



**HAL**  
open science

# Recherche de supresseurs de la toxicité induite chez *Arabidopsis thaliana* par l'effecteur de type 3 DspA/E et étude du stress oxydant au cours de l'infection

Alban Launay

► **To cite this version:**

Alban Launay. Recherche de supresseurs de la toxicité induite chez *Arabidopsis thaliana* par l'effecteur de type 3 DspA/E et étude du stress oxydant au cours de l'infection. Biologie végétale. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT: 2014PA112081 . tel-01063409

**HAL Id: tel-01063409**

**<https://theses.hal.science/tel-01063409v1>**

Submitted on 12 Sep 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.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL  
Institut Jean-Pierre BOURGIN-UMR 1318

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

**THÈSE DE DOCTORAT**

Soutenance prévue le 23/05/2014

par

**Alban LAUNAY**

Recherche de suppresseurs de la toxicité induite chez  
*Arabidopsis thaliana* par l'effecteur de type 3 DspA/E  
et étude du stress oxydant au cours de l'infection

**Composition du jury :**

*Directrice de thèse :*

*Rapporteurs :*

*Examineurs :*

Mathilde FAGARD

Françoise SIMON-PLAS

Alexandre DEGRAVE

Michael HODGES

Jacqui SHYKOFF

Chargée de recherche, INRA, IJPB-Versailles

Directrice de recherche, INRA, AGROECOLOGIE-Dijon

Maître de conférence, Agrocampus-Ouest, IRHS-Angers

Directeur de recherche, CNRS, IBP-Orsay

Directrice de recherche, CNRS, ESE-Orsay





Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL  
Institut Jean-Pierre BOURGIN-UMR 1318

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

**THÈSE DE DOCTORAT**

Soutenance prévue le 23/05/2014

par

**Alban LAUNAY**

Recherche de suppresseurs de la toxicité induite chez  
*Arabidopsis thaliana* par l'effecteur de type 3 DspA/E  
et étude du stress oxydant au cours de l'infection

**Composition du jury :**

*Directrice de thèse :*

*Rapporteurs :*

*Examineurs :*

Mathilde FAGARD

Françoise SIMON-PLAS

Alexandre DEGRAVE

Michael HODGES

Jacqui SHYKOFF

Chargée de recherche, INRA, IJPB-Versailles

Directrice de recherche, INRA, AGROECOLOGIE-Dijon

Maître de conférence, Agrocampus-Ouest, IRHS-Angers

Directeur de recherche, CNRS, IBP-Orsay

Directrice de recherche, CNRS, ESE-Orsay



*«Pascal a fait remarquer, dans une métaphore planétaire, que la connaissance est comme une sphère dans l'espace : plus on apprend, c'est-à-dire plus la sphère est grosse, plus on est en contact avec l'inconnu (la surface de la planète). C'est vrai. Mais n'oublions pas le principe des surfaces et des volumes. Plus la sphère est grosse, plus le rapport du connu (volume) à l'inconnu (surface) est élevé. Souhaitons que l'accroissement de l'ignorance continue à se développer dans ce rapport à l'accroissement de la connaissance. »*

*Stephen Jay Gould, Darwin et les grandes énigmes de la vie*



## Remerciements

Nous y voici, trois années et demie de recherches effectuées sur le facteur responsable de la maladie m'empêchant de consommer l'une de mes boissons favorites, le cidre. C'est un comble! Ce fut plus de trois années intenses où l'on s'engage à prendre un ascenseur émotionnel qui vous conduit aux étages de la découverte de nouveaux concepts, de nouvelles idées, de nouvelles expériences et surtout à de nombreuses rencontres. En parlant de cela justement, je ne puis commencer ce manuscrit sans remercier toutes ces personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la construction de ce manuscrit.

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury qui apportent la dernière pierre à mes travaux. Merci à Françoise Simon-Plas et Susana Rivas d'avoir accepté d'être mes rapporteuses. Merci à Michael Hodges d'avoir accepté d'être examinateur et surtout pour notre collaboration au sujet de la glycolate oxydase. Merci à Jacqui Shykoff d'avoir accepté d'être à la présidence de mon jury et surtout pour ton rôle à la tête de l'école doctorale et ta réactivité pour répondre à mes questions administratives!

Un très grand merci à Mathilde Fagard pour son encadrement plein d'énergie, pour ses nombreux conseils, ses idées (à foison!) et surtout pour m'avoir amené jusqu'au bout de cette thèse et remis sur le droit chemin lorsque je m'égarais. Vraiment un grand merci.

