *et al.*, 2000). Les graines blanches produites par certaines lignées de haricot sont plus sensibles que les graines brunes aux attaques de pathogènes du sol (Mohamed-Yaseen *et al.*, 1994). Le gène *tt4* code la chalcone synthase, la première enzyme impliquée dans cette voie de biosynthèse (Saslowsky *et al.*, 2000). Ainsi, nous émettons l'hypothèse, qu'en l'absence totale de flavonoïdes dans les testa de la graine, des différences comportementales d'*A. brassicicola* pourraient être observées en terme de taux de contamination des graines.

Le mutant *tt4-1* d'*A. thaliana*, déficient en flavonoïdes dans les graines, a été utilisé pour tester la capacité de transmission de la souche sauvage d'*A. brassicicola*. De manière surprenante, la souche sauvage d'*A. brassicicola* se transmet moins efficacement aux graines de ce mutant qu'à celles de l'écotype sauvage *Ler*. Différentes descriptions bibliographiques indiquent un rôle des flavonoïdes dans la protection contre des organismes phytopathogènes. Les résultats obtenus suggèrent que la présence d'autres métabolites pourrait gêner la colonisation de la graine par le champignon. En effet, une étude métabolomique récente semble montrer que certains composés sont sur-accumulés dans des graines du mutant *tt4-1* comparativement à celles de l'écotype sauvage (Böttcher *et al.*, 2008). Il s'agit de molécules telles que des esters aromatiques de la choline, des métabolites dérivés du sinapate et des produits de dégradation des gluconisolates. Bien que l'action des esters de choline phénoliques et des dérivés du sinapate sur *A. brassicicola* est inconnue, l'activité antimicrobienne des produits de dégradation des glucosinolates est bien décrite (Sellam *et al.*, 2007). Des études complémentaires de transmission à la semence doivent être menées en utilisant différents mutants « *transparent testa* » pour conclure quant au rôle des flavonoïdes dans la transmission d'*A. brassicicola* à la semence d'*A. thaliana*.

Dans le but de mieux identifier de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission d'*A. brassicicola* à la graine d'*A. thaliana*, une approche sans *a priori* a été engagée récemment dans le laboratoire dans le but d'analyser le transcriptome d'*A. brassicicola*, lors de la colonisation des graines, grâce à l'utilisation de puces à ADN couvrant l'ensemble des ORFs (Open Reading Frame) identifiés dans son génome. Les premiers résultats ont permis d'identifier plusieurs gènes candidats spécifiquement impliqués dans la phase de transmission à la semence. En effet, lorsque l'on compare les gènes surexprimés chez le champignon spécifiquement lors de la colonisation de la graine à ceux surexprimés lors de la colonisation

d'une feuille, peu de gènes communs aux deux conditions sont identifiés (N'Guyen, 2012). L'expression de ces gènes candidats devra être analysée en PCR quantitative pour valider les résultats de la puce à ADN. De plus, une approche fonctionnelle par mutagenèse dirigée permettra de valider leur implication dans le déterminisme de la transmission à la semence en utilisant le pathosystème mis au point lors de ce travail de thèse.

• **L'histologie de la transmission des agents pathogènes aux graines**

L'interaction entre les partenaires de ces pathosystèmes modèles a été également étudiée d'un point de vue microscopique. L'objectif était de mieux comprendre les interactions histologiques au niveau tissulaire et cellulaire lors de la transmission de chacun des deux pathogènes à et par la semence d'*A. thaliana*.

La colonisation de la hampe florale d'*A. thaliana* par *X. campestris* pv. *campestris* lors de la transmission à la semence a été suivie à différents temps suivant l'inoculation grâce au marquage constitutif d'une souche avec la GFP. L'observation de coupes de hampes florales contaminées par *X. campestris* pv. *campestris* a permis de la localiser strictement soit dans la lumière des vaisseaux du xylème, sous forme d'agrégats bactériens, soit dans l'espace apoplastique. Ce dernier est constitué de l'ensemble des interstices des parois cellulaires et des cellules mortes du xylème. Des auteurs émettent l'hypothèse que la sève brute circulant dans les vaisseaux du xylème constitue un continuum avec l'apoplasme (Ligat *et al.*, 2011). En effet, ces vaisseaux possèdent des perforations de différentes natures (Raven *et al.*, 2000). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse, devant cette double localisation, que *X. campestris* pv. *campestris* puisse tirer profit d'un maximum de sève brute en augmentant sa surface de contact avec cette dernière. Des hypothèses quant au cheminement de *X. campestris* pv. *campestris* depuis la hampe florale jusqu'à la graine ont été émises et permettent de supposer que cette bactérie contamine les graines en colonisant le funicule à partir de siliques contaminées (Köhl et van der Wolf, 2005). Le funicule est le cordon qui relie l'ovule puis plus tardivement la graine au placenta. Cependant, ces informations n'ont jamais fait l'objet d'observations microscopiques précises permettant d'illustrer ces propos. Ainsi, un des objectifs de cette étude a été de combler le manque de données à ce sujet. L'observation de graines contaminées par une souche de *X. campestris* pv. *campestris* marquée constitutivement avec la GFP s'est avérée complexe en raison d'une forte autofluorescence des téguments de la graine. Des essais de séparation spectrale en microscopie confocale à balayage laser ont été menés en dissociant les spectres

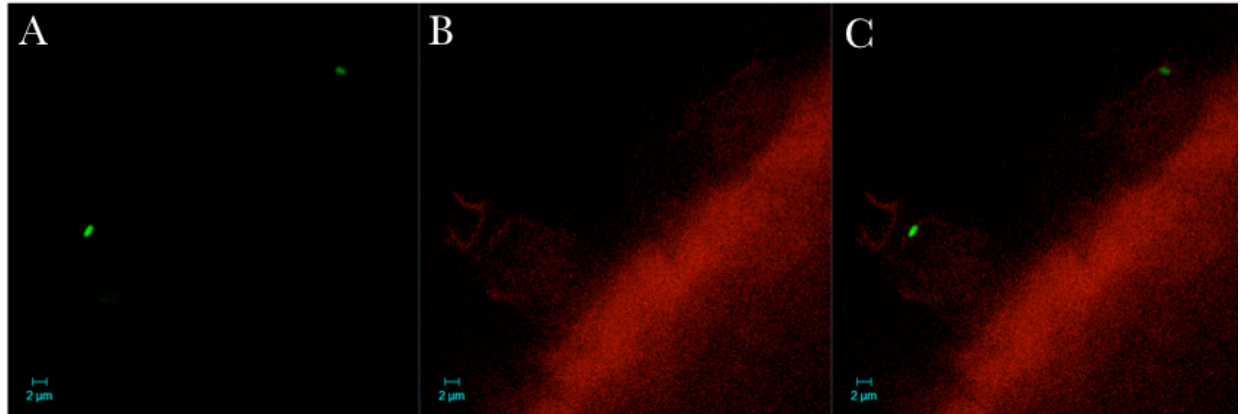


Figure 114. Observations en microscopie confocale à balayage laser (Zeiss 780) par séparation spectrale d'une cellule de *X. campestris* pv. *campestris* exprimant constitutivement la GFP (**A.**) sur une graine d'*A. thaliana* (**B.**) suite à une infiltration sous vide de l'inoculum bactérien. **C.** Superposition de l'émission de la GFP et de l'autofluorescence.

d'émission de la GFP et de l'autofluorescence. Grâce à une collaboration avec Philippe Grappin (AgroParisTech, Paris) nous avons pu appliquer cette technique sur des graines contaminées par infiltration sous vide avec la souche *X. campestris* pv. *campestris* GFP. Ainsi, des cellules bactériennes ont pu être observées sur les téguments de la graine, au niveau des columelles (**Figure 114**). Cette technique prometteuse pourrait permettre de visualiser d'une part la localisation précise de *X. campestris* pv. *campestris* sur et dans les graines et d'autre part son mode de survie (cellules libres et/ou cellules agrégées).

Dans le cas du pathosystème fongique, des suppositions sans imagerie à l'appui, ont longtemps été faites quant à la localisation d'*A. brassicicola* sur les graines hôtes (Maude, 1996 ; Maude & Humpherson-Jones, 1980). Nos observations réalisées en microscopie électronique à balayage (MEB) confirment le fait que le mycélium du champignon colonise activement la surface des graines en produisant ponctuellement des conidies. Des points de pénétration ont été observés en MEB et en microscopie confocale suggérant qu'*A. brassicicola* est capable de coloniser les graines de manière plus interne. Cependant, en raison d'une autofluorescence importante des téguments et de l'embryon de la graine, nous n'avons pas pu déterminer la profondeur de colonisation des tissus de la graine par le champignon. Une étude récente a montré qu'en cas d'attaques sévères du champignon, celui-ci peut atteindre les tissus embryonnaires (Köhl *et al.*, 2010). L'étude de la colonisation des siliques par *A. brassicicola* présente un côté novateur car aucune étude n'a permis de déterminer les différents modes de colonisation des siliques par ce champignon. La voie de contamination *via* le replum est souvent celle qui est la plus fréquemment citée (Maude, 1996). Les observations, réalisées en MEB, ont permis de confirmer cela. De plus, deux autres voies de pénétration ont également été mises en évidence : la pénétration par les stomates et les espaces intercellulaires. Cette colonisation active des valves de la silique aboutit à la colonisation des graines *via* un chemin préférentiel composé du replum, du funicule et du hile de la graine (Maude, 1996).

Les deux pathosystèmes modèles mis en place nous ont ensuite servi d'outil pour identifier des déterminants moléculaires chez les deux pathogènes de la transmission à la semence, en lien d'une part avec leur capacité de colonisation des tissus de l'hôte et d'autre part, avec leur capacité de survie sur les graines. Nous avons décliné cette étude sous trois axes en étudiant la versatilité nutritionnelle de *X. campestris* pv. *campestris* lors de la transmission à la graine, la perception et la transduction du signal de stress ainsi que le rôle de protéines

déstructurées de type LEA impliquées dans la réponse à divers stress chez les deux pathogènes lors de la transmission à la graine et la survie et enfin, des protéines de type LEA en lien avec la survie sur les graines.

- **La versatilité nutritionnelle**

Deux gènes liés à l'utilisation du xylane des parois végétales ont été ciblés chez *X. campestris* pv. *campestris*, par une approche de mutagenèse dirigée, pour tester l'hypothèse de la capacité de la bactérie à s'adapter à différents environnements nutritifs. Un mutant (*Xcc*Δ2828), altéré dans la production d'un des deux transporteurs TonB-dépendants impliqué dans l'utilisation du xylane, semble significativement affecté dans sa capacité à coloniser les valves et à se transmettre aux graines. En revanche, le second simple mutant, *Xcc*Δ4120, colonise la hampe florale, les valves et les graines d'*A. thaliana* de la même manière que la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'une spécificité de substrat existe pour chacun des deux transporteurs. Le transporteur codé par le gène *Xcc2828* pourrait être impliqué dans l'utilisation d'un composé spécifique des valves des siliques. Une seconde hypothèse, moins parcimonieuse, peut également être émise. Nous pouvons imaginer que ces deux TBDTs jouent un rôle chronologique dans la dégradation du xylane et que le TBDT codé par le gène *Xcc2828* intervienne dans un premier temps et le TBDT codé par le gène *Xcc4120* dans un second temps. Cependant, une étude récente menée au sein du laboratoire LIPM et portant précisément sur l'utilisation du xylane chez *X. campestris* pv. *campestris* n'a pas mis en évidence de différences majeures de phénotypes entre ces deux mutants dans leurs conditions (Déjean, 2011) hormi une diminution de la capacité de survie du mutant *Xcc*Δ2828 dans la phyllosphère de chou. L'expression de ces deux gènes est fortement induite en présence de xylose et xylo-oligosaccharides tel que le xylobiose, suggérant un rôle de ces deux protéines dans le transport des produits de dégradation du xylane. Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse que les différents tissus rencontrés lors la transmission et particulièrement lors du passage des tissus de la hampe florale à ceux de la silique nécessite une adaptation particulière de *X. campestris* pv. *campestris*, passant entre autre par l'utilisation de ces deux TBDTs. La spécificité des deux récepteurs, XytA et XytB, vis à vis d'un substrat est encore méconnue et pourrait expliquer la différence de phénotype des deux mutants lors de la transmission à la semence de *X. campestris* pv. *campestris*. Une différence dans la composition de la paroi végétale entre la hampe florale, comportant principalement des parois secondaires, et les siliques beaucoup moins lignifiées et composées de parois primaires,

pourrait être également à l'origine de ce phénotype. En effet, les parois primaires des Dicotylédones possèdent en plus faible proportion des xylanes comparativement aux parois secondaires (Raven *et al.*, 2000). Ces données structurales peuvent être la clé de la compréhension de l'écologie de *X. campestris* pv. *campestris* au sein d'*A. thaliana* lors de la transmission à la graine par voie vasculaire. Dans cette même optique, il serait intéressant d'explorer la diversité des TBDTs de cette bactérie (Blanvillain *et al.*, 2007) en phase de transmission à la semence.

• **La perception et la transduction du signal de stress**

Dans le cas du pathosystème fongique, l'implication des systèmes de transduction du signal à deux composantes a été ciblée afin de déterminer s'ils pouvaient intervenir spécifiquement lors de la transmission d'*A. brassicicola* aux graines d'*A. thaliana*. La protéine histidine kinase AbNIK1, précédemment étudiée au laboratoire IRHS-Fungisem, est un osmosenseur impliqué dans la voie de l'osmorégulation. La capacité de transmission aux graines de ce mutant déficient dans la production de cette protéine (Dongo *et al.*, 2009) a été quantifiée par l'intermédiaire du pathosystème modèle mis en place. Cette souche est altérée dans sa capacité à se transmettre aux graines d'*A. thaliana* alors que son agressivité est inchangée en phase végétative. Ce résultat est en accord avec le phénotype osmosensible de cette souche (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2008). De plus, ce même phénotype a été observé en culture porte-graines en plein champ, où des mutants spontanés de terrain apparaissaient également altérés dans leur capacité à se transmettre aux graines de radis (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2008). Ces résultats semblent indiquer que l'adaptation à l'environnement sec régnant autour de la graine est indispensable à la colonisation de ces organes par *A. brassicicola*.

Nous avons émis l'hypothèse que des protéines impliquées dans la perception et la transduction du signal constituant les systèmes à deux composantes bactériens puissent intervenir dans la mise en place d'un programme génétique lors de la survie de *X. campestris* pv. *campestris* sur les graines d'*A. thaliana*. Pour cela, le phénotype de mutants de délétion a été étudié dans diverses conditions de stress induisant potentiellement un stress hydrique et osmotique. Une étude menée par Qian et collaborateurs (2008) nous a permis de choisir des gènes candidats dont la mutation pouvait potentiellement avoir un impact sur la capacité des souches à survivre sur des graines d'*A. thaliana*. Les mutants *Xcc*Δ0824, *Xcc*Δ1049, *Xcc*Δ1187,

*Xcc*Δ2053, *Xcc*Δ2152, *Xcc*Δ3435 ont ainsi été construits. L'analyse de leur capacité à survivre sur des microcosmes a révélé que les souches *Xcc*Δ0824, *Xcc*Δ2053, *Xcc*Δ2152, *Xcc*Δ3435 sont affectées dans leur survie *in vitro* à 25°C. Les systèmes à deux composants associés pourraient donc constituer de bons candidats dans un contexte de recherche de protéines transduisant le signal de stress hydrique et osmotique lors de la survie de *X. campestris* pv. *campestris* sur la graine.

Une seconde approche a permis d'étudier le(s) rôle(s) des deux facteurs σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* lors de la transmission à la semence par voie vasculaire et de la survie de la bactérie sur les graines. Pour cela, la capacité de transmission de deux simples mutants (*Xcc*Δ1935 et *Xcc*Δ2802) et d'un double mutant *Xcc*Δ1935Δ2802 aux graines d'*A. thaliana* a été évaluée. La fréquence de transmission des deux simples mutants aux graines d'*A. thaliana* n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage. En revanche, la fréquence de transmission du double mutant est significativement supérieure à celle de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*. Cette augmentation de fréquence transmission aux graines de cette souche semble indiquer que les deux facteurs σ^{54} pourraient réguler l'expression de gènes impliqués dans la modulation de la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* et plus précisément, dans la colonisation du système vasculaire de la plante hôte. Un des nombreux mécanismes impliqués dans cette colonisation de ces tissus est la formation de biofilms. La nécessité de ces structures dans le pouvoir pathogène de nombreuses bactéries a été démontrée à plusieurs reprises et dans de nombreux pathosystèmes. Jacques et collaborateurs (2005) ont démontré la nécessité des biofilms pour la colonisation épiphyte et asymptomatique des feuilles de haricot par *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Un rôle de ces structures dans la protection contre les stress et dans la constitution d'un réservoir d'inoculum leur a été attribué. Dans le même pathosystème, l'implication d'adhésines nécessaires à l'élaboration des biofilms a été démontrée lors de la colonisation de la phyllosphère et la transmission à la semence par voie vasculaire (Darsonval *et al.*, 2009). Une adhésine, YapH, semble impliquer négativement dans la transmission à la semence dans le sens où le mutant correspondant se transmet de manière plus efficace que la souche sauvage. *Xylella fastidiosa* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* produisent une matrice d'exopolysaccharide et s'agrègent en biofilms et obstruent parfois respectivement les tissus conducteurs de la vigne et de la tomate (Roper *et al.*, 2007 ; Chalupowicz *et al.*, 2012). De plus, l'implication des facteurs σ^{54} dans la régulation de la formation de ces structures tridimensionnelles a déjà été démontrée chez *Burkholderia cenocepacia*, *Vibrio fischeri* et *Xylella fastidiosa* (Saldias *et al.*, 2008; Wolfe *et al.*, 2004; Silva Neto *et al.*, 2008). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les facteurs σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* puissent

intervenir dans la régulation de gènes impliqués dans la biosynthèse de structures adhésives telles que les adhésines fibrillaires (pilus de type IV) et non fibrillaires lors de la transmission de la bactérie à la graine d'*A. thaliana*. Dans la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris*, ces deux protéines pourraient à la fois induire l'expression des gènes codant des protéines nécessaires à l'adhésion dans les vaisseaux (telles que les adhésines non fibrillaires comme YapH) et également à la mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm (telles que les adhésines fibrillaires). Dans une souche doublement mutée au niveau des facteurs σ^{54} , l'expression de ces gènes codant ces structures adhésives n'étant plus induite, nous posons l'hypothèse que cela pourrait conduire à l'absence de formation d'agrégats bactériens dans le système vasculaire d'*A. thaliana*. Les cellules de *X. campestris* pv. *campestris* du double mutant seraient alors dans un état planctonique dans le système vasculaire. Ainsi, ceci pourrait expliquer l'augmentation de fréquence de transmission de cette souche aux graines d'*A. thaliana* par rapport à la souche sauvage. L'inactivation ou l'absence de régulation de gènes codant des adhésines entraîne parfois l'apparition de souches plus agressives. Ceci a déjà été observé dans des mutants d'hémagglutinines *hxfA* et *hxfB* de *Xylella fastidiosa* et *yapH* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Guilhabert and Kirkpatrick, 2009; Darsonval *et al.*, 2009). L'expression de certaines structures adhésives (XadA, FhaC et YapH) semblent réprimées dans un double mutant σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris*, dans un milieu MME, ce qui se traduit par une absence de formation d'agrégats bactériens en microscopie confocale à balayage laser pour cette souche. L'expression de ces gènes ne semble pas affectée, par rapport à la souche sauvage, dans un milieu plus riche tel que le MOKA dans l'ensemble des souches. En revanche, bien que le mutant *XccA1935* et le double mutant *XccA1935A2802* forme des agrégats bactériens identiques à ceux de la souche sauvage *in vitro*, le simple mutant *XccA2802* ne forme pas d'agrégats compacts. Ceci pourrait laisser supposer que d'autres mécanismes moléculaires tels que la synthèse d'exopolysaccharides, nécessaires à l'élaboration d'un biofilm, soit affectée dans cette souche. La régulation de tels mécanismes par les facteurs σ^{54} a été récemment mise en avant dans une étude globale menée dans différents genres bactériens visant à identifier les processus régulés par ce type de protéines (Francke *et al.*, 2011). Les analyses par RT-PCR quantitative ont également permis de révéler que la régulation et la biosynthèse du flagelle sont réprimées de manière significative dans le mutant *XccA1935* et le double mutant *XccA1935A2802*. Ces observations sont corrélées avec une étude, préalablement réalisée chez *X. campestris* pv. *campestris*, qui montre que le facteur σ^{54} Xcc1935 régule l'expression de la biosynthèse du système flagellaire (Yang *et al.*, 2009). Ces données d'expression confirment les expériences de mobilité par swimming effectuées sur un milieu à