Merci aux membres de comité de thèse qui m'ont apporté leur aide pour la suite de mon projet. Merci donc à Jean-Denis Faure, Marie Garmier et un merci spécial à Marianne Delarue pour ta présence et ton rôle de conseillère aux thèses.

Bien que j'aie atterri à Versailles en cours de thèse, je ne puis oublier les membres du Laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes (ou la Patho pour les intimes) en commençant par Dominique Expert. Je te remercie pour l'intérêt que tu as porté et que tu portes aux étudiants, aux nombreuses discussions et surtout pour la relecture avisée de ce manuscrit. Un grand merci à Lucia Pincemail qui n'avait aucun secret pour les méandres administratifs des fournisseurs, des instituts, des facs, etc... (J'ai notamment appris que j'étais un PEPS pour l'INRA, incroyable n'est-ce pas?). Un grand merci à Roberto Garcia pour la conspiration des politiques, pour ces pauses déjeuné en rire et tout un tas de situations invraisemblables. Un grand merci également à Régine Vedel qui est partie du labo pour une retraite bien méritée. Merci à toi pour mon apprentissage des bases de la biologie moléculaire et la culture *in vitro* et surtout pour ces histoires de gueuletons que tu affectionnais tant. Un super-spécial-merci à Oriane Patrit de m'avoir donné goût à la microscopie, merci pour ta rigueur et ton enthousiasme. Merci à Thierry Franza pour « To be or not to be » de Ernst Lubitsch et à tes nombreuses contrepèteries et blagues que je ne puis écrire ici. Merci à Marie-Christine Soulié qui est venue sur Versailles aussi. Merci pour ta bonne humeur, ton rire communicatif et surtout pour la relecture de mon intro. Merci à Alia Dellagi avec qui j'ai partagé le même bureau pendant les six derniers mois, merci pour tes conseils, les dates et les gâteaux. Spéciale dédicace à Martine Rigault avec qui j'ai partagé le bureau à l'Agro, merci pour tes conseils en qPCR, merci pour les découvertes musicales et nos discussions. Hé oui, encore un ptit jeune qui s'en va (Foutue époque!). Et pour terminer les remerciements de la Patho, je fais une spéciale dédicace à Aude Aznar thésarde de son état avec



qui j'ai commencé le M2, la thèse et avec qui je vais terminer. Mine de rien, on a fait fort, soutenance de M2 à deux jours d'intervalle et pareillement pour la soutenance de thèse. J'aimerais te remercier pour ces pintes du vendredi soir, pour les playlists musicales (avec les grands classiques simples mais efficaces) à l'époque où l'on partageait le même bureau. J'aimerais aussi te remercier pour ces coucous passés « juste comme ça » entre ta cave et mon grenier du bâtiment 3 à Versailles. Bonne continuation à toi l'Epiniacaise!

Durant ces trois années de travail de thèse, je ne puis oublier de remercier tous les stagiaires qui ont apporté leur contribution au sujet *A. thaliana/E. amylovora* et que j'ai l'opportunité d'encadrer. Merci donc à Stéphanie Quercy, Alexandra Mai, Aude Maugarny, Quentin Clément, François Maginiot, Marion Lebris et Jeoren Stellingwerf.

Au cours de la thèse, j'ai également fait la rencontre d'un grand nombre de thésards que je tiens à remercier pour les nombreuses discussions scientifiques mais pas uniquement. Je remercie particulièrement Adrien François dit « Chouchou » pour ces nombreuses pintes à la taverne et à bien d'autres endroits. Merci à Fabrice Requier pour nous avoir convié à sa maison sur l'île de Ré avec Stella Césari, Caroline Monteil et « Chouchou ». Merci à vous tous pour ces jours et les journées du département SPE. Merci à Justine Fromentin amie de longue date. Merci pour ton accueil dans cette belle ville qu'est Toulouse. Merci à Younès Dello pour les manip d'activité glycolate oxydase. Merci à Chloé Girard pour son Peps! Merci aux thésards Versaillais pour ces soirées, ces O'pintes et ces virées.

Puisque je suis sur Versailles, j'en profite pour remercier un grand nombre de personnes. Merci aux serristes Joël Talbotec, Bruno Letarnec et Hervé Ferry qui ont bichonné mes petites plantes. Merci à Yannick Bellec pour les dosages de LCBs et à Gilles Clément pour le dosage des métabolites. Merci aux gars du magasin Sébastien Laurent et Jérôme Basille. Je ne puis oublier Vanessa Pacé qui est d'une grande réactivité sur la gestion de nos questions administratives. Personnes du bâtiment 3, je ne vous ai pas oublié! Merci à Rozenn Le Hir pour la formation protoplastes et confocal. Je pense à Marie-Jeanne Sellier que je remercie pour ces conseils sur la mise en page et le remplissage de dossier de candidature. Ceci m'amène à remercier Akira Suzuki qui m'a toujours demandé si ça allait. Je fais une petite dédicace à Julia Courtial pour ton originalité et ton enthousiasme (j'ai comme une drôle de musique dans la tête...). Merci à vous tous, personnes du bâtiment 3, que je ne cite pas de peur d'en oublier!

Je tiens enfin à terminer avec les remerciements spéciaux. Je commence par toi Laure David. Tu m'as apporté un soutien indispensable qui m'a évité de tourner en bourrique. Tu m'as également permis de cultiver un certain grain de folie qui m'a fait maintenir le cap jusqu'au bout. Sans toi, cela aurait été assez difficile! Un énorme merci à toi. Merci à mes parents et à ma sœur, pour votre présence, votre soutien et ces repas familiaux copieux mais tellement chaleureux. Merci à la Gnou Team (Adrien Couradette, Christophe Villemot, Gilles Fleuret, Vincent Fleuret, Fabien Claes, Erwann Giffault et Hélène André), une bonne vieille et fine équipe! Merci à tous!

<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>VII</b>
<b>PRESENTATION .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. LA PLANTE DANS SON ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>7</b>
1. Les facteurs abiotiques .....	7
1.1 L'énergie lumineuse.....	7
1.2 La température .....	7
1.3 L'hygrométrie .....	8
1.4 Les échanges gazeux.....	8
1.5 Les éléments minéraux .....	8
1.6 Les polluants .....	9
2. Les facteurs biotiques .....	9
2.1 Cas des virus .....	13
2.2 Cas des champignons et oomycètes .....	13
2.3 Cas des bactéries.....	15
2.4 Le SST3 un complexe structuré et régulé .....	19
2.2 Les effecteurs de type 3 : Des facteurs de virulence majeurs .....	21
<b>II. LES DEFENSES DES PLANTES ET LEURS INTERACTIONS AVEC LES AGENTS</b>	
<b>PATHOGENES .....</b>	<b>24</b>
1. Les défenses préformées.....	25
1.1 Les barrières physiques.....	25
1.2 Les barrières chimiques .....	25
2. L'immunité basale chez les végétaux .....	26
2.1 Activation de la PTI par les PAMPs .....	26
2.1.1 Les PAMPs/MAMPs .....	26
2.1.2 Reconnaissance des PAMPs .....	29
2.1.3 Les défenses induites .....	33
2.1.3.1 Flux d'ions .....	33
2.1.3.2 Les formes actives de l'oxygène et le NO.....	33
2.1.3.3 Les phytohormones.....	35
2.1.3.4 Les lipides .....	39
2.1.3.5 Signalisation par les MAPK.....	40
2.1.3.6 Les facteurs de transcription de type WRKY .....	41
2.1.3.7 Les phytoalexines.....	43
2.1.3.8 Les protéines PR .....	43
2.2 Contournement de la défense induite par les PAMPs .....	45
3. L'immunité spécifique .....	47
3.1 Le modèle gène à gène.....	47
3.2 Reconnaissance de l'interaction.....	47
3.2.1 Les protéines de résistance .....	47
3.2.2 Reconnaissance par interaction directe.....	49
3.2.3 Reconnaissance indirecte.....	51
3.2.3.1 Le modèle de garde .....	51
3.2.3.2 Le modèle du leurre .....	51
3.3 Défenses déclenchées par l'ETI.....	55
3.4 Contournement de l'immunité spécifique .....	57
3.4.1 Suppression de l'ETI par les effecteurs .....	59