0,2% d'agar qui indiquent que ces deux souches sont immobiles par rapport à la souche sauvage. De plus, sur un milieu semi-liquide (0,7%), nous n'avons pas observé pour ces deux souches de phénomènes de swarming, mobilité faisant également intervenir le flagelle. Ces données *in vitro* peuvent être associées aux données de survie *in planta* sur *A. thaliana*. Le mutant *XccΔ2802* est capable de croître *in planta* mais est incapable s'internaliser ou de former des biofilms qui pourraient le protéger de la désinfection de surface au chloroforme. Le mutant *XccΔ1935* qui est immobile n'est pas capable de se mouvoir pour pénétrer rapidement dans la feuille. En revanche, il semble rapidement mettre en place des mécanismes de protection, tels que les biofilms, qui lui permettent de survivre dans la phyllosphère, structure indispensable à la survie *in planta* (Jacques *et al.*, 2005). De manière surprenante, le double mutant présente un phénotype intermédiaire par rapport aux deux simples mutants. Bien qu'il présente des difficultés à se protéger les premiers jours suivant l'inoculation, cette souche semble mettre en place des mécanismes d'adaptation actifs en l'absence des deux facteurs σ^{54} . L'observation du comportement de ces différents mutants *in planta* (exprimant constitutivement la GFP) en microscopie confocale à balayage laser permettrait de confirmer les analyses de dynamique de population bactérienne et de mettre en évidence des probables différences de localisation dans le système vasculaire d'*A. thaliana*. Ainsi, le stade d'aggrégation dans le système vasculaire de souches mutées au niveau de différentes adhésines pourra être évalué en effectuant des coupes transversales de hampe florale.

L'étude de la survie des mutants σ^{54} de *X. campestris* pv. *campestris* sur des graines d'*A. thaliana* nous a permis de mieux appréhender le rôle de chacun des deux gènes dans la survie. Les mutants σ^{54} se conservent en effet de manière moins efficace que la souche sauvage, que ce soit sur des microcosmes et sur des graines d'*A. thaliana* à 4°C et 25°C. Nous avons émis l'hypothèse que ces protéines puissent être impliquées dans la mise en place d'une réponse adaptative de *X. campestris* pv. *campestris* face à des stress osmotiques et hydriques. L'implication de ce type de protéine dans la résistance à un stress osmotique a été déjà démontrée chez d'autres genres bactériens tels que *Listeria* (Okada *et al.*, 2008 ; Okada *et al.*, 2006). La forte diminution des populations bactériennes dès le premier jour suivant l'inoculation des souches *XccΔ1935Δ2802* et *XccΔ2802* lors de leur conservation sur des graines artificiellement contaminées laisse supposer que les facteurs σ^{54} interviennent également dans les étapes précoces d'adhésion, comme nous l'avons déjà évoqué pour la colonisation du xylème. Un gène *rpoN* fonctionnel est nécessaire pour la formation de biofilms chez *B. cenocepacia* K56-2 et *V. fischeri*. En effet, des mutants *rpoN* sont altérés dans leur capacité

à former des biofilms ou forment des biofilms différents structurellement de ceux de leur souche sauvage respective (Soledad Saldias *et al.*, 2008; Wolfe *et al.*, 2004). A l'inverse, le gène codant le σ^{54} chez *X. fastidiosa* semble contrôler négativement l'adhésion de cette souche à des surfaces abiotiques et l'agrégation de cellules à cellules (Silva Neto *et al.*, 2008). Ces phénotypes opposés peuvent être expliqués des différences de nombre et de nature des σ^{54} selon les espèces bactériennes. Une approche phylogénétique nous a permis d'analyser la répartition des homologues des deux gènes codant les σ^{54} de *X. campestris pv. campestris* tant sur un plan quantitatif que qualitatif chez d'autres bactéries phylogénétiquement proches ou sensiblement plus éloignées. Les objectifs étaient d'une part d'identifier le ou les facteurs σ^{54} dans différents genres bactériens et d'autre part, de tenter de mieux comprendre l'histoire évolutive de ce(s) gène(s). Des situations très différentes ont été mises en évidence entre certains genres bactériens. Ainsi, un seul gène codant un facteur σ^{54} a été identifié dans toutes les souches des genres *Pseudomonas* et *Salmonella* alors que deux gènes ont été identifiés chez *Ralstonia*, *Xylella*, *Pseudoxanthomonas* et *Stenotrophomonas*. Des données bibliographiques indiquent que le gène commun à la majorité des bactéries semble être l'homologue au gène *Xcc2802* (Yang *et al.*, 2009). D'après nos alignements et l'arbre obtenu en maximum de vraisemblance, il semble que les deux gènes codant les facteurs σ^{54} de *Ralstonia* soient issus d'une duplication indépendante de celle qui a donné naissance aux deux facteurs σ^{54} identifiés chez *Xanthomonas* et *Xylella*, par exemple. Il serait intéressant de poursuivre cette étude phylogénétique en réalisant de génomique évolutive pour identifier la nature des pressions de sélection s'exerçant sur les deux gènes au sein d'un même genre et entre les différents genres pour un même gène. Nous pouvons supposer que les pressions de sélection exercées diffèrent entre les genres et que cela soit dû principalement au mode de vie de la bactérie.

L'ensemble de ces données phénotypiques laisse supposer que les systèmes de transduction interviennent avec et/ou de manière indépendante avec les facteurs sigma dans la survie de *X. campestris pv. campestris* sur des graines d'une plante hôte. Des études supplémentaires restent néanmoins à conduire dans le cas des systèmes à deux composantes afin de définir le degré d'implication de chacun des systèmes dans la réponse à un stress donné. L'analyse phénotypique des mutants σ^{54} a permis de mieux comprendre le rôle de chacune de ces deux protéines. La protéine Xcc1935 semble en effet impliquée dans les phases précoces de l'adhésion nécessitant l'intervention du système flagellaire. Cela a pu être en partie confirmé par la mise en évidence d'une répression de l'expression plus importante des gènes *fleQ* et *fliE* chez le mutant *XccΔ1935*. Ainsi, cette protéine pourrait être impliquée dans les

phases initiales d'adhésion de *X. campestris* pv. *campestris* sur la graine nécessitant une mobilité flagellaire pour atteindre un environnement favorable auquel la bactérie puisse adhérer. Le deuxième facteur σ^{54} , codé par le gène *Xcc2802*, semble quant à lui impliqué dans les différentes phases de la formation tridimensionnelle du biofilm. Cela s'illustre par l'incapacité à adhérer et s'agréger *in vitro* pour les souches *XccΔ2802* et *XccΔ1935Δ2802*. Sur des graines d'*A. thaliana*, nous émettons l'hypothèse que ces mêmes souches sont incapables, d'une part, d'adhérer à la surface de la graine et, d'autre part, de résister aux stress hydriques régnant sur et dans la graine. En effet, l'incapacité de ces souches à former des biofilms lorsque l'environnement nutritionnel est pauvre, à l'image du milieu MME-glutamate qui mime la composition chimique de l'apoplaste des cellules végétales, pourrait limiter la capacité des souches à résister aux différents stress en raison de l'absence de la matrice d'exopolysaccharides. Des études complémentaires de transcriptomique sur les différents mutants σ^{54} pourraient permettre d'avoir une vision globale du régulon de chacun des deux σ^{54} et ainsi identifier de nouveaux mécanismes moléculaires intervenant potentiellement dans la survie de *X. campestris* pv. *campestris* sur les graines d'*A. thaliana*.

✓ ***Mise en place d'une réponse adaptative : cas des protéines intrinsèquement déstructurées***

Suite à la perception et à la transduction d'un stimulus de stress provenant de l'environnement, les microorganismes doivent mettre en place une réponse adaptative leur permettant de mieux résister aux stress. Nous avons émis l'hypothèse que les protéines intrinsèquement déstructurées puissent intervenir dans la capacité des microorganismes à se transmettre aux semences et à leur survie sur les graines. Ce sont des protéines relativement méconnues chez les microorganismes que nous avons choisi d'aborder en étudiant une catégorie spécifique que sont les protéines de type LEA (Late Embryogenesis Abundant), découvertes initialement dans le règne végétal.

L'étude des protéines LEA d'*A. brassicicola* a débuté par un inventaire des déhydrines (protéines appartenant à la classe 2 des protéines LEA) au sein du protéome de ce champignon. Ainsi, trois gènes codant des déhydrines putatives ont été identifiées dans le génome d'*A. brassicicola*. Une analyse bioinformatique menée avec différents logiciels prédictifs nous a permis de conforter notre hypothèse d'appartenance de ces trois protéines d'une part,

à la famille des déhydrines et d'autre part, à la classe particulière des déhydrines fongiques. Ces analyses bioinformatiques ont permis, entre autre, de mettre en évidence un mécanisme d'épissage alternatif du gène *abdhn2*. La signification moléculaire de cet épissage n'a pas pu être mis en évidence dans ce travail de thèse. Ceci nécessitera d'une part de quantifier précisément les deux formes d'ARNm dans différentes conditions de stress et d'autre part d'étudier plus finement le rôle respectif de chacune des deux protéines produites.

L'expression des trois gènes a été suivie dans différentes conditions de stress connues pour être inductrices de l'expression des déhydrines, telles que le stress osmotique, oxydatif, thermique (froid) et salin. Ceci nous a permis d'observer que les trois gènes sont surexprimés à des degrés variables. L'induction par ce type de stress a également été observée chez d'autres champignons tels que *Tuber borchii* et *Aspergillus fumigatus* (Abba *et al.*, 2006 ; Wong Sak Hoi *et al.*, 2011 ; Wong Sak Hoi *et al.*, 2012). Ces trois gènes sont également surexprimés en présence de molécules de défense de la plante hôte telles que les phytoanticipines et les phytoalexines. Une approche fonctionnelle a été entreprise sous deux angles différents : la construction de mutants nuls d'*A. brassicicola* par mutagenèse dirigée et l'expression hétérologue des déhydrines d'*A. brassicicola* chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Le phénotypage des mutants d'*A. brassicicola* en néphélométrie nous a permis de mettre en évidence une sensibilité accrue de ces souches principalement face à un stress oxydatif et thermique (application de températures froides) et dans une moindre mesure aux phytoalexines. Dans l'optique de mieux comprendre le(s) rôle(s) des déhydrines d'*A. brassicicola* lors d'un stress, nous avons voulu déterminer la localisation subcellulaire de ces protéines en fusionnant les déhydrines à la GFP dans leur partie C-terminale. Cela nous a permis de mettre en évidence une localisation peroxysomale d'AbDHN1 et AbDHN2. Le même type de localisation a déjà été observé pour les protéines DprA et DprB d'*A. fumigatus*. Aucun signal d'adressage à destination des peroxysomes, de type PTS1 (Peroxisome Targeting Signal) et PTS2, n'a été identifié dans les séquences des déhydrines d'*A. brassicicola*. Wong Sak Hoi et collaborateurs (2011) ont émis l'hypothèse que cette absence de signal pourrait être en faveur d'une localisation externe en périphérie des peroxysomes. Une telle stratégie pourrait traduire un rôle de protéine chaperonne des déhydrines impliquées dans l'import de protéines vers le peroxysome, probablement induit en réponse à un stress abiotique. En effet, l'implication de molécules chaperonnes dans l'import de protéines vers le peroxysome a déjà été démontré (Legakis et Terlecky, 2001). Parmi les fonctions connues des peroxysomes, figure la dégradation du peroxyde d'hydrogène par la catalase permettant la détoxification cellulaire (Freitag *et al.*, 2012). La localisation des déhydrines dans ou en périphérie des peroxysomes

permet d'émettre comme hypothèse un probable rôle des déhydrines AbDHN1 et AbDHN2 dans la protection contre le stress oxydatif. En revanche, la localisation d'AbDHN3 reste encore indéfinie, principalement en raison de son faible niveau d'expression constitutif. Des études complémentaires pourront être menées afin de définir s'il existe une localisation préférentielle des déhydrines d'*A. brassicicola* entre les différents organes (hyphes, tubes germinatifs, spores dormants, conidiophores, conidies en formation ou germantes).

Les mutants ont également été phénotypés en phase de transmission à la graine d'*A. thaliana*. Nous avons mis en évidence que l'ensemble des mutants se transmet significativement moins efficacement aux graines d'*A. thaliana* par rapport à la souche sauvage. Au sein de ces souches, deux catégories peuvent être mises en évidence : le double mutant *abΔdhn1Δdhn2* se transmet significativement moins bien que les simples mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2* et *abΔdhn3*. Nous avons également débuté l'étude de la capacité de survie des conidies des différentes souches à l'état sec. Les premiers résultats semblent indiquer que les conidies des simples mutants *abΔdhn1*, *abΔdhn2* et du double mutant *abΔdhn1Δdhn2* présentent une capacité inférieure à se conserver *in vitro* dès le premier jour suivant le début de l'expérimentation alors que le simple mutant *abΔdhn3* présente des pourcentages de viabilité identiques à ceux de la souche sauvage. Ces résultats semblent indiquer que les déhydrines d'*A. brassicicola* pourraient être impliquées à différents niveaux du cycle de vie du champignon (colonisation végétative, transmission à la semence, survie sur les graines et les résidus de culture).

L'expression hétérologue des déhydrines d'*A. brassicicola* chez *S. cerevisiae* a permis de poursuivre l'étude du rôle de ces protéines dans un « outil » simplifié. Les tests de phénotypage réalisés en présence de différents stress ne nous ont pas permis de mettre en évidence des résultats significatifs mais uniquement des tendances qui nécessitent d'être confirmées. Ceci passe par le perfectionnement de la méthodologie de phénotypage des souches, nécessaire pour diminuer les effets de variabilité entre les répétitions biologiques. Des approches complémentaires *in vitro* utilisant des déhydrines d'*A. brassicicola* recombinantes purifiées pourraient permettre de tester un possible rôle protecteur vis-à-vis de membranes et d'enzymes conféré par ces protéines, tel que le rôle cryoprotecteur de la déhydrine de pêcher PCA60 vis à vis de la lactate déshydrogénase (Wisniewski *et al.*, 1999). Une stratégie de surexpression de la déhydrine AbDHN1 dans *A. brassicicola* lui-même a été engagée. Le phénotype de cette souche sera comparé à celui d'un mutant nul et d'une souche sauvage pour tenter de mettre en évidence un rôle de protection de cette protéine en présence de phytoalexines.

Très peu de protéines de type LEA ont à l'heure actuelle été décrites chez les bactéries et aucune chez les bactéries phytopathogènes. Les caractéristiques physico-chimiques et structurales de la harpine de *X. campestris* pv. *campestris* (Hpa1) relativement semblables à celles des déhydrines nous ont conduit à émettre l'hypothèse que cette protéine pourrait avoir un rôle dans la protection de la bactérie lors des premières phases suivant la transmission à la semence et plus tardivement lors de la survie sur la graine. De plus, des études récentes tendent à montrer que les harpines bactériennes confèrent une tolérance accrue au riz surexprimant ce type de protéine face à un stress hydrique. Ces plants de riz transgéniques présentent une augmentation de leur teneur en proline et sucres solubles, et également une tolérance accrue face au stress oxydatif, grâce à une capacité supérieure à piéger les FAO (Zhang *et al.*, 2011). Une analyse bioinformatique de la séquence protéique de Hpa1 a permis de conforter l'hypothèse que cette protéine pourrait être assimilée à une « déhydrin-like ». Une approche fonctionnelle par la construction d'un mutant nul par mutagenèse dirigée et son phénotypage nous a permis de mettre en évidence une diminution de la capacité de ce mutant à se conserver *in vitro* sur des microcosmes. Ces expériences doivent être complétées en évaluant la capacité de ce mutant à se transmettre aux graines et à survivre sur ces dernières. De plus, des approches semblables à celles envisagées dans le cas des déhydrines fongiques (suivi de l'expression en conditions de stress, purification de la protéine,...) pourront être également entreprises. Enfin, il serait judicieux de localiser cette protéine, par une fusion-GFP, au cours de l'interaction de *X. campestris* pv. *campestris* avec sa plante hôte et particulièrement lors de la transmission à la graine et de la survie de la bactérie sur ces dernières.