3.5	La résistance non-hôte, une résistance efficace .....	59
<b>IV.</b>	<b>ERWINIA AMYLOVORA .....</b>	<b>63</b>
1.	Le feu bactérien .....	63
2.	Cycle de la maladie .....	63
2.2	Méthodes de lutte .....	65
2.2.1	Pratiques culturales .....	65
2.2.2	Lutte chimique .....	65
2.2.3	Lutte biologique .....	66
2.2.4	Lutte génétique .....	67
3.	Etude de la diversité d' <i>E. amylovora</i> .....	67
4.	Le génome d' <i>E. amylovora</i> .....	69
5.	Les facteurs du pouvoir pathogène .....	71
5.1	Le système d'acquisition du fer et le stress oxydatif .....	73
5.1	L'amylovorane .....	75
5.2	Le système de sécrétion de type III (SSTT) .....	75
5.3	Les effecteurs de type III d' <i>E. amylovora</i> .....	75
5.3.1	La harpine HrpN .....	75
5.3.2	La harpine HrpW .....	76
5.3.3	L'effecteur DspA/E .....	76
5.3.4	Autres effecteurs .....	78
5.4	Autres facteurs de virulence .....	78
6.	L'interaction entre <i>A. thaliana</i> et <i>E. amylovora</i> : Un modèle pour étudier le rôle de DspA/E .....	78
6.1	La multiplication transitoire d' <i>E. amylovora</i> dépend du SSTT .....	79
6.2	Identification de régulateurs de la résistance non-hôte .....	79
6.3	DspA/E est indispensable pour la survie d' <i>E. amylovora</i> chez <i>A. thaliana</i> .....	80
	<b>OBJECTIFS ET PRESENTATION GENERALE .....</b>	<b>81</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>83</b>
	<b>CHAPITRE I : CARACTERISATION DE LIGNEES D'ARABIDOPSIS THALIANA EXPRIMANT L'EFFECTEUR DE TYPE 3 DSPA/E.....</b>	<b>84</b>
	<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>84</b>
	<b>II. DEMARCHE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>84</b>
	<b>III. ARTICLE: THE BACTERIAL EFFECTOR DSPA/E IS TOXIC IN ARABIDOPSIS THALIANA AND IS REQUIRED FOR MULTIPLICATION AND SURVIVAL OF FIRE BLIGHT PATHOGEN .....</b>	<b>85</b>
	<b>CHAPITRE II : RECHERCHE DE SUPPRESSEURS DE LA TOXICITE INDUITE PAR DSPA/E .....</b>	<b>117</b>
	<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>117</b>
	<b>II. DEMARCHE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>117</b>
	<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>121</b>
1.	Analyse génétique des supresseurs .....	121
1.1	Analyse de ségrégation .....	121
1.2	Complémentation fonctionnelle .....	121
2.	Phénotype des mutants supresseurs .....	123
3.	Stratégie de séquençage des supresseurs .....	127

4. La glycolate oxydase est requise pour l'activation de certaines défenses chez <i>A. thaliana</i> contre <i>E. amylovora</i> .....	139
5. L'activité de la glycolate oxydase 2 est requise pour la toxicité de DspA/E .....	143
6. Discussion .....	145
<b>CHAPITRE III : ROLE DU STRESS OXYDANT PENDANT L'INFECTION .....</b>	<b>153</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>153</b>
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>155</b>
1. Phénotype d'accumulation des FAOs chez <i>A. thaliana</i> en réponse à <i>E. amylovora</i> .....	155
2. Rôle du gène <i>AtrbohD</i> au cours de l'interaction entre <i>E. amylovora</i> et <i>A. thaliana</i> .....	157
3. Le traitement à la catalase limite la croissance d' <i>E. amylovora in planta</i> .....	159
4. Accumulation d' $H_2O_2$ et d' $O_2^-$ en réponse au mutant <i>dspA/E</i> .....	161
5. Rôle du gène <i>AtrbohD</i> sur la toxicité de DspA/E.....	167
6. Discussion .....	168
<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....</b>	<b>175</b>
<b>I. DSPA/E N'A PAS D'EFFET SUR LA VOIE DES SPHINGOLIPIDES .....</b>	<b>177</b>
<b>II. LA GLYCOLATE OXYDASE 2 EST PEROXYSSOMALE.....</b>	<b>177</b>
<b>III. E. AMYLOVORA MODULE L'ACCUMULATION DE PLUSIEURS METABOLITES DEPENDAMMENT ET INDEPENDAMMENT DE DSPA/E .....</b>	<b>181</b>
<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>182</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>187</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>197</b>
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE. ....</b>	<b>198</b>
1. Matériel végétal .....	198
2. Conditions de culture.....	198
3. Souches bactérienne .....	198
<b>II. METHODES .....</b>	<b>199</b>
1. Méthodes d'infections .....	199
2. Comptage bactérien .....	199
3. Méthodes de biologie moléculaire.....	199
3.1 Génotypage .....	199
3.2 Extraction ADN nucléaire au CTAB .....	200
3.3 Extraction et dosage d'ARN .....	200
3.4 PCR quantitative (qPCR) .....	201
3.5 Clonage du gène <i>GOX2</i> en Gateway.....	202
3.6 Isolement et transformation des protoplastes .....	203
3.7 Isolement des supresseurs sans DspA/E .....	204
4. Méthodes de biochimie .....	204
4.1 Incorporation à la méthionine $^{35}S$ .....	204
4.2 Déposition de callose .....	204
4.3 Mesure de l'activité glycolate oxydase.....	204
4.4 Mesure des sphingolipides totaux .....	205
4.5 Dosage des métabolites .....	205
5. Mesure du stress oxydant .....	205

5.1	Marquage de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ à la 3,3'-DiAminoBenzidine (DAB) .....	205
5.2	Marquage à la 2',7'- Dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) .....	206
5.3	Marquage de l' $\text{O}_2^-$ au NitroBlueTétrazolium .....	206
5.4	Marquage de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ au chlorure de cérium et préparation des échantillons pour les observations au microscope électronique.....	206
6.	Analyses statistiques.....	207
7.	Alignements de séquences.....	207
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>211</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>239</b>

## Liste des figures et tableaux (hors article)

Figure 1: Les facteurs en interaction avec la plante .....	6
Figure 2: Exemples de stratégies de virulence des agents pathogènes.....	12
Figure 3: Comparaison entre le système de sécrétion de type 3 et le flagelle bactérien .....	18
Figure 4: Domaines des effecteurs de type 3.....	20
Figure 5: Récepteurs des PAMPs et DAMPs .....	28
Figure 6: Modèle d'activation du complexe FLS2/BAK1 .....	30
Figure 7: Schématisation des défenses induites par les PAMPs/DAMPs .....	32
Figure 8: Origine des FAOs produites par la cellule végétale.....	34
Figure 9: Représentation schématique de la perception du SA .....	36
Figure 10: Contournement de la défense induite par les PAMPs.....	44
Figure 11: Le modèle de Flor (ou modèle gène-à-gène) .....	46
Figure 12: Structure des protéines de résistance R.....	46
Figure 13: Reconnaissance par interaction directe entre une protéine R et Avr .....	48
Figure 14: Reconnaissance indirecte entre une protéine R et Avr. Cas des modèles de garde et du leurre.....	50
Figure 15: Rôle de l'effecteur AvrBs3 de la bactérie <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	52
Figure 16: Différences et similarités entre PTI et ETI .....	54
Figure 17: Le modèle en « zig-zag » .....	56
Figure 18: Suppression de l'ETI par les effecteurs .....	58
Figure 19: La résistance non-hôte, une résistance multi-couches .....	60
Figure 20: Cycle du feu bactérien des Pyroïdeae .....	62
Figure 21: Symptômes du feu bactérien.....	64
Figure 22: Cluster hrp/dsp d' <i>E. amylovora</i> .....	68
Figure 23: Facteurs du pouvoir pathogène d' <i>E. amylovora</i> .....	70
Figure 24: Système d'acquisition du fer chez <i>E. amylovora</i> .....	72
Figure 25: Importance de l'amylovorane dans la colonisation des tissus par <i>E. amylovora</i> .....	74
Figure 26: Principe du criblage de mutants résistants à la toxicité induite par DspA/E.....	116
Figure 27: Catégories de mutants résistants putatifs .....	118
Figure 28: DspA/E est exprimé dans les mutants suppresseurs .....	118
Figure 29: Confirmation de la résistance à la toxicité de DspA/E du suppresseur <i>I-18-1</i> .....	120
Figure 30: Les suppresseurs appartiennent à deux groupes de complémentation différents.....	120
Figure 31: Phénotype des quatre suppresseurs .....	122
Figure 32: Tableau théorique des ségrégations des F2 issues du croisement suppresseur x Ler-0 .....	126
Figure 33: Phénotype de la F2 issue du croisement entre le suppresseur <i>I-40-1</i> et Ler-0.....	126
Figure 34: Phénotype du rétro-croisement en F1 et en F2 entre le suppresseur <i>I-18-1</i> et 13-1-2 .....	130
Figure 35: Profils des pics de SNPs obtenus pour les suppresseurs <i>I-18-1</i> , <i>I-40-1</i> et <i>II-36-1</i> .....	132
Figure 36: Profil des pics de SNPs obtenus pour le suppresseur <i>I-18-1</i> et comparaison avec le suppresseur <i>II-36-1</i> .....	134
Figure 37: Gène <i>GOX2</i> et position des mutations des suppresseurs <i>I-18-1</i> et <i>II-36-1</i> .....	134
Figure 38: Le suppresseur <i>I-18-1</i> et les mutants <i>gox2-1</i> et <i>gox2-2</i> sont alléliques et la mutation <i>gox2</i> supprime la toxicité de dspA/E.....	136
Figure 39: Le gène <i>GOX2</i> est requis pour les défenses non-hôte contre <i>E. amylovora</i> .....	138
Figure 40: L'activité glycolate oxydase est requise pour la toxicité de DspA/E.....	142
Figure 41: Hypothèses concernant la toxicité de DspA/E.....	144