Ces deux pathosystèmes mis au point nous permettent de mettre en évidence non seulement des différences de phénotypes entre différentes souches mais également d'identifier des mécanismes moléculaires spécifiques à la transmission à la semence, signifiant que les mécanismes moléculaires sous-jacents sont primordiaux pour cette phase du cycle de vie. En effet, le mutant *abAnik1* d'*A. brassicicola* présente une diminution significative de la capacité à se transmettre aux graines d'*A. thaliana* alors que son pouvoir pathogène n'est pas affecté au stade végétatif sur cette même plante. C'est également le cas du mutant *XccΔ2828* de *X. campestris* pv. *campestris* qui présente une faible fréquence de transmission aux graines d'*A. thaliana* par voie vasculaire et une agressivité identique à celle de la souche sauvage de *X. campestris* pv. *campestris* au stade végétatif (résultats non montrés). Cependant, nous avons également mis en évidence

que des mécanismes moléculaires peuvent à la fois intervenir aussi bien au stade végétatif qu'au stade reproducteur à l'instar des mutants *Δdhm* d'*A. brassicicola* et de mutants affectés dans la voie de biosynthèse du mannitol d'*A. brassicicola* (Calmes B., communication personnelle).

- **La transmission à et par les graines : approche intégrative**

L'étude simultanée de ces deux pathosystèmes tant lors de la transmission à la semence que de la survie sur les graines nous a permis de mieux comprendre la nature de quelques mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces phases. Nous avons pu déterminer que la transmission à la semence est spécifique à chaque agent pathogène tant au niveau de la voie de contamination que des mécanismes moléculaires engagés. En effet, nous avons mis en évidence que *X. campestris* pv. *campestris* se transmet préférentiellement par voie vasculaire aux graines d'*A. thaliana* alors qu'*A. brassicicola* effectue cette phase du cycle en contaminant les fruits par simple contact. De plus, ce sont deux microorganismes aux stratégies nutritionnelles opposées. Alors que *X. campestris* pv. *campestris* tire parti des nutriments présents dans son environnement proche grâce notamment à l'utilisation de TBDTs de manière non-invasive, *A. brassicicola* endommage et tue les cellules végétales par un arsenal d'enzymes lytiques et de toxines dans le but d'utiliser les produits de dégradation comme source de nutrition. Ainsi, il semble évident que les mécanismes moléculaires engagés chez *X. campestris* pv. *campestris* concerneront plus la versatilité nutritionnelle, suite à la multiplicité de microenvironnements rencontrés, et la formation de biofilms pour coloniser efficacement le système vasculaire. Il serait intéressant de déterminer si un dialogue moléculaire, lié au système de sécrétion de type III, est mis en place avec la plante hôte comme cela a été démontré dans le cas du pathosystème *X. axonopodis* pv. *phaseoli* / haricot (Darsonval *et al.*, 2008). Dans le cas du pathosystème fongique, bien qu'*A. brassicicola* soit un pathogène nécrotrophe, le champignon colonise la silique et pénètre dans celle-ci pour pouvoir atteindre les graines sans occasionner de symptômes destructifs majeurs sur les valves. Il est donc très rapidement en contact direct avec des graines en cours de maturation et doit mettre en place des mécanismes de résistance face aux stress hydriques.

La survie sur des graines dites orthodoxes semble quant à elle engager des réponses plus universelles chez les microorganismes phytopathogènes. En effet, l'une des principales contraintes à surmonter lors de cette étape pour les pathogènes est la faible teneur en eau des tissus sur et/ou dans lesquels ils doivent survivre. Ainsi, les mécanismes moléculaires engagés lors de cette phase auront pour principal objectif d'assurer une protection efficace et durable face à ces stress. Bien que des mécanismes spécifiques à chaque organisme tels que la formation de biofilms chez *X. campestris* pv. *campestris* puisse intervenir, nous avons pu constater que des mécanismes plus universels tel que les systèmes de transduction du signal à deux composantes et les protéines de type LEA peuvent également jouer un rôle dans la mise en place d'une réponse adaptative.

Ces différents mécanismes peuvent constituer des pistes de réflexion sur lesquelles de nouvelles méthodes de lutte à caractère durable peuvent être mises en place sur des cultures d'intérêt agronomique majeur. Pour cela, l'implication de ces mêmes mécanismes chez des plantes cultivées devrait dans un premier temps être validée. Sur la base des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la survie des pathogènes sur les graines et mis en lumière dans cette étude, de nouvelles méthodes de traitement des graines post-récolte peuvent également être imaginées. L'importance de la survie de *X. campestris* pv. *campestris* à l'état de biofilms sur les graines semble non négligeable. Ainsi, des molécules agissant en réels tensioactifs pourraient permettre de dissocier ces structures de protection présentes à la surface des graines. Des molécules surfactantes, telles que le Spolapon AOS 146 et Novanic 0633, souvent utilisées en bio remédiation (Schreiberova *et al.*, 2012), ont été testées pour évaluer leur capacité à structurer les biofilms. Ils agissent principalement au niveau de l'adhésion des biofilms à leur surface en agissant sur les forces de tension régissant l'adhésion. D'autres traitements chimiques ont déjà été testés sur la dissociation des biofilms tels que agents chélatants et surfactants (Chen et Stewart, 2000). L'enjeu principal de ce type de méthode serait de dégrader les biofilms bactériens sans endommager la viabilité de la graine.

Ce travail de thèse s'inscrit également dans une approche plus globale d'épidémiologie. La transmission à la semence et les facteurs influençant son occurrence sont relativement complexes à étudier chez les plantes cultivées. Nous avons mis en évidence que la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* à la graine d'*A. thaliana*, plante modèle et adventice, semble intervenir uniquement par voie vasculaire. Le même type d'expérimentation devra être mené sur des plantes cultivées telles que le chou. En effet, une étude récente menée par Van der Wolf et vander Zouwen, (2010) rapporte un événement de transmission de *X. campestris* pv.

campestris aux graines de chou-fleur, en tunnels, par l'intermédiaire de mouches *Calliphoria vomitoria*. De plus, nous avons remarqué que la transmission à la graine n'a pas lieu chez toutes les plantes inoculées. Cela est très intéressant en terme d'épidémiologie mais très difficile dans la gestion des épidémies que cela peut occasionner. En effet, ce sont souvent des lots de semences faiblement contaminées qui sont à l'origine d'importantes épidémies (Cappelli, 2007). De plus, les faibles fréquences de transmission associées à des tailles de population bactériennes relativement faibles sont souvent associées à une phase asymptomatique. Ceci complique d'autant plus la mise en place de méthodes de lutte. Les graines faiblement contaminées et sans symptôme apparent passeront les mailles de l'étape de tri. De plus, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de détection moléculaire assez puissante pour détecter de faibles taux de contamination dans les graines. Les cellules bactériennes peuvent également se trouver dans un état physiologique particulier nommé état VNC (Viable Non Cultivable). Les bactéries sont alors présentes sur les graines avec un métabolisme ralenti lui permettant de résister au mieux aux stress et de reprendre une croissance en présence de conditions plus favorables. En cas d'attaques sévères, les graines peuvent présenter des symptômes et des déformations morphologiques. Elles sont alors soit triées, soit analysées par des méthodologies de détection moléculaire qui permettront d'écarter le lot de graines du circuit commercial. Dans des pays où la filière est moins organisée qu'en France, ces lots ne sont pas déclassés et les graines fortement contaminées constituent une source d'inoculum très importante même si elles ne sont pas capables de germer.

Dans le cas d'*A. brassicicola*, la transmission à la semence se déroule toujours en conditions symptomatiques. En revanche, de la même manière que pour les pathogènes bactériens, des graines faiblement contaminées et sans symptôme apparent, peuvent être également à l'origine d'épidémies au même titre que des graines fortement contaminées.

***A**nnexe*



METHODOLOGY

Open Access

The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi

Stephanie Pochon^{1,2,3}, Emmanuel Terrasson^{1,2,3}, Thomas Guillemette^{1,2,3}, Beatrice Iacomi-Vasilescu⁴,
Sonia Georgeault⁵, Marjorie Juchaux⁶, Romain Berruyer^{1,2,3}, Isabelle Debeaujon⁷, Philippe Simoneau^{1,2,3*} and
Claire Campion^{1,2,3}

Abstract

Background: Seed transmission constitutes a major component of the parasitic cycle for several fungal pathogens. However, very little is known concerning fungal or plant genetic factors that impact seed transmission and mechanisms underlying this key biological trait have yet to be clarified. Such lack of available data could be probably explained by the absence of suitable model pathosystem to study plant-fungus interactions during the plant reproductive phase.

Results: Here we report on setting up a new pathosystem that could facilitate the study of fungal seed transmission. Reproductive organs of *Arabidopsis thaliana* were inoculated with *Alternaria brassicicola* conidia. Parameters (floral vs fruit route, seed collection date, plant and silique developmental stages) that could influence the seed transmission efficiency were tested to define optimal seed infection conditions. Microscopic observations revealed that the fungus penetrates siliques through cellular junctions, replum and stomata, and into seed coats either directly or through cracks. The ability of the osmosensitive fungal mutant *nik1Δ3* to transmit to *A. thaliana* seeds was analyzed. A significant decrease in seed transmission rate was observed compared to the wild-type parental strain, confirming that a functional osmoregulation pathway is required for efficient seed transmission of the fungus. Similarly, to test the role of flavonoids in seed coat protection against pathogens, a *transparent testa Arabidopsis* mutant (*tt4-1*) not producing any flavonoid was used as host plant. Unexpectedly, *tt4-1* seeds were infected to a significantly lower extent than wild-type seeds, possibly due to over-accumulation of other antimicrobial metabolites.

Conclusions: The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem, that have been widely used to study plant-pathogen interactions during the vegetative phase, also proved to constitute a suitable model pathosystem for detailed analysis of plant-pathogen interactions during the reproductive phase. We demonstrated that it provides an excellent system for investigating the impact of different fungal or plant mutations on the seed transmission process and therefore paves the way towards future high-throughput screening of both *Arabidopsis* and fungal mutant.

Keywords: Seed transmission, *Alternaria brassicicola*, *Arabidopsis thaliana*, Seed colonization, *Transparent testa*, Osmotic stress

* Correspondence: simoneau@univ-angers.fr

¹Université d'Angers, UMR 1345 IRHS, SFR QUASAV, 2 Bd Lavoisier, Angers cedex, F-49045, France

²INRA, UMR 1345 IRHS, 16 Bd Lavoisier, Angers cedex, F-49045, France

Full list of author information is available at the end of the article

33 Background

34 Transmission from infected to healthy hosts is a key
35 component of pathogen fitness, as pathogens strongly
36 depend on this process for their long-term survival [1].
37 For several plant-parasite interactions, transmission is
38 strictly “horizontal” with a pathogen spreading between
39 related and unrelated individuals through mechanisms
40 ranging from direct contact to wind-dispersal. In other
41 systems, transmission may also be “vertical”, that is to
42 say the pathogen infects the host’s offspring [2]. Al-
43 though many pathogens spread by a combination of
44 horizontal and vertical transmission, these two transmis-
45 sion modes require specific adaptations of the pathogen
46 that can be mutually exclusive, resulting in a trade-off
47 between horizontal and vertical transmission [1]. While
48 an inverse relation between aggressiveness and vertical
49 transmission has been shown for some pathogens [3],
50 the ability to transmit by seed may have significant
51 advantages for pathogens, such as long-term survival,
52 maximum opportunity for progeny infection and long
53 distance dissemination [4,5].

54 From an epidemiological standpoint, seed transmission
55 represents a possible mode of primary infection from
56 which dangerous polycyclic microorganisms can start
57 epidemic attacks. The early presence of a small quantity
58 of infected plants (i.e. 0.05% of a crop) is sometimes suf-
59 ficient for the development of destructive attacks [6].
60 The use of seeds infected with pathogenic fungi thus
61 represents a major economic threat and prevention of
62 plant infection by seedborne pathogens in seed crops is
63 essential. Although the chain of events leading to seed
64 transfer through the plant has been extensively docu-
65 mented [4], almost nothing is currently known concern-
66 ing the factors that mediate seed transmission by fungal
67 pathogens. Iacomi-Vasilescu et al. [7] recently reported
68 that *Alternaria brassicicola* strains deficient in a group
69 III osmosensor histidine kinase were highly jeopardized
70 in their ability to infect radish seeds. This was inter-
71 preted as a consequence of their failure to overcome se-
72 vere osmotic stress conditions consecutive to the gradual
73 decrease in the water potential in maturing seeds. Be-
74 sides this pioneer study, no other data are available for
75 fungal pathogenic factors that impact seed transmission.
76 This could be probably explained by the difficulty to
77 carry out such experiments under field conditions, par-
78 ticularly due to the reduced number of reproduction
79 cycles per year and the lack of available model pathosys-
80 tem to study plant-fungus interactions during the plant
81 reproductive phase.

82 *Arabidopsis thaliana* has become an important model
83 host for studying plant-pathogen interactions during the
84 vegetative phase due to the development of numerous gen-
85 etic and genomic tools. However, to our knowledge, this
86 plant species has never been used as host to explore plant-

pathogen interactions during the reproductive phase al- 87
though it has several attributes such as small size and rapid 88
life cycle, which make it well suited for this kind of study 89
under carefully controlled environmental conditions. 90
Among the numerous *Arabidopsis* – pathogen systems that 91
have been developed to investigate the molecular mechan- 92
isms of virulence and plant resistance [8], the interaction of 93
Arabidopsis with *Alternaria brassicicola* has been exten- 94
sively used as a model for diseases caused by fungal necro- 95
trophs [9]. *Alternaria brassicicola* causes dark spot disease, 96
one of the most common and destructive fungal diseases of 97
Brassicaceae worldwide. This fungus can be seedborne via 98
mycelium within the seed and is the dominating *Alternaria* 99
spp. in *Brassica* seed crops and may be responsible for im- 100
portant yield losses [10-13]. In such crops, a vertical disease 101
gradient can be observed on fruits, with the lowest siliques 102
becoming infected first and infection spreading slowly up- 103
wards [14]. Concerning seeds, hilum was described to be 104
the more contaminated seed area, as a consequence of my- 105
celial growth through the suture of siliques and the funicle 106
[15,16]. To a lesser extent, *A. brassicicola* can infect seeds 107
in an internal manner. In this instance, the pathogen is 108
mainly found in seed coats. Both external and internal in- 109
oculum can survive for several years but the longevity of in- 110
ternal inoculum is higher than that of external inoculum 111
[10]. 112

The main objective of the present study was to de- 113
velop, in controlled conditions, a model pathosystem 114
suitable for detailed analysis of the molecular mechan- 115
isms underlying the seed transmission stage in both the 116
host plant and the fungal pathogen. Reproductive organs 117
of *A. thaliana* Landsberg *erecta* (Ler), an ecotype suscep- 118
tible to *A. brassicicola*, were thus inoculated with fungal 119
conidia, and transmission levels of this pathogen to seeds 120
were evaluated. The influence of different parameters on 121
the seed transmission “probability” was established in 122
order to design a robust and easy to handle protocol. 123
This model pathosystem was then used to confirm that 124
an *A. brassicicola* strain deficient in the osmosensing his- 125
tidine kinase AbNIK1 was impaired in its capacity to effi- 126
ciently colonize seeds. In addition, transmission of *A.* 127
brassicicola to seeds of an *A. thaliana* *transparent testa* 128
4 (*tt4-1*) mutant deficient with respect to flavonoid syn- 129
thesis was also analyzed. 130

131 Results

132 Seed transmission route and influence of the seed 133 collection date on seed transmission

As seed infection through the vascular supply has been 134
described for wilt pathogens [17], only floral and fruit 135
routes of seed infection were explored with *Alternaria* 136
brassicicola. The floral infection route for seed transmis- 137
sion was studied in plants at the bolting stage by inocu- 138
lating floral buds with an *A. brassicicola* (Abra43, WT) 139

140 conidial suspension adjusted to either 1×10^4 or 1×10^5
141 conidia mL^{-1} . For inoculations, 5 μL drops of an *A. bras-*
142 *siccicola* conidial suspension were deposited on intact
143 host tissue. Six days after inoculation, necrotic lesions
144 were observed on flower buds and 8 days later, flower
145 buds were covered with mycelium and conidia, irrespect-
146 ive of the inoculum charge. As a consequence, flower
147 formation was impeded (data not shown).

148 For examination of the fruit route for seed transmission,
149 plants with 10 siliques on the main flowering stem, were
150 inoculated by application of two distinct 2.5 μL drops of
151 an *A. brassicicola* (Abra43) conidial suspension adjusted to
152 1×10^5 conidia mL^{-1} on the outer surface of the 10 oldest
153 siliques (one drop at the base of silique and one in the
154 middle). Inoculations resulted in mycelium development,
155 conidia formation and the appearance of necrotic lesions
156 typical of black spot on siliques within a few days after in-
F1 157 inoculation (Figure 1a, 1b and 1c). Inoculated siliques were
158 collected 10 or 20 days after inoculation, and seeds were in-
159 dividually harvested. Seeds showed mycelium development
160 and conidia formation (Figure 1d). They were separately
161 plated on PDA medium, to estimate the seed contamination
162 level. Transmission of *A. brassicicola* to seeds was similar
163 (32% of contaminated seeds) at the two collection dates
F2 164 (Figure 2). Siliques and seeds were thus harvested 10 days
165 after inoculation for further experiments, since longer

incubation did not induce a higher contamination level. 166
Seeds harvested in control plants that were integrated to all 167
experiments, and whose siliques were treated with two 2.5 168
 μL drops of a 0.01% Tween 20 solution, never showed any 169
A. brassicicola development. 170

Influence of the plant and silique developmental stage on 171 seed transmission 172

The influence of the plant developmental stage on the 173
incidence of *A. brassicicola* on seeds was examined by 174
inoculating all siliques of plants with either 10 or 20 sili- 175
ques on the main flowering stem. For inoculations, two 176
distinct 2.5 μL drops of a conidial suspension adjusted to 177
 1×10^5 conidia mL^{-1} were applied. The results indicated 178
that the contamination level per plant was significantly 179
higher (35%) when siliques were inoculated at the 10-si- 180
lique stage rather than later at the 20-silique stage (8%) 181
(Figure 3). Further experiments were thus conducted by 182 F3
inoculating plants at the 10-silique stage. 183

The impact of the silique developmental stage on *A.* 184
brassicicola seed transmission was assessed through the 185
inoculation of 10 siliques numbered from 1 (the oldest si- 186
lique, at the base of the bolting stem) to 10 (the youngest 187
silique) (Figure 4a), and the seeds were identified accord- 188 F4
ing to their corresponding silique. The global probability 189
of seed infection by *A. brassicicola* was similar to previous 190

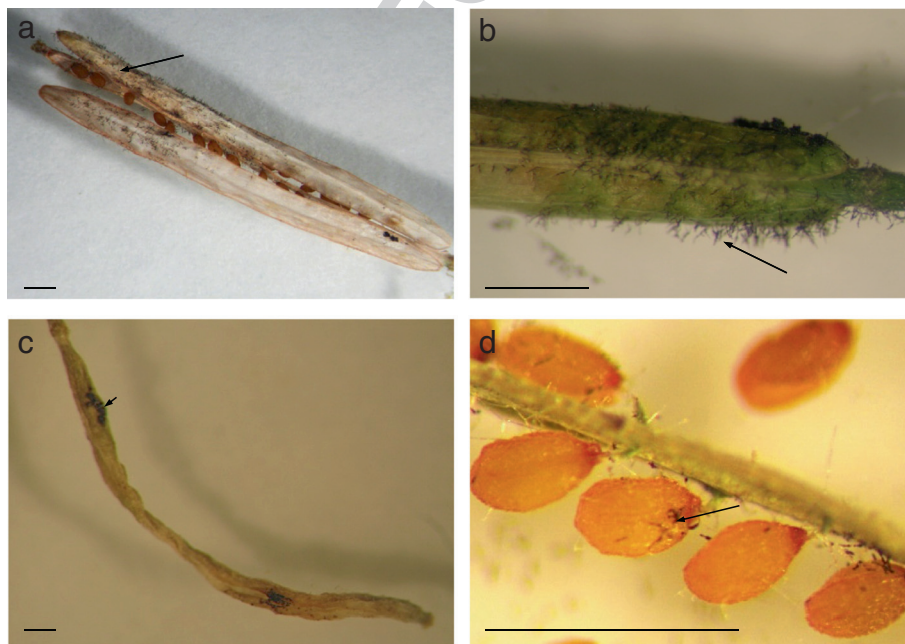


Figure 1 Mycelium development, conidia formation on siliques and seeds, and necrotic lesions on siliques 10 days after inoculation with *Alternaria brassicicola*. (a) and (b), mycelium development and conidia formation (arrows) on siliques. (c), necrotic lesions (arrowhead) on siliques. (d), mycelium development and conidia formation (arrow) on seeds. Bar = 1 mm.

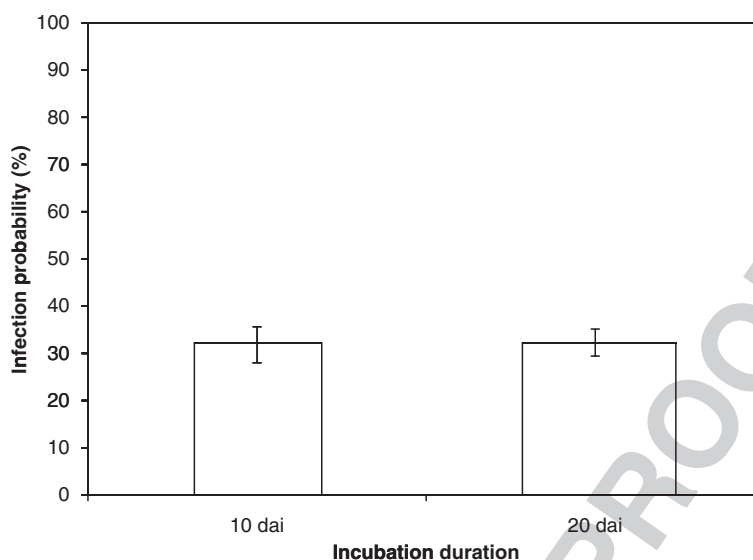


Figure 2 Influence of incubation duration on transmission capacity of *Alternaria brassicicola* (Abra43) to seeds of *Arabidopsis thaliana* plants (*Ler* ecotype). Harvesting was done 10 days and 20 days after inoculation (dai). Values represent means with IC₉₅.

191 results (32%, data not shown), but the seed infection prob- 220
192 ability differed depending on the siliques: 74% for seeds 221
193 from the oldest siliques at the base of the bolting stem (n° 222
194 1), only 7% for seeds from a younger siliques near the apical 223
195 meristem (n°10) (Figure 4b). The incidence on seeds was 224
196 thus significantly different according to the siliques devel- 225
197 opmental stage. As the *A. brassicicola* incidence on seeds 226
198 of the youngest siliques was very low, in further experi- 227
199 ments, evaluation of *A. brassicicola* seed transmission cap- 228
200 acity took only the results concerning the five oldest 229
201 siliques (n°1 to n°5) into account.

202 Microscopic assessment of seed and siliques colonization 203 by *A. brassicicola*

204 Siliques and seeds harvested 10 days after inoculation of 220
205 siliques with an *A. brassicicola* conidial suspension adjusted 221
206 to 1×10^5 conidia mL⁻¹ were assessed by scanning electron 222
207 microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy. 223
208 These studies focused on the histopathology of infected 224
209 seeds and siliques, while observing the extent and amount 225
210 of mycelium and conidia.

211 SEM observations of seeds provided evidence of *A. bras-* 220
212 *sicicola* mycelium superficial growth and conidia forma- 221
213 tion on seeds harvested 10 days after inoculation 222
F5 214 (Figure 5a and 5b). Penetration of hyphae into seed coat 223
215 tissues, directly (Figure 5c) or through cracks in the seed 224
216 coat, was observed by SEM. Penetration and fungal devel- 225
217 opment within the seed tissues were also revealed by stain- 226
218 ing hyphae with solophenyl flavin and observing the 227
219 tissues under a confocal laser scanning microscope 228

(Figure 5d). These findings indicated that the fungus ac- 220
tively colonized the seed coat and was not only a passive 221
contaminant of the seed surface. After fungal colonization, 222
infected seeds frequently showed alteration of the seed 223
coat appearance (Figure 5e) by comparison with seeds har- 224
vested on control plants (Figure 5f): infected seeds seemed 225
shrivelled as if embryo aborted early during development. 226

On the outer surface of siliques, mycelium was found 227
to be growing in many directions from germinated con- 228
idia in the inoculation zone (Figure 6a and 6b). Hyphae 229
penetrated into the fruit occasionally via stomata present 230
on the outer surface of siliques (Figure 6c) or, more often 231
directly, in particular at the cellular junctions (Figure 6d). 232
Stomata also allowed mycelium reemergence (Figure 6e). 233
Conidia formation was evident on the outer surface of 234
siliques (Figure 6f). Intense mycelium development and 235
conidia formation were also visible on the inner surface 236
of siliques (Figure 6g). Replum seemed to be a preferen- 237
tial zone for penetration into siliques (Figure 6h). The si- 238
liques results indicated that the fungal pathogen spread 239
into the seed from the fruit. 240

241 Influence of fungal and host genotypes on seed 242 transmission

In order to confirm that the above-described model patho- 243
system is a useful tool for analyzing the molecular factors 244
involved in the seed transmission process, the seed trans- 245
mission capacity of an osmosensitive fungal mutant *nik1Δ3* 246
[18] and its wild-type parental strain (Abra43) were assessed 247
on an *A. thaliana* *Ler* ecotype. This was performed as 248

F6

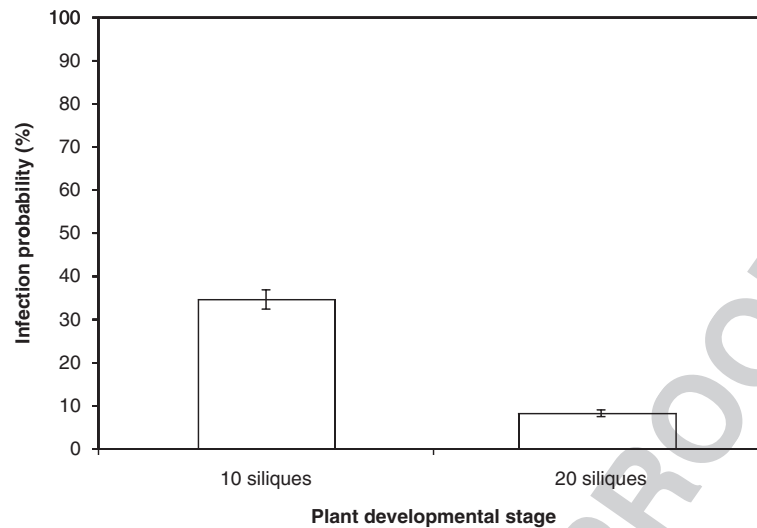


Figure 3 Influence of plant developmental stage on transmission capacity of *Alternaria brassicicola* (Abra43) to seeds of *Arabidopsis thaliana* plants (Ler ecotype). Siliques were inoculated when 10 or 20 siliques were present on the main flowering stem. Harvesting was done 10 days after inoculation. Values represent means with IC₉₅.

249 described above by inoculating the five oldest siliques
250 on plants on which 10 siliques were present on the
251 main flowering stem, and individually harvesting
252 seeds 10 days after inoculation. Parallel leaf inocula-
253 tion experiments were conducted to ensure that the
254 *nik1Δ3* mutant strain was still virulent on *A. thaliana*
255 vegetative organs (Additional file 1).

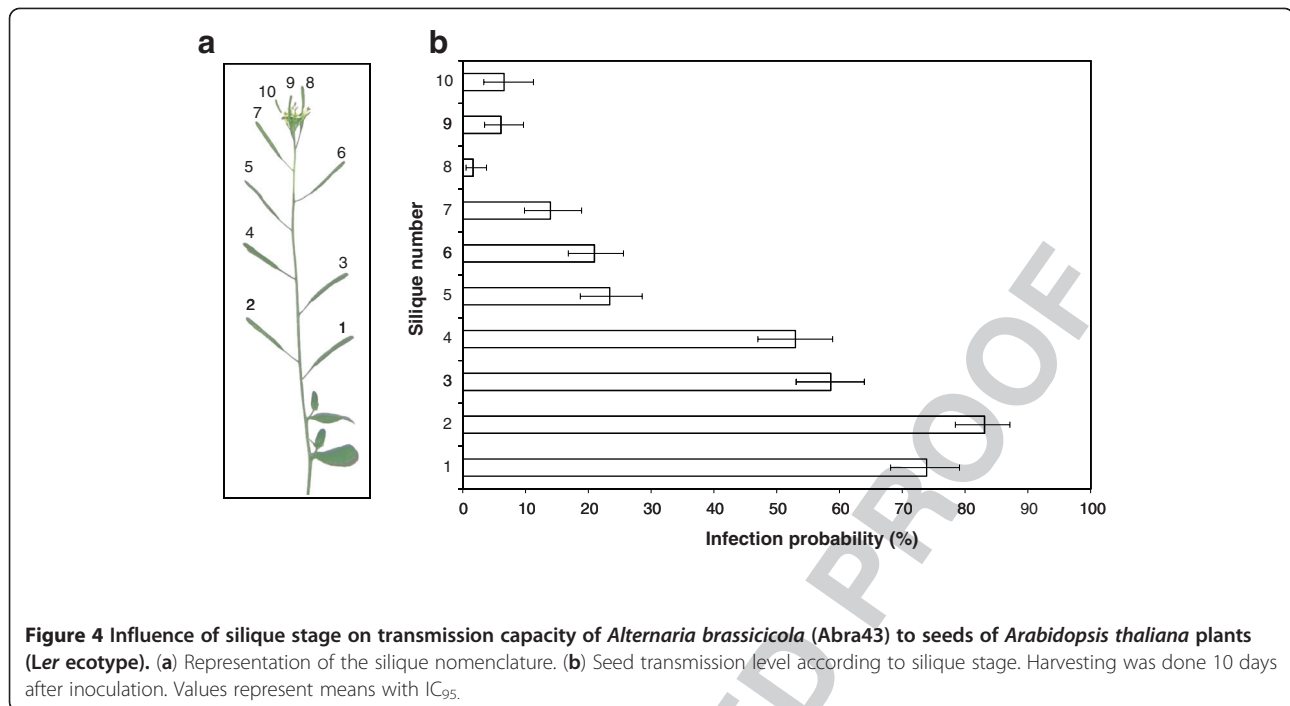
256 In comparison to the wild-type strain Abra43, the *nik1Δ3*
257 mutant strain, defective in *AbNIK1*, encoding a group III
258 osmosensor histidine kinase, was significantly affected with
259 respect to the transmission capacity to *Ler* ecotype seeds
F7 260 (Figure 7). Indeed, infection probability was 40% after in-
261 oculation with Abra43, and 12% after inoculation with the
262 *nik1Δ3* mutant strain (Figure 7a). This difference was statis-
263 tically significant overall ($p < 2 \times 10^{-16}$), and for each silique
264 ($p \leq 1.14 \times 10^{-8}$) (Figure 7b). The gradient of fungal inci-
265 dence from the oldest silique (n°1) to the youngest inocu-
266 lated one (n°5) observed after inoculation with Abra43 was
267 also noted for the *nik1Δ3* mutant strain.

268 Seed transmission efficiencies of *A. brassicicola* (Abra43)
269 on two *A. thaliana* genotypes, the *Ler* ecotype and the
270 *tt4-1* mutant, inactivated in flavonoid biosynthesis, were
271 also compared. Unexpectedly, the infection probability of
272 *A. brassicicola* to *tt4-1* seeds was significantly lower (15%)
273 than to seeds of the parental wild-type *Ler* ecotype (27%)
F8 274 (Figure 8a). The difference in the infection probability was
275 significant overall ($p < 2 \times 10^{-16}$), and for each inoculated
276 silique ($p \leq 12 \times 10^{-4}$) (Figure 8b). Parallel leaf inoculation
277 assays did not reveal any obvious difference in the capacity
278 of *A. brassicicola* to develop symptoms on vegetative

organs from either *A. thaliana* genotypes (Additional file 279
1). 280

Discussion 281

282 The main purpose of this study was to set up a new patho-
283 system that could be used to analyze molecular factors that
284 mediate the transmission of fungal pathogens to seeds. 285
286 *Arabidopsis thaliana* reproductive organs were inoculated
287 with the seedborne pathogen *A. brassicicola*. Some general
288 conclusions can be drawn from the findings of experi-
289 ments designed to define the optimal conditions for study-
290 ing fungal transmission to seeds of *A. thaliana*. First, 291
292 concerning the seed transmission routes, our results did
293 not reveal whether *A. brassicicola* was able to cause seed
294 infection via flowers, since floral development was inter-
295 rupted due to inoculation with a virulent isolate. Oliver
296 et al. [2] demonstrated, via glasshouse inoculation trials
297 and examination of naturally infected *Cakile* seeds, that
298 seed infection could occur through the flowers, though
299 less efficiently than the fruit route. Indeed, the floral route
300 seems to be more specific to opportunistic pathogenic
301 strains of *Alternaria alternata*, with this phenomenon
302 being explained by the weakness of flower defence
303 mechanisms. By contrast, we found that the fruit route
304 was efficient and the seed contamination levels (30%) thus
305 observed in *A. thaliana* under our experimental conditions
306 were comparable to those obtained by Oliver et al. [2] for
307 *Cakile maritima* seeds in field and laboratory conditions,
with the frequency of infection positively correlated with
the lesion density on the fruit surface.



308 Our results also confirmed data obtained on *Brassica*
 309 seed crops in field conditions, indicating a vertical dis-
 310 ease gradient on fruits, with the infection first affecting
 311 the lowest siliques and then spreading slowly upwards
 312 [14]. This was explained by the observation that conidia
 313 are often disseminated short distances and retained
 314 within the canopy. As in our laboratory conditions, in-
 315 oculum was distributed equally on all siliques, the more
 316 efficient transmission to seeds from the lower siliques
 317 could be mainly due to silique maturity differences, as
 318 *Alternaria* development is favored on senescent tissues
 319 [19].