Figure 42: DspA/E réprime l'accumulation d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire chez <i>A. thaliana</i> .....	152
Figure 43: Accumulation des FAOs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et O <sub>2</sub> <sup>-</sup> pendant l'infection avec <i>E. amylovora</i> .....	154
Figure 44: Le gène <i>AtrbohD</i> est requis pour la production de la FAO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mais pas l'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> et il limite l'intensité des symptômes.....	156
Figure 45: La catalase limite la croissance d' <i>E. amylovora in planta</i> .....	158
Figure 46: Analyse de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en réponse à un mutant <i>dspA/E</i> .....	160
Figure 47: l' H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> s'accumule dans différents compartiments cellulaires .....	162
Figure 48: DspA/E induit l'accumulation d' H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> apoplastique.....	164
Figure 49: La mutation <i>atrbohD</i> n'affecte pas la toxicité de DspA/E.....	166
Figure 50: Rôle du stress oxydant et hypothèses du rôle de DspA/E sur le stress oxydant au cours de l'interaction entre <i>A. thaliana</i> et <i>E. amylovora</i> .....	172
Figure 51: DspA/E ne réprime pas l'accumulation des acides gras à longue chaîne (LCBs) .....	176
Figure 52: La glycolate oxydase 2 est localisée dans les peroxysomes chez <i>A. thaliana</i> .....	176
Figure 53: Métabolites représentatifs pour chaque catégorie modulés par DspA/E et <i>E. amylovora</i> dans les supresseurs et le mutant <i>gox2-2</i> .....	180
Figure 54: Hypothèses concernant le rôle de DspA/E dans l'immunité chez <i>A. thaliana</i> .....	188
Figure 55: Hypothèses concernant les défenses multi-couches chez <i>A. thaliana</i> en réponse à <i>E. amylovora</i> .....	192
Figure 56: Lien entre la glycolate oxydase et le stress oxydant .....	194
Tableau 1: Exemple d'effecteurs dont le rôle a été décrit .....	22
Tableau 2: Liste des protéines PR et leur fonction.....	42
Annexe 1: Analyses des SNPs présents sur les autres chromosomes des supresseurs <i>I-18-1</i> , <i>I-40-1</i> et <i>II-36-1</i> .....	240
Annexe 2: Candidats potentiels présents dans la zone du pic de SNPs du supresseur <i>I-40-1</i> .....	241
Annexe 3: Exemple de confirmation par CAPS de la mutation dans le gène de la glycolate oxydase du supresseur <i>I-18-1</i> .....	242
Annexe 4: Hypothèse de l'effet de mutations sur la toxicité de DspA/E.....	243
Annexe 5: Liste des gènes du transcriptome d' <i>A. thaliana</i> en réponse à <i>E.amylovora</i> décrits comme modulés par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et l'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	244
Annexe 6: La catalase n'a pas d'effet sur <i>E. amylovora</i> .....	245
Annexe 7: La catalase induit la formation d'un stress oxydatif .....	246
Annexe 8: Métabolites modulés en réponse à <i>E. amylovora</i> dépendant ou non de DspA/E dans les supresseurs et Col-0.....	247
Annexe 9: Tableau des oligonucléotides utilisés dans cette étude .....	248
Annexe 10: Voies métaboliques modulées en réponse à <i>E. amylovora</i> et à DspA/E chez <i>A. thaliana</i> .....	252