320 The mode of seed infection by *A. brassicicola* and its
 321 localization on the reproductive organ tissues was
 322 already described several years ago [15]. We used our
 323 model pathosystem to perform a microscopic analysis of
 324 contaminated seeds, but also of contaminated siliques.
 325 Concerning seeds, surface colonization via conidia and
 326 hyphae was observed and resulted in desquamation of
 327 the seed surface, in accordance with previously published
 328 data [15]. Such intensive fungal development could be
 329 favored by the release of carbohydrates at the surface of
 330 damaged seeds as proposed by Knox-Davies [15]. Coni-
 331 diogenesis has frequently been observed on contami-
 332 nated seeds, with spores preferentially located in seed
 333 coat folds and cracks, which may provide protection
 334 against harsh environments [20]. Superficial hyphae also
 335 penetrated within the seed, as confirmed by SEM and
 336 confocal laser scanning microscopy. Our observations
 337 did not allow us to determine if *A. brassicicola* was

limited to the seed coat or also present inside the endo- 338
 sperm and embryo. However, according to Singh & 339
 Mathur [17], whereas biotrophic fungi are often located 340
 in the embryo, necrotrophic fungi like *A. brassicicola* are 341
 generally located on seed and fruit coats, and deeper 342
 penetration is uncommon. In line with this, *A. brassici-* 343
cola was found to be confined to the testa of naturally 344
 infected Brussels sprout seeds while being mainly on the 345
 surface cabbage seeds [15]. The extent of testa 346
 colonization could not be accurately determined and 347
 would require transmission electronic microscopy analy- 348
 sis of ultra-thin seed cuts or confocal laser scanning 349
 microscopy analysis of seed cuts. Nevertheless, hyphal 350
 penetration of *A. thaliana* seed coats was evidently ac- 351
 companied by seed surface damage. This phenomenon 352
 could be due to the production of plant tissue degrad- 353
 ation enzymes, for example cutinases, as already 354
 described for *A. brassicicola*, and it could potentially ac- 355
 company the penetration of cabbage tissues [21,22]. The 356
 same hypothesis was put forward by Vaughan et al. [23] 357
 with respect to soybean seed colonization by several 358
Alternaria sp.. To our knowledge, no detailed micro- 359
 scopic analysis has ever been reported concerning silique 360
 colonization. A few days before seed harvest, typical 361
 black-spot symptoms developed on fruits at inoculation 362
 sites where intensive development of the fungus was 363
 observed on the outer surface of siliques. Penetration in- 364
 side the fruit was either via stomata, intercellular spaces 365
 or replum, with occasional differentiation of appressoria- 366
 like structures. 367

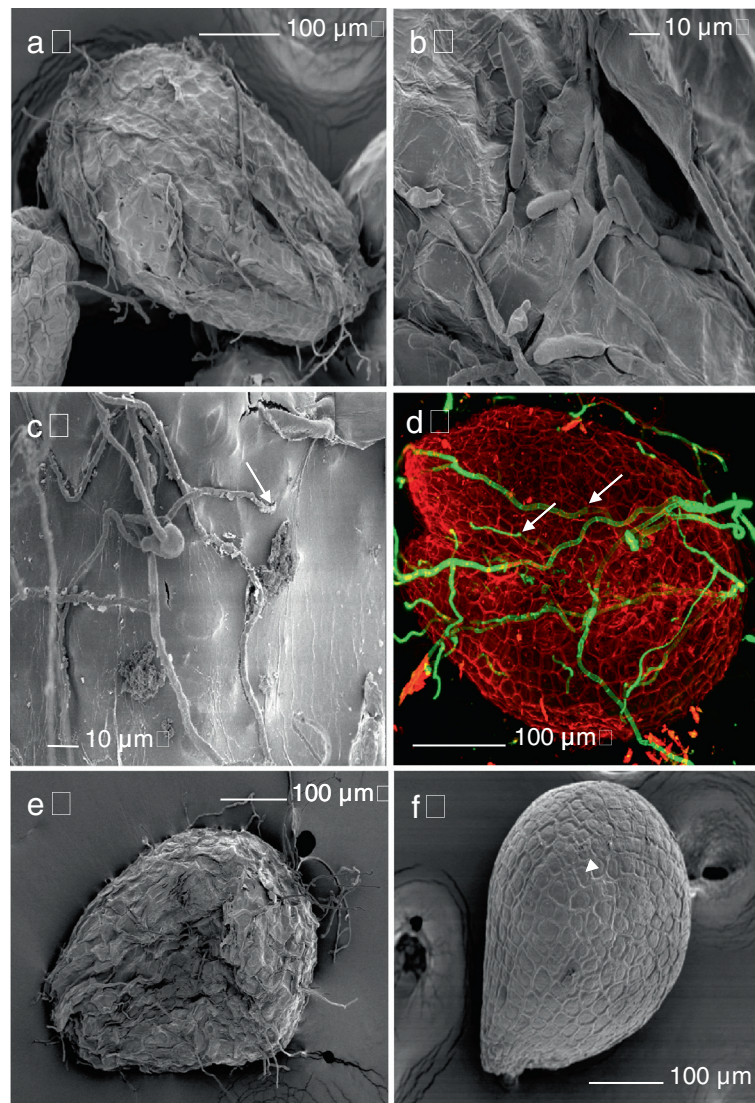


Figure 5 *A. brassicicola* localization on *A. thaliana* seeds. Scanning electron microscopy (a, b, c, e and f) and confocal laser scanning microscopy (d) images of *Arabidopsis thaliana* seeds (Ler ecotype) 10 days after inoculation with *Alternaria brassicicola* (Abra43). (a) Global colonization of a seed by *A. brassicicola*. (b) conidia formation on a seed. (c) direct hyphal penetration into the seed coat (white arrow). (d) mycelium development on a seed. Hyphae were stained with solophenyl flavin, and seed coat with propidium iodide. Hyphae grew on the seed surface, then penetrated into the seed coat (white arrows): hyphal brightness was lower when hyphae were growing within the seed coat. (e) and (f), alteration of the seed surface after fungal colonization: seed seemed shrivelled (e) by comparison with a seed harvested on a control plant (f).

368 The model pathosystem thus defined was then used to
369 specify the molecular factors impacting the seed
370 colonization process by using mutant genotypes of the
371 pathogen and host plant. In maturing seeds, the water con-
372 tent dramatically decreases, leading to a reduction in the
373 metabolism necessary for seed conservation. During seed
374 colonization, fungi could thus be exposed to severe water
375 and osmotic stresses that they have to overcome to be effi-
376 ciently transmitted to seeds and complete their infection

cycle. Then the ability to cope with water and osmotic 377
stress could be a factor that determines their transmission 378
to seeds. *Arabidopsis thaliana* silique inoculation in controlled 379
conditions allowed us to repeatedly show a lower seed 380
transmission capacity for *nik1Δ3*, a disruption mutant 381
deficient in a group III histidine kinase involved in the os- 382
motic stress response [18], by comparison with its wild-type 383
parental strain Abra43. The contamination level was signifi- 384
cantly lower at every silique stage, with a gradient from the 385

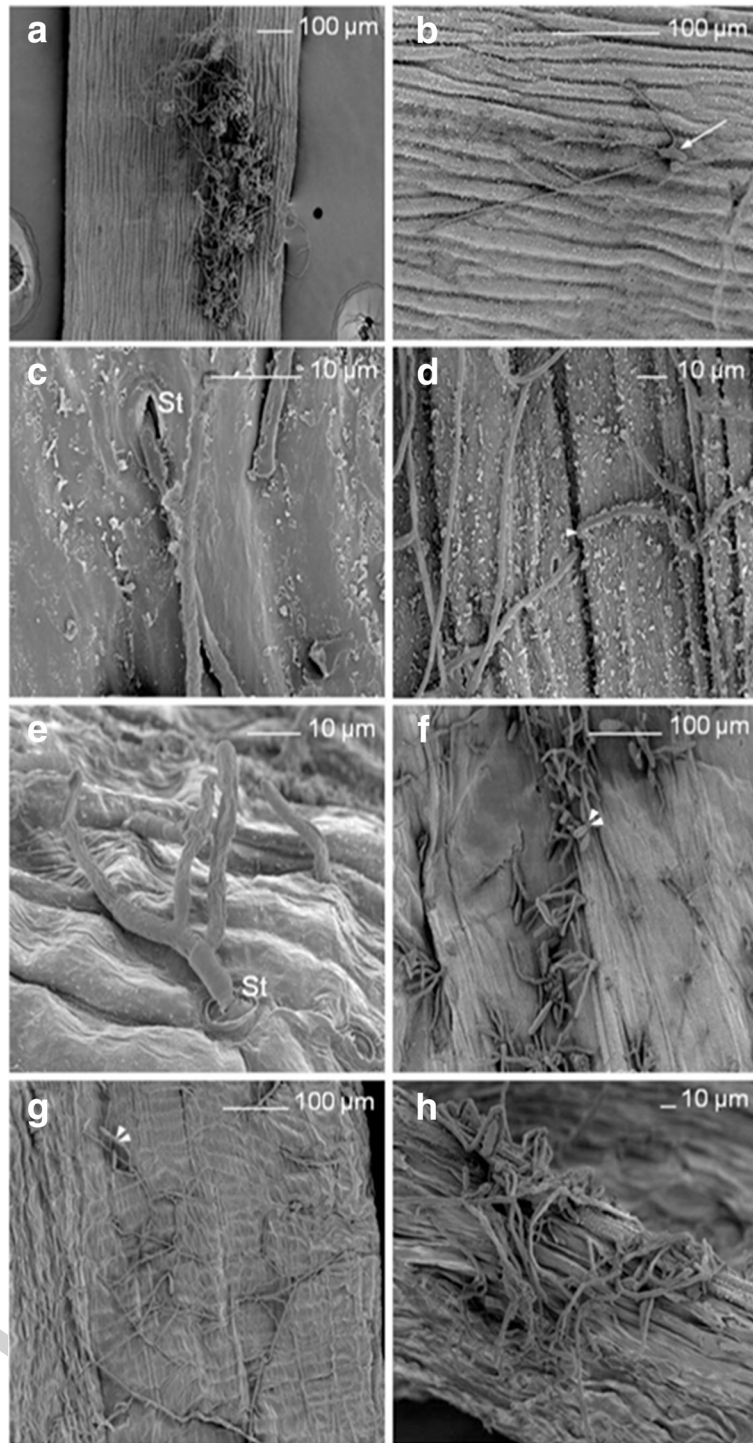


Figure 6 *A. brassicicola* localization on *A. thaliana* siliques. Scanning electron microscopy images of *Arabidopsis thaliana* (Ler ecotype) siliques 10 days after inoculation with *Alternaria brassicicola* (Abra43). (a), mycelium development on the outer surface of a silique in many directions from the inoculation point. (b), conidia germination (white arrow) on the outer surface of a silique. (c), hyphal penetration into silique tissues via a stomatum (St). (d), direct hyphal penetration into silique tissues at cellular junctions (white arrowhead). (e), hyphal reemergence from silique tissues via a stomatum (St). (f), conidia formation (double white arrowheads) on the outer surface of a silique. (g), mycelium development and conidia formation (double white arrowheads) on the inner surface of a silique. (h), abundant fungal colonization of the replum.

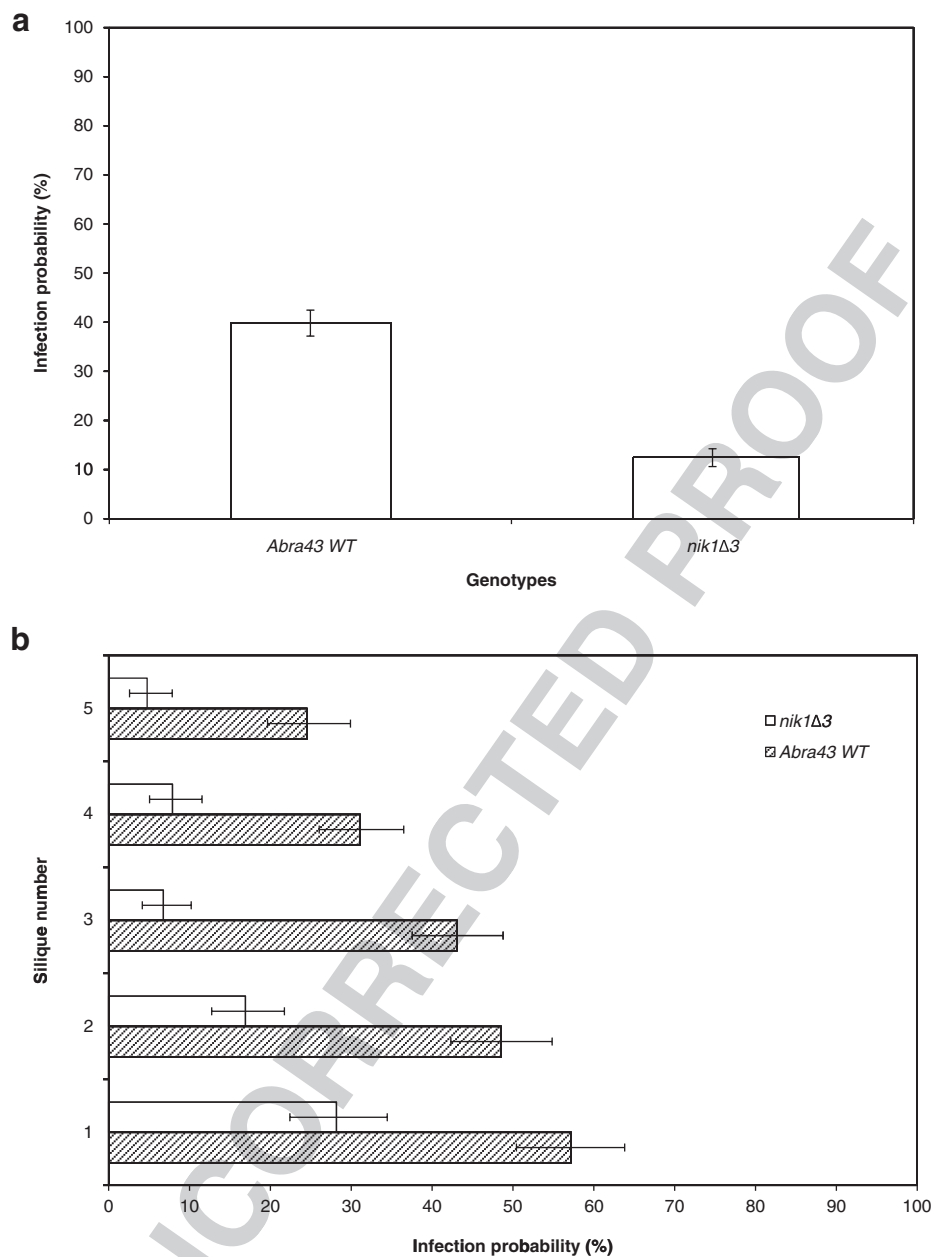


Figure 7 Influence of *A. brassicicola* genotypes on seed transmission capacity. Transmission capacity of two *Alternaria brassicicola* genotypes, Abra43 and *nik1*Δ3, to *Arabidopsis thaliana* seeds (*Ler* ecotype). **(a)**, global seed transmission capacity. **(b)**, seed transmission capacity according to the silique stage. Hatched bars: Abra43, white bars: *nik1*Δ3. Harvesting was done 10 days after inoculation. Values represent means with IC₉₅.

386 oldest to the youngest silique, as observed after Abra43 in-
387 oculation. This confirms previous findings indicating that
388 *A. brassicicola* null mutants in the *AbNIK1* gene, although
389 their virulence on host vegetative tissues remained intact,
390 were affected in their transmission to radish seeds after arti-
391 ficial inoculation in field conditions [7].

Using our model pathosystem, we took advantage of 392
the availability of *A. thaliana transparent testa (tt)* 393
mutants, to assess the influence of flavonoids present in 394
seed testa on their susceptibility to fungal infection. The 395
selected mutant line *tt4* is altered in the chalcone syn- 396
thase gene [24] and therefore disrupted in the first step 397

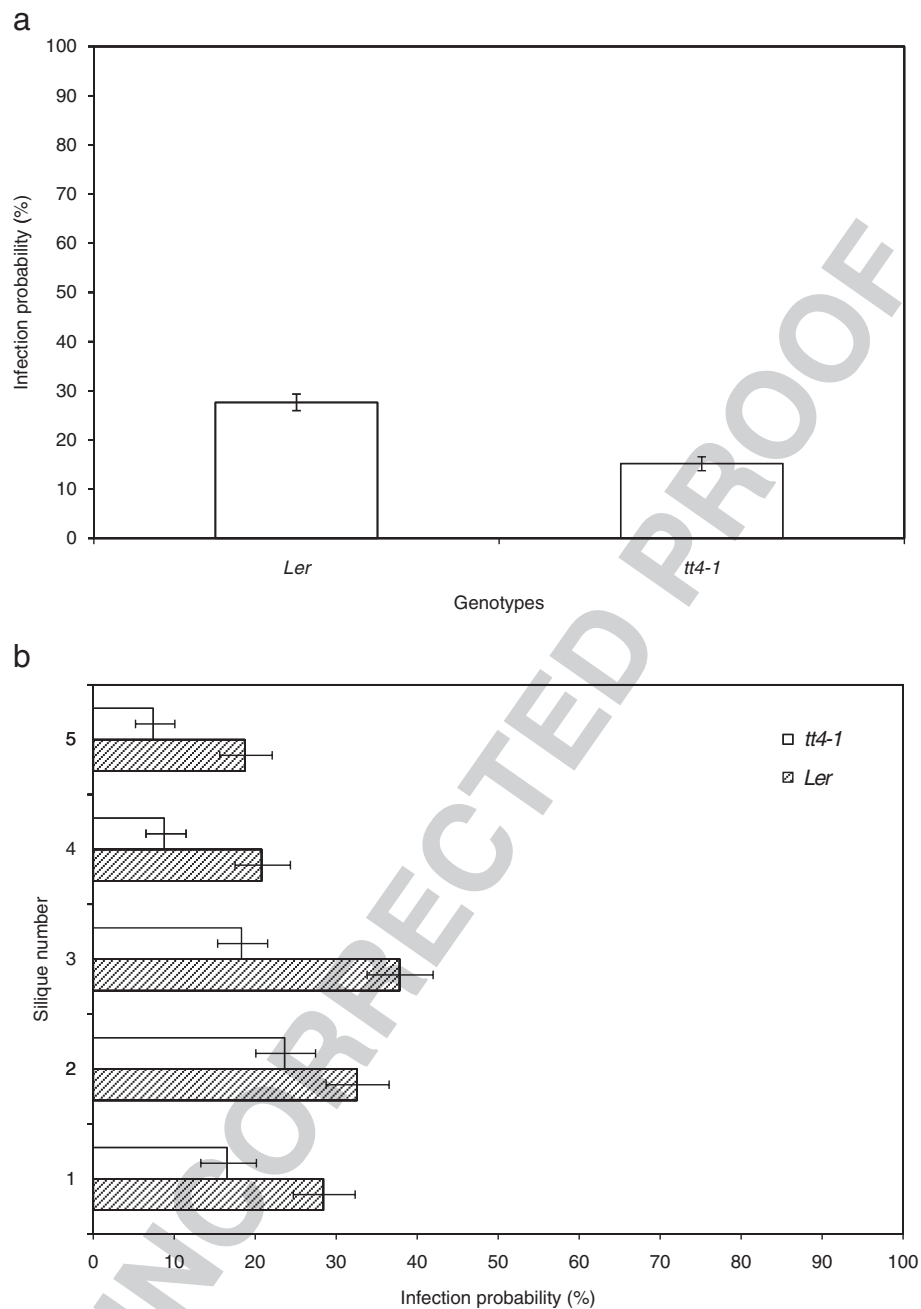


Figure 8 Influence of *A. thaliana* genotypes on seed transmission capacity. Transmission capacity of *Alternaria brassicicola* (Abra43) to seeds of two *Arabidopsis thaliana* genotypes: Ler ecotype and *tt4-1* mutant. (a), global seed transmission capacity. (b), seed transmission capacity according to silique stage. Hatched bars: Ler ecotype, white bars: *tt4-1* mutant. Harvesting was done 10 days after inoculation. Values represent means with IC₉₅.