## Liste des abréviations

<b>ABA</b>	Acide abscissique	<b>CNGC</b>	Cyclic Nucleotide-Gated Channels
<b>ACC 1-</b>	Amion-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase 1	<b>COI1</b>	COronatine Insensitive 1
<b>ACD</b>	Accelerated Cell Death	<b>COP9</b>	COonstitutiv Photomorphogenic 9
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>CPTIO</b>	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism	<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>AOS</b>	Allene Oxide Synthase	<b>CRN</b>	CRiNkler
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique	<b>CSN5</b>	COP9 Signalosome A5
<b>ARNm</b>	ARN messenger	<b>CTR1</b>	Constitutive Triple Response 1
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate	<b>CYP</b>	Cytochrome P
<b>ATPase</b>	Adénosine TriPhosPhatase	<b>DAB</b>	3,3'-DiAminoBenzidine
<b>Avr</b>	Avirulence	<b>DAMPs</b>	Damage Associated Molecular Patterns
<b>BAK1</b>	BRI1-Associated receptor Kinase 1	<b>DCFH-DA</b>	Dichlorofluorescéine diacétate
<b>BIK1</b>	Botrytis-Induced Kinase 1	<b>DFO</b>	DesFerriOxamine
<b>BR</b>	Brassinosteroid	<b>DIPM</b>	DspA/E Interringing Protein of Malus
<b>BRI1</b>	BRassinosteroid Insensitive 1	<b>DspA/E</b>	Disease Specific A/E
<b>BTH</b>	BenzoTHiadazole	<b>EDS</b>	Enhanced Disease Susceptibility
<b>CaM</b>	Calmodulin	<b>EFR</b>	EF-Tu Receptor
<b>CAPS</b>	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	<b>EF-Tu</b>	Elongation Factor-Thermo unstable
<b>CBD</b>	Chaperone-Binding Domain	<b>EIL</b>	Ethylene Insensitive Like
<b>CC-NBS-LRR</b>	Coil-Coiled Nucleotide-Binding Leucine-Rich-Repeat	<b>EIN</b>	Ethylene INsensitive
<b>CERK1</b>	Chitin Elicitor Receptor Kinase 1	<b>EMS</b>	Ethyl Methyl Sulfonate
<b>CFBP</b>	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes	<b>EPS</b>	ExoPolySaccharide
<b>CHX</b>	CycloHeXimide	<b>ERF</b>	Ethylene Response Factor
<b>CML</b>	Calmodulin-Like		



<b>ERS</b>	Ethylene Response Sensor	<b>JAZ</b>	JAsmonate ZIM domain protein
<b>ET</b>	Ethylène	<b>JMJ</b>	JuMonJi
<b>ETI</b>	Effector Triggered Immunity	<b>JMT</b>	Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase
<b>ETR</b>	Ethylene Response	<b>Kb</b>	Kilo Base
<b>ETS</b> Susceptibility	Effector Triggered	<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>FAO</b>	Formes Activées de l'Oxygène	<b>LCB</b>	Long Chain Base
<b>FBR11</b>	Fumonisin B1 Resistant 11	<b>LMM</b>	Lesion Mimic Mutant
<b>FLS2</b>	FLagelling Sensing 2	<b>LOH</b>	LAG One Homologue
<b>FMO</b>	Flavin MonoOxygenase	<b>LOX</b>	Lipoxygenase
<b>GA</b>	Gibberellic Acid	<b>LPS</b>	LipoPolySaccharide
<b>GA</b>	GlutarAldéhyde	<b>LRR</b>	Leucine Rich Repeat
<b>GEF</b>	Guanosine Exchange Factor	<b>MAB</b>	Marker Assisted Breeding
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein	<b>MAMPs</b>	Microbe Associated Molecular Patterns
<b>GOX</b>	Glycolate Oxidase	<b>MAPK</b>	Mitogen Associated Protein Kinase
<b>GST</b>	Glutathione-S-Tranférase	<b>MeJA</b>	Methyl Jasmonate
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène	<b>MKS1</b>	MAPK Substrate 1
<b>HDC</b>	Histone déacétylase	<b>MPa</b>	Mega Pascal
<b>HEL</b>	Hevein-Like	<b>MS</b>	Murashige and Skoog
<b>HeLa</b>	Henrietta Lacks	<b>MTF</b>	Mitochondrial Targeting Sequence
<b>HIPM</b> Malus	HrpN Interringing Protein of	<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>Hop</b>	Hrp Outer Protein	<b>NBT</b>	NitroBlue Tétrazolum
<b>HR</b>	Hypersensitive Response	<b>NIMIN1</b>	NIM1 Interacting 1
<b>Hrp</b> Pathogenicity	Hypersensitive Response and	<b>NLP</b>	NIN-Like Protein
<b>IAA</b>	Indole Acetic Acid (Auxine)	<b>NLS</b>	Nuclear Localisation Signal
<b>ICS1</b>	Isochorismate Synthase 1	<b>NO</b>	Nitric oxyde
<b>ISR</b>	Induced Systemic Resistance	<b>Nod</b>	Nodulation
<b>JA</b>	Jasmonic Acid	<b>NPR</b>	Non expresser of PR genes
<b>JA-Ile</b>	Jasmonic Acid Isoleucine	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ion superoxyde
<b>JAR1</b>	Jasmonate Resistant 1		