398 of the flavonoid biosynthesis pathway. It produces pale
399 yellow seeds and does not produce any of the flavonoid
400 compounds present in WT seeds, i.e. proanthocyanidins
401 and flavonols [25]. Based on the well-documented plant
402 protection functions of flavonoids against abiotic and

biotic stresses [26], and previously published data showing
403 that peas with dark seed coats were less susceptible
404 to fungal infections than those with light-colored coats
405 [27], we anticipated that *A. brassicicola* would colonize
406 seeds of the *tt4-1* allele more efficiently than the wild
407

408 type. Unexpectedly, although a downward vertical gradi- 459
409 of seed infection was still observed for both wild-type 460
410 and mutant genotypes, significantly lower *A. brassicicola* 461
411 infection probabilities were obtained with the flavonoid 462
412 deficient mutant. A recent metabolomic study character- 463
413 ized several compounds over-accumulating in seeds of 464
414 *tt4-1* plants compared to those of wild-type *Ler*, as phen- 465
415 olic choline esters, sinapate-derived metabolites and glu- 466
416 cosinolate breakdown products [28]. Although the 467
417 antimicrobial properties of the former compounds have 468
418 yet to be characterized, glucosinolate derivatives have 469
419 been well documented as potentially toxic for pathogens,
420 including *A. brassicicola* [29], and such metabolomic
421 changes in *tt4-1* seeds might explain our observations.
422 These hypotheses can be tested by investigating the
423 xtransmission behaviour of *Arabidopsis* mutants dis-
424 rupted in sinapate and glucosinolate metabolisms. Com-
425plementary investigations using different *tt* mutants and
426 different *tt4* alleles are required to reliably conclude on
427 the role of flavonoids in the seed transmission process of
428 *A. brassicicola* to *A. thaliana*.

429 Conclusions

430 We have established a reliable *Arabidopsis*-based patho- 481
431 system allowing investigations of fungal transmission to 482
432 seeds. The results obtained by comparing the seed trans- 483
433 mission ability of two fungal genotypes (wild-type vs. 484
434 *nik1Δ3*) on the *Ler* ecotype and of the wild-type isolate 485
435 Abra43 on two plant genotypes (*Ler* vs. *tt4-1*) confirmed 486
436 that the described assay was suitable for assessing the 487
437 impact of different fungal or plant mutations on the seed 488
438 transmission process. This new pathosystem therefore 489
439 paves the way towards future studies involving other fun- 490
440 gal genotypes, e.g. hypersensitive to osmotic and/or 491
441 water stresses, and other plant genotypes, e.g. mutants 492
442 producing abnormal seed coats. Moreover, fungus- 493
443 infected seeds can now be reproducibly obtained and 494
444 used as starting material to study the ability of the patho- 495
445 gen to survive in seeds during storage and to transmit 496
446 from seeds to seedlings.

447 Methods

448 Fungal strains and growth conditions

449 The *A. brassicicola* strains Abra43 (wild-type) and *nik1Δ3* 501
450 (mutant inactivated in the *AbNIK1* gene) used in this study 502
451 have previously been described [18,29]. For routine culture, 503
452 Abra43 and *nik1Δ3* were grown and maintained on potato 504
453 dextrose agar (PDA) and PDA supplemented with 12 μg/
454 mL hygromycin B, respectively.

455 *Arabidopsis thaliana* genotypes and growth conditions

456 The capacity of *Alternaria brassicicola* to transmit to 509
457 seeds was studied in plants obtained by sowing seeds 510
458 of *Arabidopsis thaliana* individually in pots (7 x 7 x

7 cm) containing prewetted compost (NEUHAUS 459
HUMINSUBSTRAT *N4*, NFU 44–551). The Lands- 460
berg *erecta* (*Ler*) ecotype and its *tt4-1* mutant allele 461
(NASC reference N85), inactivated in the chalcone 462
synthase gene and totally defective in flavonoids 463
[24,30], were used. The plants were grown in a con- 464
trolled climatic room with day/night temperatures of 465
22°C/19°C and a 16 h photoperiod. ARACON base 466
and tube (ARASYSTEM, BETATECH bvba, Gent, Bel- 467
gium) were placed as soon as the floral stem 468
appeared. 469

Infection assays and seed contamination assessment 470

The floral infection route for seed transmission was 471
tested by inoculating *A. thaliana* floral buds with 5 μL 472
drops of an *A. brassicicola* conidial suspension. Two par- 473
allel experiments were performed with conidial suspen- 474
sion adjusted to either 1×10^4 or 1×10^5 conidia mL⁻¹. 475
The plants were maintained under saturating humidity 476
for 2 days in the dark and were monitored 6 and 14 days 477
after inoculation. 478

Most of the seed transmission assays used 1-month- 479
old *A. thaliana* plants with 10 (or 20 for determination 480
of the influence of the plant developmental stage on seed 481
transmission) siliques. The position of a silique at a pre- 482
cise stage of development is determined by the number 483
of flowers produced per inflorescence per day, which is 484
in general three or four. Two 2,5 μL drops of an *A.* 485
brassicicola conidial suspension (1×10^5 conidia mL⁻¹ in 486
water) supplemented with 0,01% (v/v) Tween 20 were 487
placed on the 10 (or 20 for determination of the influ- 488
ence of the plant developmental stage on seed transmis- 489
sion) youngest siliques (one drop at the silique base and 490
one in the middle). The oldest silique (at the base of 491
the bolting stem) was numbered 1 and the youngest 492
10 (or 20 for determination of the influence of the 493
plant developmental stage on seed transmission). At 494
least three plants per fungal or plant genotype were 495
inoculated and the experiment was repeated twice. As 496
a control for all experiments, two 2,5 μL drops of a 497
0,01% (v/v) Tween 20 solution were placed on 10 sili- 498
ques of one plant. The plants were then maintained 499
under saturating humidity for 2 days in the dark. 500

Contaminated siliques were harvested 10 days after 501
inoculation (or 20 days after inoculation for determin- 502
ation of the influence of the harvest date on seed 503
transmission). Inoculated or control siliques were dis- 504
sected with sterile forceps and seeds were carefully 505
harvested to avoid contact with the fungus potentially 506
present on the outer surface of siliques. Seeds were 507
incubated separately on PDA medium for 2 days. A 508
seed was considered to be contaminated when incuba- 509
tion resulted in typical colony development. As the 510
first results showed that contamination levels were 511

512 very low for siliques n°6 to n°10, only results for sili-
513 ques n°1 to n°5 were taken into account for further
514 experiments.

515 Statistical analysis

516 Because of their dichotomous nature (i.e. each seed is ei-
517 ther contaminated or not), seed contamination data were
518 analyzed using logistic (logit) generalized linear models
519 (for an introduction, see [31]). Statistical analyses were
520 performed with the R software package (version 2.12.0,
521 [32]), using the glm function with “family” set to “bino-
522 mial (link = “logit”)”. IC₉₅ (95% confidence interval)
523 values were extracted from such models. For ease of
524 reading, log odd values predicted by the models were
525 converted to infection probabilities, thus resulting in
526 slightly asymmetric IC₉₅s. Repetitions were treated as a
527 factor, and were found not to have a significant effect.

528 Scanning electronic microscopy (SEM)

529 For SEM observations, specimens (siliques valves and
530 seeds harvested 10 days after inoculation) were fixed
531 under vacuum in 4% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phos-
532 phate buffer (pH 7.2) for 4 h at 4°C and stored overnight
533 at 4°C in the same fixative buffer. Specimens were rinsed
534 once in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and post-fixed
535 in 2% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer
536 (pH 7.2) in the dark for 2 h. Samples were rinsed three
537 times with distilled water, dehydrated in a graded ethanol
538 series (50, 70, 95 and 100% for 10 min each). The last
539 100% ethanol bath was repeated three times. The dehy-
540 dration process was completed by treating samples in
541 ethanol/acetone (1:1, v/v) for 15 min and then twice in
542 acetone for 15 min. Specimens were dried by the criti-
543 cal-point method. Silique walls and seeds were then
544 sputter-coated with a thin carbon layer and examined
545 using a JSM 6301-F (JEOL, Tokyo, Japan) scanning elec-
546 tron microscope operating at 3 kV.

547 Confocal laser scanning microscopy

548 For confocal laser scanning microscopy observations,
549 seeds harvested 10 days after inoculation were observed
550 after double staining: seed cell walls were stained with
551 propidium iodide [33] and fungal cell walls, with solophenyl
552 flavin [34].

553 Seeds were immersed for 2 min in a 1% (w/v) propi-
554 dium iodide solution and rinsed twice in 0.1 M phos-
555 phate buffer (pH 7.2). Then the seeds were incubated in
556 a 0.1% (w/v) solophenyl flavin solution for 5 min and
557 rinsed twice in ultrapure water, and then stored in 50%
558 (v/v) glycerol at 4°C until analysis under a Nikon (Nikon
559 Instruments, Melville, NY) A1S1 confocal laser micro-
560 scope equipped with argon-ion (488 nm) and diode
561 (561 nm) lasers. Solophenyl flavin staining was detected
562 with the emission light set at 520 nm, and propidium

iodide staining with the emission light set at 617 nm. 563
Several images were overlapped to obtain a tridimen- 564
sional picture. 565

Additional file

Additional file 1: Effects of the disruption of *AbNIK1* on the virulence of *A. brassicicola* on *A. thaliana* and of the *tt4* mutation on the susceptibility of *A. thaliana* to *A. brassicicola*. Leaves of *A. thaliana* Ler ecotype or its *tt4* mutant were inoculated with conidia suspensions of Abra43 and *nik1Δ3* strains. For each plant-pathogen combination, five leaves are shown that correspond to representative symptoms obtained at 6 dpi.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SP developed the seed transmission pathosystem, performed the experimental work and wrote a draft of the manuscript. ET prepared most of the plant samples for microscopy. BI carried out initial experiments aimed at studying the seed transmission routes. TG and IB supervised experiments involving *A. brassicicola* and *A. thaliana* mutants, respectively. SG and MJ provided technical assistance with scanning electronic and confocal laser scanning microscopy, respectively. RB performed the statistical analyses. PS and CC designed and coordinated the project and wrote the manuscript. All authors performed a critical reading and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the French Région Pays de la Loire (QUALISEM research program). We are grateful to Sylvain Hanteville and Bruno Hamon for technical assistance. We thank David Manley for editing the manuscript.

Author details

¹Université d'Angers, UMR 1345 IRHS, SFR QUASAV, 2 Bd Lavoisier, Angers cedex, F-49045 France. ²INRA, UMR 1345 IRHS, 16 Bd Lavoisier, Angers cedex, F-49045, France. ³Agrocampus-Ouest, UMR 1345 IRHS, 2 Bd Lavoisier, Angers cedex, F-49045, France. ⁴USAMV, 59 Bd Marasti, Bucharest, Ro-71331, Romania. ⁵Université d'Angers, SCIAM, IBS, 4 rue Larrey, Angers cedex, F-49933, France. ⁶Université d'Angers, SFR QUASAV, IMAC, rue Georges Morel, Beaucouzé cedex, F-49071, France. ⁷INRA, UMR1318 IJBP, Saclay Plant Sciences, Route de Saint-Cyr, Versailles Cedex 78026, France.

Received: 23 January 2012 Accepted: 23 April 2012

Published: 9 May 2012

References

1. Van den Bosch F, Fraaije BA, van den Berg F, Shaw MW: Evolutionary bi-stability in pathogen transmission mode. *Proc Royal Soc B* 2010, **277**:1735–1742.
2. Oliver EJ, Thrall PH, Burdon JJ, Ash JE: Vertical disease transmission in the *Cakile-Alternaria* host-pathogen interaction. *Aust J Bot* 2001, **49**:561–569.
3. Hewett PD: *Septoria nodorum* on seedlings and stubble of winter wheat. *Trans Br Mycol Soc* 1975, **65**:7–18.
4. Baker KF, Smith SH: Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 1966, **14**:311–332.
5. Elmer WH: Seeds as vehicles for pathogen importation. *Biol Invasions* 2001, **3**:263–271.
6. Cappelli C: Seeds: pathogen transmission through. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis; 2007:1142–1147.
7. Iacomì-Vasilescu B, Bataillé-Simoneau N, Campion C, Dongo A, Laurent E, Serandat I, Hamon B, Simoneau P: Effect of null mutations in the *AbNIK1* gene on saprophytic and parasitic fitness of *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to dicarboximides fungicides. *Plant Pathol* 2008, **57**:937–947.
8. Schlaich NL: *Arabidopsis thaliana*: the model plant to study host-pathogen interactions. *Curr Drug Targets* 2011, **12**:955–966.
9. Lawrence CB, Mitchell TK, Craven KD, Cho Y, Cramer RA, Kim KH: At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathol J* 2008, **24**:101–111.

- 624 10. Maude RB, Humpherson-Jones FM: **Studies on the seed-borne phases of**
625 **dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria***
626 ***brassicae*) of brassicas.** *Ann Appl Biol* 1980, **95**:311–319.
- 627 11. Maude RB, Humpherson-Jones FM, Shuring CG: **Treatments to control**
628 ***Phoma* and *Alternaria* infections of brassica seeds.** *Plant Pathol* 1984,
629 **33**:525–535.
- 630 12. Humpherson-Jones FM: **The incidence of *Alternaria* spp. and**
631 ***Leptosphaeria maculans* in commercial brassica seed in the United**
632 **Kingdom.** *Plant Pathology* 1985, **34**:385–390.
- 633 13. Kubota M, Abiko K, Yanagisawa Y, Nishi K: **Frequency of *Alternaria***
634 ***brassicicola* in commercial cabbage seeds in Japan.** *J Gen Plant Pathol*
635 2006, **72**:197–204.
- 636 14. Humpherson-Jones FM, Maude RB: **Studies on the epidemiology of**
637 ***Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops.** *Ann*
638 *Appl Biol* 1982, **100**:61–71.
- 639 15. Knox-Davies PS: **Relationships between *Alternaria brassicicola* and *Brassica***
640 **seeds.** *Trans Br Mycol Soc* 1979, **73**:235–248.
- 641 16. Maude RB: *Seedborne diseases and their control: principles and practice.*
642 Wallingford, United Kingdom: CAB International; 1996.
- 643 17. Singh D, Mathur SB: *Histopathology of seed-borne infections.* Boca Raton,
644 Florida: CRC Press LLC; 2004.
- 645 18. Dongo A, Bataillé-Simoneau N, Campion C, Guillemette T, Hamon B, Iacomi-
646 Vasilescu B, Katz L, Simoneau P: **The group III two-component histidine**
647 **kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the**
648 **bacterial polyketide ambruticin.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:127–134.
- 649 19. Thomma BPHJ: ***Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific**
650 **parasite.** *Molecular Plant Pathology* 2003, **4**:225–236.
- 651 20. Köhl J, van der Wolf JM: ***Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas***
652 ***campestris* pv. *campestris* in organic seed production of *Brassicaceae*:**
653 **epidemiology and seed infection.** *Wageningen: Plant Research International*
654 2005, Note 363, [http://edepot.wur.nl/17130].
- 655 21. Fan CY, Köller W: **Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi:**
656 **differential and sequential expression of cutinolytic esterases by**
657 ***Alternaria brassicicola*.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **158**:33–38.
- 658 22. Srivastava A, Ohm RA, Oxiles L, Brooks F, Lawrence CB, Grigoriev IV, Cho Y: **A**
659 **zinc finger family transcription factor *AbVf19* is required for the**
660 **induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria***
661 ***brassicicola*.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2012, **25**:443–452.
- 662 23. Vaughan DA, Kunwar IK, Sinclair JB, Bernard RL: **Routes of entry of**
663 ***Alternaria* sp. into soybean seed coats.** *Seed Science and Technology* 1988,
664 **16**:725–731.
- 665 24. Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM,
666 Goodman HM: **Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid**
667 **biosynthesis.** *Plant Journal* 1995, **8**:659–671.
- 668 25. Routaboul JM, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J,
669 Lepiniec L: **Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis***
670 ***thaliana*.** *Planta* 2006, **224**:96–107.
- 671 26. Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I: **Flavonoid**
672 **oxidation in plants: from biochemical properties to physiological**
673 **functions.** *Trends Plant Sci* 2007, **12**:29–36.
- 674 27. Mohamed-Yaseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE, Costanza S: **The role of**
675 **seed coats in seed viability.** *Bot Rev* 1994, **60**:246–260.
- 676 28. Böttcher C, von Roepenack-Lahaye E, Schmidt J, Schmotz C, Neumann S,
677 Scheel D, Clemens S: **Metabolome analysis of biosynthetic mutants**
678 **reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a**
679 **large number of new compounds in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2008,
680 **147**:2107–2120.
- 681 29. Sellam A, Iacomi-Vasilescu B, Hudhomme P, Simoneau P: ***In vitro* antifungal**
682 **activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the**
683 **crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*.** *Plant*
684 *Pathol* 2007, **56**:296–301.
- 685 30. Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M: **Influence of the testa on**
686 **seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol*
687 2000, **122**:403–413.
- 688 31. Rodríguez G: **Lecture Notes on Generalized Linear Models.** 2007, [http://
689 data.princeton.edu/wws509/notes/].
- 690 32. R Development Core Team: ***R: A language and environment for statistical***
691 **computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2010.
- 692 33. Truernit E, Haseloff J: **A simple way to identify non-viable cells within**
693 **living plant tissue using confocal microscopy.** *Plant Methods* 2008, **4**:15.
34. Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN: **Two new fluorescent dyes** 694
applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* 2005, **95**:580–588. 695

doi:10.1186/1746-4811-8-16

Cite this article as: Pochon et al.: The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* 2012 **8**:16.

696

697

698

699

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Abba, S., Ghignone, S. and Bonfante, P. (2006) A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics*, **7**, 39-54.

Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H., Kohmoto, K. (1999) Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Curr. Genet.* **35**: 647-656.

Alfano, J.R., and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* **179**: 5655-5662.

Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 385-414.

Allen, AM., Lexer, C., Hiscock, SJ. (2010) Comparative analysis of pistil transcriptomes reveals conserved and novel genes expressed in dry, wet and semidry stigmas. *Plant Phy.* **154**: 1347-1360.

Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., Randall, S.K. (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem.* **278**(42):40882-9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**(3):403-10.

Alvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R.V., Piñeyro-Nelson, A., Sánchez-Corrales, Y.E. (2000) Flower development. *Arabidopsis Book*. 8:e0127. Epub 2010 Mar 23.

Angus, JF., Gardner, PA., Kirkegaard, JA., Desmarchelier, JM. (1994) Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil.* **162**: 107-112.

Arabidopsis Genome Initiative, « Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* », dans *Nature*, vol. 408, n° 6814, 14 décembre 2000, p. 796-815.

Aravind, L., and Ponting, C.P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 111-116.

Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Boucher, C.A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J.* **13**: 543-553.

Attfield, P.V. (1997) Stress tolerance : the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* **15** : 1351-1357.

Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B. and Bataillé-Simoneau, N. (2005) Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Curr. Genet.* **47**: 234–243.

-B-

Baker, K.F., and Smith, S.H. (1966) Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **14**: 311–332.

Barcelo, J., and Poschenrieder, C. (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanism of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ Exp Bot.* **48**: 75–92.

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A. (2008) The enigmatic LEAP and other hydrophilins. *Plant Physiol.* **148**: 6-24

Battista, J.R., Park, M.J., McLemore, A.E. (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology.* **43**(2): 133-139.

Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., Johnston, J.S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25 % larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 MB. *Annals of Botany.* **91**: 547-557.

Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gavioli, M., Llobès, R., Cascales, E. (2011) Regulation of type VI secretion gene clusters by sigma54 and cognate enhancer binding proteins. *J Bacteriol.* **193**(9): 2158-67.

Berto, P., Belingheri, L., Dehorter, B. (1997) Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 533-536.

Berto, P., Commenil, P., Belingheri, L. and Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol Lett.* **180** : 183-189.

Birnboim, HC. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**:243-55.

Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R., Leopold, C. (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology.* **96**: 868-874.

Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denance, N., Vasse, J., Lauber, E., Arlat, M. (2007) Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE.* **2**: art. no. e224.

Bordes, P., Lavatine, L., Phok, K., Barriot, R., Boulanger, A., Castanié-Cornet, M.P., Déjean, G., Lauber, E., Becker, A., Arlat, M. and Gutierrez, C. (2011). Insights into the extracytoplasmic stress response of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: role and regulation of sE-dependent activity. *J. Bacteriol.* **193** : 246-264.

Böttcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D., Clemens, S. (2008) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 2107–2120.

Boucher, C., Genin, S., Arlat, M. (2001) Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria. *C R Acad Sci III.* **324**: 915-922.

Boulanger, A., Déjean, G., Lautier, M., Glories, M., Zischek, C., Arlat, M., Lauber, E. (2010) Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol.* **192**(6):1487-97.

Bradbury, J.F. (1984) *Xanthomonas* Dowson. 1939. In: *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Vol. 1 Krieg NR, Holt JG, eds (Baltimore, Williams & Wilkins), 199-210.

Bray, EA. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**:1035-1040.

Bretschneider, K., Gonella, Robeson, D. (1989) A comparative light- and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 285-297.

Browne, L.M. (1991) The camalexins: new phytoalexins produced in the leaves of *Camelina sativa* (Cruciferae). *Tetrahedron.* **47**: 3909-3914.

Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 57-65.

Buitink, J., Leprince, O. (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol.* **331**(10):788-95.

Büttner, D., and Bonas, U. (2002a) Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J.* **21**: 5313-5322.

Buttner, D., Bonas, U. (2002b). Port of entry – the type III secretion translocon. *TRENDS in Microbiology.* **10**: 186-192.

Büttner, D., and Bonas, U. (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 312-319.

Büttner, D. and Bonas, U. (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 107-133.

Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L., Bonas, U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**: 755–768.

Büttner, D., and He, SY. (2009) Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Phys.* **150**: 1656-1664.

-C-

Calmes, B. (2011) Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les *Brassicaceae* - Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases. Thèse de doctorat.

Cappelli, C. (2007) Seeds: pathogen transmission through. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Boca Raton. Florida: Taylor & Francis, 1142–1147.

Catlett, N.L., Yoder, O.C., Turgeon, B.G. (2003) Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell.* **2** : 1151–1161.

Chalupowicz L, Zellermann EM, Fluegel M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Savidor A, Sessa G, Iraki N, Barash I, Manulis-Sasson S. (2012) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology.* **102**(1):23-31.

Chen, X., Stewart, P.S. (2002) Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**(6):718-20.

Chigri, F., Sippelb, C., Kolbb, M., Vothknechta, U.C. (2009) *Arabidopsis* OBG-Like GTPase (AtOBGL) Is Localized in Chloroplasts and Has an Essential Function in Embryo Development. *Mol. Plant.* **2**(6): 1373-1383.

Cho, Y., Davis, J.W., Kim, K.H., Wang, J., Sun, Q.H., Cramer, R.A., Lawrence, C.B. (2006) A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element. *Mol Plant Microbe Interact.* : 7-15.

Cho, Y., Cramer, R.A., Jr, Kim, K.H., Davis, J., Mitchell, T.K., Figuli, P., Pryor, B.M., Lemasters, E., Lawrence, C.B. (2007) The Fus3/Kss1 MAP kinase homolog Amk1 regulates the expression of genes encoding hydrolytic enzymes in *Alternaria brassicicola*. *Fungal. Genet. Biol.* **44** : 543–553.

Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846.

Côme, D., Durand, B., Jacques, R., Penon, P., Roland, J.-C. (1982). Croissance et développement. Paris, Fr: Hermann.

Cooley, M.B., Miller, W.G., Mandrell, R.E. (2003) Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol.* **69**(8):4915-26.

Cooper, J.A. (1994) MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr. Biol.* **4**: 1118-1121.

- Cornelis, G. R.** (2006) The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 811-825.
- Cosgrove, D.J.** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**: 850-861.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* **284** : 1318-1322.
- Cotter, S.E., Surana, N.K., St Geme, J.W.** (2005) Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **13** : 199-205.
- Craig, L., Pique, M.E., Tainer, J.A.** (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 363-78.
- Cromarty, A.S., Ellis, R.H., Roberts, E.H.** (1990) Handbooks for Genebanks No. 1. The design of seed storage facility for genetic conservation. IBPGR, Rome.
- Crossman, L., Dow, J.M.** (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microb. Infect.* **6**: 623-629.

-D-

- Danhorn, T., Fuqua, C.** (2007) Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 654-663.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C., Jacques, M.-A.** (2007) Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 203-215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., Jacques M.-A.** (2008) Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean. *Applied Environmental Microbiology.* **74**: 2669-2678.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S. and Jacques, M.A.** (2009) Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**: 747-57.
- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro- Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez- Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M.,**

White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. **417**: 459-463.

Da Silva Neto, J., Koide, T., Abe, C., Gomes, S., Marques, M. (2007). Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. *Arch. Microbiol.* **189**(3):249-61.

Dautin, N., Bernstein, H.D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol.* **61**:89-112.

Dean P. (2011) Functional domains and motifs of bacterial type III ejector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev.* 1–26

Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M. (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **122**: 403-413.

Dejean, G. (2011) Caractérisation et conservation d'un nouveau système CUT associé à l'utilisation du xylane chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* : implications en écologie microbienne. Thèse de doctorat.

Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., Henderson, I.R. (2009) Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends in Microbiol.* **17** : 139-145.

Dodd, D., Cann, I.K. (2009) Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob. Change Biol. Bioenergy.* **1**: 2-17.

Dongo, A., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomi-Vasilescu, B., Katz, L., Simoneau, P. (2009) The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin. *Appl Environ Microbiol.* **75**(1):127-34.

Dubos, C., Le Gourrierc, J., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Alboresi, A., Weisshaar, B., Lepiniec, L. (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **55** : 940–953.

Dunger, G., Relling, V.M. (2007) Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* **188**: 127-135.

Dure, L., Greenway, S.C., Galau, G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*. **20**: 4162–4168.

Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., Sung, Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **12**: 475-486.

Dure, L. (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*. **3**: 363-369.

-E-

Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. **11**, 3647.

-F-

Fargier, E., and Manceau, C. (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*. **56**: 805-818.

Finelli, A., Gallant, C.V., Jarvi, K. and Burrows, L.L. (2003) Use of in-biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **185** : 2700-2710.

Flor, H.H. (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.

Francke, C., Kormelink, T.G., Hagemeijer, Y., Overmars, L., Sluijter, V., Moezelaar, R., Siezen, R.J. (2011) Comparative analyses imply that the enigmatic sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics*. **12**:385

Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., Oliver, R.P. (2008) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*. **10**(7) : 1421-1428.

-G-

Galan, J.E., Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. **284**: 1322-1328.

Galau, G., Hughes, D.W., Dure, L.I. (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **7**: 155-170.

Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**, 35.

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 5668-5674.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinsot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 711-724

Gloer, J.B., Poch, G.K., Short, D.N., McCloskey, D.V. (1988) Structure of brassicicolin A: a novel isocyanide antibiotic from the phylloplane fungus *Alternaria brassicicola*.

J. Org. Chem. **53**(16) : 3758–3761.

Gollan, T., Schurr, U., Schulze, E.D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of the xylem sap. *Plant, Cell and Environment*. **15**:551-559.

Goodwin, D.C., Lee, S.B. (1993) Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists, and animals for PCR. *Biotechniques*. **15**(3):438, 441-2,

Goyal, K., Pinelli, C., Maslen, S.L., Rastogi, R.K., Stephens, E., Tunnacliffe, A. (2005) Dehydration-regulated processing of late embryogenesis abundant protein in a desiccation-tolerant nematode. *FEBS Lett.* **579**(19):4093-8.

Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., Dangl, J.L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Ann Rev Microbiol.* **60**: 425-449.

Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A. (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* **149**: 1017-1027.

Guilhabert, M. R., and Kirkpatrick, B. C. (2005) Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:856-868.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. **59**(3): 307-321.

Guo, W., Ward, R.W., Thomashow M.F. (1992) Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis* cor47. *Plant Physiol.* **100** : 915-922.

Guo, Y., Figueiredo, F., Jones, J. and Wang, N. (2011) HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24** : 649-61.

Gurlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* **163**: 233-255.

-H-

Haapalainen, M., Engelhardt, S., Küfner, I., Li, CM., Nürnberger, T., Lee, J., Romantschuk, M., Taira, S. (2011) Functional mapping of harpin HrpZ of *Pseudomonas syringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Mol Plant Pathol.* **12**(2):151-66.

Halkier, B.A., and Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 303-33.

- Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41** : 95–98.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** : 557-580.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H.** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153**(2):384-95.
- Hartmann, N., Schulz, S., Lorenz, C., Fraas, S., Hause, G., Büttner, D.** (2012) Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology*. **158** : 1334-1349.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., Parkinson, J.S.** (2007) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *TRENDS Biochem. Sci.* **33**: 9-19.
- Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R.** (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann Bot (Lond)*. **41**: 1233–1258.
- Hirano, S.S., Ostertag, E.M., Savage, S.A., Baker, L.S., Willis, D.K., Upper, C.D.** (1997) Contribution of the regulatory gene *lemA* to field fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4304-4312.
- Hoch, J.A.** (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opinion in Microb.* **3**: 165–170.
- Hoch, H.C., Galvani, C.D., Szarowski, D.H., Turner, J.N.** (2005) Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*. **97**(3): 580-588.
- Hohmann, S., Krantz, M., Nordlander, B.** (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* **428** : 29–45.
- Huang, H.C., Lin, R.H., Chang, C.J., Collmer, A., Deng, W.L.** (1995) The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin Pss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia* *ysc* homologs. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 733-746.
- Huckelhoven, R.** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol.* **45**: 101-127.
- Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J.** (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* **11**: 537- 543.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K., Bonas, U.** (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol.* **29**(6):1379-90.

Humpherson-Jones F.M., and Maude R.B. (1982) Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Ann. Appl. Biol.* **100**: 61–71.

Hundertmark, M., and Hinch, D.K. (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* **9**:118-140.

-I-

Iacomi-Vasilescu, B. (2001) Les champignons du genre *Alternaria* pathogènes des crucifères et transmis par les semences : identification moléculaire et analyse de la variabilité génétique. Thèse de doctorat.

Iacomi-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataille-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., Simoneau, P., (2004) In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, pages 481-488.

Iacomi-Vasilescu, B., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Dongo, A., Laurent, E., Serandat, I., Hamon, B., Simoneau, P. (2008) Effect of null mutations in the AbNIK1 gene on saprophytic and parasitic fitness of *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to dicarboximides fungicides. *Plant Physiology.* **57**: 937-947.

Idnurm, A., and Howlett, B.J. (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol. Plant Pathol.* **2**: 241–255.

-J-

Jacques, M. A., Josi, K., Darrasse, A., Samson, R. (2005) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.*; **71**: 2008-2015.

Jamieson, Derek J., (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, **174** : 6678-6681.

Jansen, S., Sano, Y., Choat, B., Rabaey, D., Lens, F., Dute, RR. (2007) Pit membranes in tracheary elements of Rosaceae and related families: new records of tori and pseudotori. *Am. J. Bot.* **94**(4):503-14.

Jenkins, C. L., and M. P. Starr. (1982) The brominated aryl polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Curr. Microbiol.* **7**: 323–326.

Jepson, S.G., and Close, T.J. (1995) Purification of a maize dehydrin protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **6**(5):632-6.

Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.P., Simoneau, P., Guillemette T. 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques* **48**(5): 399-404.

Joubert, A., Bataille-Simoneau, N., Champion, C., Guillemette, T., Hudhomme, P., Iacomi-Vasilescu, B., Leroy, T., Pochon, S., Poupard, P., Simoneau, P. (2011a) Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cellular Microbiology*, **1**: 62-80.

Joubert A., Simoneau P., Champion C., Bataillé-Simoneau N., Iacomi-Vasilescu B., Poupard P., François J.M., Georgeault S., Sellier E., Guillemette T. (2011b) Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*, *Molecular Microbiology*. **79**(5):1305-1324.

-K-

Kaiser, W.J., and Vakili, N.G. (1978) Insect transmission of pathogenic *Xanthomonads* to bean and cowpea in Puerto Rico. *Phytopathology*. **68**: 1057-1063.

Kearns, DB. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. **8**(9):634-44.

Kemp, B.P., Horne, J., Bryant, A. and Cooper, R.M. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol. Mol. Plant Pathol*. **64**: 209–21.

Kim, J. G., Park, B. K., Yoo, C. H., Jeon, E., Oh, J., Hwang, I. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J. Bacteriol*. **185**: 3155-3166.

Kim JG, Jeon E, Oh J, Moon JS, Hwang I. (2004) Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J Bacteriol*. **186**(18):6239-47.

Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A., Mudgett, M.B. (2008) XopD SUMO Protease Affects Host Transcription, Promotes Pathogen Growth, and Delays Symptom Development in *Xanthomonas*-Infected Tomato Leaves. *Plant Cell*. **20**(7): 1915–1929.

Kim, J-G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., McLane, H., Martin, G.B., Mudgett, M.B. (2009) *Xanthomonas* T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. *Plant Cell*. **21**(4): 1305–1323.

Kliebenstein, D.J. (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ*. **27**: 675–684.

Knogge, W. (1996) Fungal infection of plants. *Plant Cell*. **8**: 1711-1722.

Knox-Davies, P.S. (1979) Relationships between *Alternaria brassicicola* and *Brassica* seeds. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **73**:235–248.

Koebnik, R., Krüger, A., Thieme, F., Urban, A., Bonas, U. (2006) Specific binding of

the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol.* **188**: 7652–7660.

Köhl, J., and van der Wolf, J. (2005) *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicaceae: Epidemiology and seed infection. Plant Research International B.V., Wageningen. Note 363.

Köhl, J., Van Tongeren, C.A.M., Groenenboom-de Haas, C.A.M., Van Hoof, R.A., Driessen R.L., V.d.H. (2010). Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. *Plant Pathology* **59** : 358-367.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Stam, P. (1998) Genetic analysis. *Methods Mol Biol.* **82**:105-17.

-L-

Lafon, J.P., Tharaud-Prayer, C., Lévy, G. (1996) Biologie des plantes cultivées. 2ème édition, Tome 1. Eds Lavoisier.

Lavín, J.L., Kiil, K., Resano, O., Ussery, D.W. & Oguiza, J.A. (2007) Comparative genomic analysis of two-component regulatory proteins in *Pseudomonas syringae*. *BMC Genomics*; **8**, 397.

Lebeda, A., Luhová, L., Sedláková, M., Jancova, D. (2001) The role of enzymes in plant-fungal pathogen interactions. *J. Plant Dis. Prot.* **108**: 89–111.

Lee, B-H. (2009) Ecotype-dependent genetic regulation of bolting time in the *Arabidopsis* mutants with increased number of leaves. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**(6), 542-546.

Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J. and De Ley, J. (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, **50**, 308-55.

Li, J.G., Liu, H.X., Cao, J., Chen, L.F., Gu, C., Allen, C., Guo, J.H. (2010) PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Mol Plant Pathol.* **11**(3):371-81.

Ligat, L., Lauber E, Albenne C, San Clemente H, Valot B, Zivy M, Pont-Lezica R, Arlat M, Jamet E. (2011) Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins. *Proteomics.* **11**(9):1798-813.

Lindgren, P. B., Peet, R. C., Panopoulos, N. J. (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* **168**: 512-522.

Lindgren, P. B. (1997) The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 129-152.

Liu, R., Ochman, H. (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A.; **104**: 7116-7121.

Logue, C.A., Peak, I.R.A., Beacham, I.F. (2009) Facile construction of unmarked deletion mutants in *Burkholderia pseudomallei* using *sacB* counter-selection in sucrose-resistant and sucrose-sensitive isolates. *J. Microbiol. Meth.* **76** : 320-323.

Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM. (2001) Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl Environ Microbiol.* **67**(5):1987-94.

Lummerzheim, M., de Oliveira, D., Castresana, C., Miguens, F., Louzada, E., Roby, D., Van Montagu, M., and Timmerman, B. (1993) Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact.* **6**: 532-544.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., and Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**: 506-577.

-M-

Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289-314.

Maude, R.B. and Humpherson-Jones, F.M. (1980) Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas. *Annals of Applied Biology.* **95**: 311-319.

Maude, R.B. (1996) Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. CAB International, Oxon, UK.

Mazar, J., Cotter, P.A. (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol.* **62**(3):641-54.

McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem.* **53**: 625-663.

Meena, N., Kaur, H., Mondal, A.K. (2010) Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem.* **285**(16):12121-32.

Meyer, A., Deiana, J., Leclerc, H. (1994) Cours de Microbiologie générale. Doin éditeurs-Paris. p. 14.

Meyer, D., Lauber, E., Roby, D., Arlat, M., and Kroj, T. (2005) Optimization of pathogenicity assays to study *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology.* **6**: 327-333.

Mithena RF, Lewisa BG, Heaneyb RK and Fenwickb GR (1987) Resistance of leaves of Brassica species to *Leptosphaeria maculans* Transactions of the British Mycological Society.

Mohamed-Yaseen, Barringer, SA., Splittstoesser, WE., Costanza, S. (1994) The role of seed coats in seed viability. *Botanical Review*.

Molina, M., Cid, V.J., Martín, H. (2010) Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast*. **27**(8):503-11.

Moore JP, Westall KL, Ravenscroft N, Farrant JM, Lindsey GG, Brandt WF (2004) The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-*O*-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical induced oxidation. *Polyphenol Commun*:79.

Morris, C. E., Monier, J.-M., M-A., J. (1997). Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*; **63**: 1570-1576.

Mouillon, J.M., Gustafsson, P., Harryson, P. (2006) Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol*. **141**(2):638-50.

Mtwisha, L., Brandt, W., McCready, S., Lindsey, GG. (1998) HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology*, **37**, 513-521.

Mukherjee, A.K., Lev, S., Gepstein, S., Horwitz, B.A. (2009) A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC Plant Biol*. **18** : 9:31.

Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S (2010) Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J Proteomic*. **73**(4): 709-720.

Müller, K. O. (1940). "Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora: Resistenz der Kartoffel." *Microbiol Mol Biol. Rev*: 708-724.

-N-

Neergard, P. (1945) Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*: taxonomy, parasitism, economical significance. *Einar Munksgaard Publishers*, Copenhagen, 560 pp.

N'Guyen, G. (2012) Analyse transcriptomique des déterminants impliqués dans la transmission d'*Alternaria brassicicola* à la semence d'*Arabidopsis thaliana*. Rapport Master 2.

-O-

Oda, Y. and Fukuda, H. (2012) Secondary cell wall patterning during wylem differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*. **15**:38-44.

Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK (2005) Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell*. **17**(10):2832-2847.

Oka, K., Akamatsu, H., Kodama, M., Nakajima, H., Kawada, T., Otani, H. (2005) Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **66**: 12-19.

Okada Y, Okada N, Makino S, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. (2006) The sigma factor RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* **263**(1):54-60.

Okada Y, Makino S, Okada N, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. (2008) Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **25**(9):1089-94.

Oliver EJ, Thrall PH, Burdon JJ, Ash JE (2001) Vertical disease transmission in the *Cakile-Alternaria* host-pathogen interaction. *Aust J Bot.* **49**:561-569.

O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., O'Shea, E.K. (2002). "Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* **18**(8): 405-412.

Osterberg, Teresa del Peso-Santos, and Victoria Shingler (2011) Regulation of Alternative Sigma Factor Use Sofia. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**:37-55.

Otani, H., Kohmoto, K., Komada, M. (1995) *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Can. J. Bot.* **73**: 453-458.

Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M., Kohmoto, K. (1998) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 285-295.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.

Ouyang, Z., Deka, R-K., Norgard, M-V. (2011) BosR (BB0647) Controls the RpoN-RpoS Regulatory Pathway and Virulence Expression in *Borrelia burgdorferi* by a Novel DNA-Binding Mechanism, *PLoS Pathogens.* **7**(2):e1001272.

-P-

Pedras, M. S., Ahiahou, P.W., Hossain, M. (2004). Detoxification of the cruciferous phytoalexin brassinin in *Sclerotinia sclerotiorum* requires an inducible glucosyltransferase. *Phytochemistry.* **65**(19): 2685-2694.

Pedras, M.S., Gadagi, R.S., Jha, M., Sarma - Mamillapalle, V.K. (2007). Detoxification of the phytoalexin brassinin by isolates of *Leptosphaeria maculans* pathogenic on brown mustard involves an inducible hydrolase. *Phytochemistry.* **68**(11): 1572-1578.

Pedras, M. S., Minic, Z. Sarma-Mamillapalle, V.K. (2009). Substrate specificity and

inhibition of brassinin hydrolases, detoxifying enzymes from the plant pathogens *Leptosphaeria maculans* and *Alternaria brassicicola*. *FEBS J* ; 276(24): 7412-7428.

Pedras, M.S., Chumala, P.B., Jin, W., Islam, M.S., Hauck, D.W. (2009) The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation. *Phytochemistry*. **70**(3):394-402.

Pedras, M.S., Minic, Z., Thongbam, P.D., Bhaskar, V., Montaut, S. (2010) Indolyl-3-acetaldoxime dehydratase from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: purification, characterization, and substrate specificity. *Phytochemistry*. **71**(17-18): 1952-62.

Pedras, M.S. and Minic, Z. (2011). "Differential protein expression in response to the phytoalexin brassinin allows the identification of molecular targets in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*." *Mol Plant Pathol*. **13**(5):483-93.

Pelicic, V., Reytrat, J.M. Gicquel, B. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on Mycobacteria. *J. Bacteriol*. **178** : 1197-1199.

Perry, J., Koteva, K., Wright, G. (2011) Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol. BioSyst.* **7** : 1388-1398.

Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., Bartels, D. (1990) Characterization of Five Abscisic Acid-Responsive cDNA Clones Isolated from the Desiccation-Tolerant Plant *Craterostigma plantagineum* and Their Relationship to Other Water-Stress Genes. *Plant Physiol*. **94**(4):1682-8.

Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. **124**: 715-727.

Poplawsky, A. R., S. C. Urban, and W. Chun. 2000. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**:5123–5127.

Powell, A.A., and Matthews, S. (1978). Damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* **29**: 1215-1229.

Powell, A.A., and Matthews, S. (1981). A physical explanation for solute leakage from dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* **32**: 1045-1050.

Proft, M., and Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*. **118**: 351-61.

Pusey, PL. (2000) The role of water in epiphytic colonization and infection pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. **90**: 1352-1357.

-Q-

Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B.L., Zeng, S., Gu, W.Y.,

Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L., and He, C. (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* **15**: 757-767.

Qian, W., Han, Z.-J., Tao J., He C. (2008a) Genome-Scale Mutagenesis and Phenotypic Characterization of Two-Component Signal Transduction Systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913, *Molecular Plant Microbes Interactions*, **8**, 1128–1138.

Qian, W., Han, Z.-J., He C. (2008b) Two-Component Signal Transduction Systems of *Xanthomonas* spp.: A Lesson from Genomics, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 151–161.

-R-

Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., and Sonti, R.V. (1997) The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* **415**: 125-128.

Rajeshwari, R., Jha, G., Sonti, R.V. (2005) Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**: 830-837.

Ramanjulu, S. and Bartels, D. (2002) Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants, *Plant Cell and Environment*. **25**: 141-151.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2000) Biologie végétale. Eds De Boeck Université, Paris.

Rinne, PLH., Kaikuranta, PLM., van der Plas, LHW., van der Shoot, C. (1999) Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*, **209**: 377-388.

Rodríguez G. (2007) Lecture Notes on Generalized Linear Models. [<http://data.princeton.edu/wws509/notes/>].

Rodriguez-R, L.M., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M.L., Salazar, C., Restrepo, S., Bernal, A. (2012) Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiology*, **12**:43.

Roper, M.C., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Kirkpatrick, B.C. (2007) Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol.* **73**(22): 7252-8.

Rossier, O., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology*. **38**(4), 828 - 838

Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. *St Paul*.

Rouxel T, Balesdent MH. (2005) The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic. *Mol Plant Pathol.* 1;6(3):225-41.

Ryan, R-P., Dow, J-M., (2011) Communication with a growing family : diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria, *Trends in Microbiology.* **19:** 145-152.

-S-

Saddler, G.S. and Bradbury, J.F. (2005) Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* second édition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), G.M Garrity, D.J Brenner, N.R Krieg, J.T Staleyeds (Springer, New York), 63-90.

Saldías, M.S., Lamothe, J., Wu, R., Valvano, M.A. (2008) *Burkholderia cenocepacia* requires the RpoN sigma factor for biofilm formation and intracellular trafficking within macrophages. *Infect Immun.* **76**(3):1059-67.

Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol- induced stress. *Biochim Biophys Acta*, **1463**, 267–278.

Saito, H., and Tatebayashi, K. (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem.* **136**(3):267-72.

Sanda S, John M, Amasino R (1997) Analysis of flowering time in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *J Hered.* **88**(1):69-72.

Sang, S., Li, X., Gao, R., You, Z., Lü, B., Liu, P., Ma, Q., Dong, H. (2012) Apoplastic and cytoplasmic location of harpin protein Hpa1(Xoo) plays different roles in H₂O₂ generation and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* **79**(4-5):375-91.

Saslowsky, D.E., Dana, C.D., Winkel-Shirley, B. (2000). An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene*, **255** : 127-138.

Satoh, S. (2006) Organic substances in xylem sap delivered to above-ground organs by the roots. *J Plant Res.* **119**(3):179-87.

Schaad, N.W., Dianese, J.C. (1981). Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology.* **71:** 1215-1220.

Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S. (2007) Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J.* **6**(1):73-81.

Schauer, K., Rodionov, AD., de Reuse, H. (2008) New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? *Trends in Biochemical Sciences.* **33**(7):330-8.

Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* **61:** 263-289.

- Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Hirt, H.** (2008) The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One*. **28**;3(5):e2279.
- Schoonbeek, H. J., J. M. Raaijmakers, De Waard, M.A.** (2002). Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Mol Plant Microbe Interact*. **15**(11): 1165-1172.
- Schreiberova, O., Hedbavna, P., Cejkova, A., Jirku, V., Masak, J.** (2012) Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. *New Biotechnology*, article in press.
- Schultz, T., and Gabrielson, R.** (1986) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Western Washington crucifer seed fields: occurrence and survival. *Phytopathology*. 1306-1309.
- Schwinn, F.J.** (1994) Seed treatment - A panacea for plant protection? In: Seed treatment: Progress and Prospects Mono. 57, BCPC, ThorntonHealth, UK.
- Sellam A, Poupard P, Simoneau P** (2006) Molecular cloning of AbGst1 encoding a glutathione transferase differentially expressed during exposure of *Alternaria brassicicola* to isothiocyanates. *FEMS Microbiol Lett*; 258(2):241-249.
- Sellam A, Iacomi-Vasilescu B, Hudhomme P, Simoneau P** (2007a) *In vitro* antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. *Plant Pathol*. **56**:296–301.
- Sellam, A., Dongo, A., Guillemette, T., Hudhomme, P., Simoneau, P.** (2007b) Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology*. **8**(2): 195-208.
- Shao M, Wang J, Dean RA, Lin Y, Gao X, Hu S.** (2008) Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J*. 6(1):73-81.
- Skerker JM, Berg HC.** (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(12):6901-4.
- Skoric, V.** (1927) Bacterial blight of pea: overwintering, dissemination and pathological histology. *Phytopathology*. **17**: 611-628.
- Simpson, R., and Johnson, L.J.** (1990) *Arabidopsis thaliana* as a host for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Microbe Interact*. **3**: 233-237.
- Singh, D. and Mathur, S.B.** (2004) Histopathology of Seed-Borne Infections. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 100-163.
- Slater, H.** (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol*. **38**: 986–1003.

Srivastava, A., Ohm, R.A., Oxiles, L., Brooks, F., Lawrence, C.B., Grigoriev, I.V., Cho, Y. (2012) A zinc finger family transcription factor *AbVf19* is required for the induction of a gene subset important for the induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Microbe Interact.* **25**: 443–452.

Skerker, J. M., Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **98**: 6901-6904.

Skoric, V. (1927) Bacterial blight of pea: overwintering, dissemination, and pathological histology. *Phytopathology.* **17**, 611-627.

Springer, M.L., Yanofsky, C. (1992) Expression of *con* genes along the 3 sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, **6**, 1052-1057.

Stacy, R. A. P. and R. B. Aalen (1998). "Identification of Sequence Homology Between the Internal Hydrophilic Repeated Motifs of Group 1 Late-Embryogenesis-Abundant Proteins in Plants and Hydrophilic Repeats of the General Stress Protein GsiB of *Bacillus subtilis*." *Planta* (Berlin) **206**(3): 476-478.

Stefanato, F.L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C.G., Métraux, J.P., Schoonbeek, H.J. (2009). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **58**(3): 499-510.

Sutherland, I.W. (1983) Extracellular polysaccharides, pp. 533-574. In: Biotechnology, vol 3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

Swings, J.G., Vauterium L., Kersters K. (1993) The bacterium *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, pp. 121-156.

-T-

Tamuran K, Peterson D, Peterson N, Stechern G, Nein M, Kumarn S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* *Mol Biol Evol.* **28**(10):2731-9.

Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* **10**(3):512-26.

Tans-Kerten, J., Huang, H. C., Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* **183**: 3597-3605.

Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol.* **163**:547–561.

Taylor, J.D., Dudley, C.L., Presly, L. (1979) Studies of halo-blight seed infection and

disease transmission in dwarf beans. *Annals of applied Biology*. **93**: 267-277.

Teyssier, L. (2012) Déterminants moléculaires du pouvoir pathogène d'*Alternaria brassicicola* lors de son interaction avec les Brassicacées : production de la brassicoline A et détoxification de la brassinine. Rapport de Master 2.

Thomma, B. P., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W.F. (1999). "Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **19**(2): 163-171.

Thomma, B.P, Cammue, B.P., Thevissen, K. (2003) Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr Drug Targets Infect Disord.* **3**(1):1-8.

Tierens, K.F., Thomma, B.P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P., Broekaert, W.T. (2001) Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiol.* **125**: 1688-1699.

Torres, PS, Malamud, F, Rigano, LA, Russo, DM, Marano, MR, Castagnaro, AP, Zorreguieta, A, Bouarab, K, Dow, JM, Vojnov, AA. (2007) Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol.* **9**(8):2101-9.

Treutter D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental chemistry Letters.* **4**: 147-157.

Truernit, E., and Haseloff, J. (2008) A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods,* **4**:15.

Tunnacliffe, A, and Wise, M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften.* **94**(10):791-812.

-U-

Updegraff EP, Zhao F, Preuss D. (2009) The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sex Plant Reprod.* **22**(3):197-204.

Urban, M., T. Bhargava, Hamer, J.E. (1999). An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**(3): 512-521.

-V-

Van Der Wolf, J. M., and Van Der Zouwen, P.S. (2010) Colonization of Cauliflower Blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via Flies (*Calliphora vomitoria*) Can Result in Seed Infestation. *Journal of Phytopath.* **158** : 726–732.

Van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A., Alfano, J. R. (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from

Pseudomonas syringae pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J. Bacteriol.* **181**: 4790-4797.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol.* **45**: 472-489.

Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology.* **90**(7):677-82.

Verona, O. (1958). La spermosphere. *Ann Inst Pasteur (Paris)*; **95**: 795-803.

Vertucci, C.W., Roos, E.E., Crane J. (1994) Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. *Ann. Bot.* **74** : 531-540.

Vertucci, C.W., and Leopold, A.C. (1987) Water Binding in Legume Seeds. *Plant Physiol.* **85**: 224-231

Vivian, A., Arnold, D. L. (2000). Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J. Plant Pathol.* **82**: 163-178.

Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbiol. Genetics Bulletin.* **13**: 42-43.

Volker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Volker, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker (1994). Analysis of the Induction of General Stress Proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **140**(4): 741-752.

Vorholter, F.J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V.K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S.A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K., and Puhler, A. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol.* **134**: 33-45.

-W-

Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C. (2003). Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology*; **93**: 528-534.

Walkey, D. (1991) Applied Plant Virology. 2nd edition. Chapman and Hall, London.

Walton JD, (1994) Deconstructing the plant cell wall. *Plant Physiol.* **104**: 1113-1118.

Wang X, Li M, Zhang J, Zhang Y, Zhang G, Wang J. (2007) Identification of a key functional region in **harpins** from *Xanthomonas* that suppresses protein aggregation and mediates harpin expression in *E. coli*. *Mol Biol Rep.* **34**(3): 189-98.

Wartenberg D, Vödisch M, Kniemeyer O, Albrecht-Eckardt D, Scherlach K, Winkler R, Weide M, Brakhage AA. (2012) Proteome analysis of the farnesol-induced

stress response in *Aspergillus nidulans* - The role of a putative dehydrin. *J Proteomics*. **75**(13):4038-49.

Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679.

Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and Koebnik. R. (2005) The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**: 2458–2468.

Weller, D.M., and Saettler, A.W. (1980) Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology*. **70**:148-152.

Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A., Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*; **257**: 85- 88.

Wengelnik, K., Bonas, U. (1996). *HrpXv*, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **178**: 3462-3469.

Wengelnik, K., and Bonas, U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol.* **178**: 3462-3469.

White, F.F., Potnis, N., Jones J.B., Koebnik, R. (2006) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*. **10**(6) : 749–766.

Whiteworth, D.E. & Cock, P.J.A. (2009). Evolution of prokaryotic two-component systems: insights from comparative genomics. *Amino Acids*. **37**: 459-466.

Wiener, M-C., (2005) TonB-dependent outer membrane transport : going to Baroque ?, *Current Opinion in Structural Biology*, **15** : 394-400.

Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., Lloyd, A.M. (2000) *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J.* **22**:483-493.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* **270**(1):41-9.

Wise, MJ. (2003) LEAPing to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*. **29**;4:52.

Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X-M., Griffith, M. (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, **105**, 600-608.

Wolfe, A.J., Millikan, D.S., Campbell, J.M., Visick, K.L. (2004) *Vibrio fischeri* sigma54 controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl Environ Microbiol.*

70(4):2520-4.

Wong Sak Hoi J, Lamarre C, Beau R, Meneau I, Berepiki A, Barre A, Mellado E, Read ND, Latgé JP. (2011) A novel family of dehydrin-like proteins is involved in stress response in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Biol Cell.* **22**(11):1896-906.

Wong Sak Hoi J, Beau R, Latgé JP. (2012) A novel dehydrin-like protein from *Aspergillus fumigatus* regulates freezing tolerance. *Fungal Genet Biol.* **49**(3):210-6.

-X-

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., Wu, R. (1996) Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* **110**(1):249-257.

Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, He YQ, Lu GT, Tang DJ, Vasse J, Arlat M, Tang JL. (2008) AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol.* **190**(1):343-55.

-Y-

Yang, T.C., Leu, Y.W., Chang-Chien, H.C., Hu, RM. (2009) Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. *J Bacteriol.* **191**(7):2266-75.

Yao, C., and Köller, W. (1995) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 122-130.

Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., Tanaka, C. (2005) Group III Histidine Kinase Is a Positive Regulator of Hog1-Type Mitogen-Activated Protein Kinase in Filamentous Fungi. *Eukaryot Cell.* **4**(11): 1820–1828.

Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G. & Robbs, C.F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**: 153-177.

Yu, J.H., Hamari, Z., Han, KH. Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y., Scazzochio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 973-981.

-Z-

Zhang, Y., Callaway, E.M., Jones, J.B., Wilson, M. (2009) Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur J Plant Pathol.* **124**:379–

Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z., Gao, X., Liu, F., Shao, M. (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J. Exp. Bot.* **62**(12):4229-38.

Zhao, J., C. C. Williams, Last, R.L. (1998). Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell.* **10**(3): 359-370.

Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., Mengiste, T. (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* **48**(4): 592-605.

Zhou, J.M., and Chai, J. (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 179-185.

Zhu, W., MaGbanua, M. M., White, F. F. (2000). Identification of Two Novel *hrp*-Associated Genes in the *hrp* Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* **182**: 1844-1853.