<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Ion peroxy nitrite	<b>RPP1</b>	Recognition of <i>Peronospora parasitica</i> 1
<b>OPDA</b>	Oxo-PhytoDienoic acid	<b>RRS1</b>	Resistant to <i>Ralstonia Solanacearum</i> 1
<b>ORF</b>	Open Reading Frame	<b>RTX</b>	Repeats in ToXin
<b>PAD4</b>	Phytoalexin Deficient 4	<b>SA</b>	Acide Salicylique
<b>PAI</b>	Pathogenicity Island	<b>SAG</b>	Salicylic Acid Beta-Glucoside
<b>PAMPs Patterns</b>	Pathogen associated Molecular	<b>SAM</b>	S-AdénosylMethionine Synthetase 1
<b>Pb</b>	Paire de bases	<b>SAR</b>	Systemic Acquired Resistance
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	<b>SCF</b>	Skp Cullin F-box containing complex
<b>PDF1.2</b>	Plant Defensine 1.2	<b>SiARN</b>	Short Interférant ARN
<b>PFA</b>	ParaFormAldéhyde	<b>SID2 (=ICS1)</b>	SA induction Deficient
<b>PGIP Protein</b>	PolyGalacturonase-Inhibiting	<b>SKP1</b>	S phase Kinase-Associated Protein 1
<b>PPR</b>	Pentatrico Peptide Repeat	<b>SNI1</b>	Suppressor of NPR1 Inducible 1
<b>PR</b>	Pathogenesis Related	<b>SNP</b>	Single Nucleotid Polymorphism
<b>PTI</b>	PAMP Triggered Immunity	<b>Sp.</b>	Species
<b>Pv.</b>	Pathovar	<b>SST1→6</b>	Système de sécrétion de type 1→6
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Loci	<b>TAL</b>	Transcription Activator Like
<b>RBPG1</b>	Response to Botrytis PolyGalacturonases 1	<b>TIR-NB-LRR</b>	Toll-Interleukin-1 Receptor Nucleotide-Binding Leucine-Rich-Repeat
<b>RDR</b>	RNA-dependent RNA polymerase	<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>RE</b>	Reticulum Endoplasmique	<b>UPA</b>	UP-regulated by AvrBs3
<b>RFP</b>	Red Fluorescent Protein	<b>VLCFA</b>	Very Long Chain Fatty Acid
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism	<b>VSP</b>	Vegetative Storage Protein
<b>RIN4</b>	RPM1 Interringing Protein 4	<b>Xcc</b>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>
<b>RISC</b>	RNA-Induced Silencing Complex	<b>Xcv</b>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>
<b>RLK</b>	Receptor Like Kinase	<b>Yop</b>	Yersinia Outer Protein
<b>RLP</b>	Receptor Like Protein		
<b>RNAi</b>	RNA Interférant		
<b>RPM1</b>	Resistance to <i>P.syringae</i> pv <i>Maculicola</i> 1		



## Présentation

Le projet *Arabidopsis thaliana/Erwinia amylovora* a démarré au laboratoire des Interactions Plantes Pathogènes, (UMR 217) dirigé par Dominique Expert jusqu'en 2012. Globalement, le problème biologique étudié concerne les mécanismes de l'effecteur de type III DspA/E, le facteur majeur du pouvoir pathogène de la bactérie phytopathogène *E. amylovora*. Alexandre Degrave, est le premier étudiant en thèse à avoir travaillé sur l'interaction d'*Erwinia amylovora* avec la plante non-hôte *Arabidopsis thaliana* d'octobre 2005 à juin 2009. Dans ce cadre, Alexandre Degrave a construit des lignées transgéniques permettant d'exprimer l'effecteur de manière contrôlée dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. C'est sur ces lignées que j'ai commencé mes travaux de thèse pendant mon stage de Master 2. J'ai recherché des protéines interagissant avec DspA/E et caractérisé le stress oxydant intervenant lors de cette interaction.

Mes travaux de thèse encadrés par Mathilde Fagard ont été financés grâce à une bourse du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche obtenue lors d'un concours organisé par l'école doctorale du gène à l'écosystème (ED145) de l'université Paris Sud 11. J'ai également bénéficié d'une prolongation de trois mois suite au déménagement de l'équipe sur le centre INRA de Versailles-Grignon. Au cours de ma thèse, j'ai contribué à la caractérisation des lignées transgéniques permettant d'exprimer DspA/E. En parallèle, j'ai travaillé sur des mutants de ces lignées, lesquels ont été sélectionnés pour la suppression de l'effet toxique de DspA/E afin de comprendre la fonction de cet effecteur dans la cellule végétale. J'ai également poursuivi l'étude du stress oxydant au cours de l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Erwinia amylovora*.



# **Introduction générale**



## Introduction générale

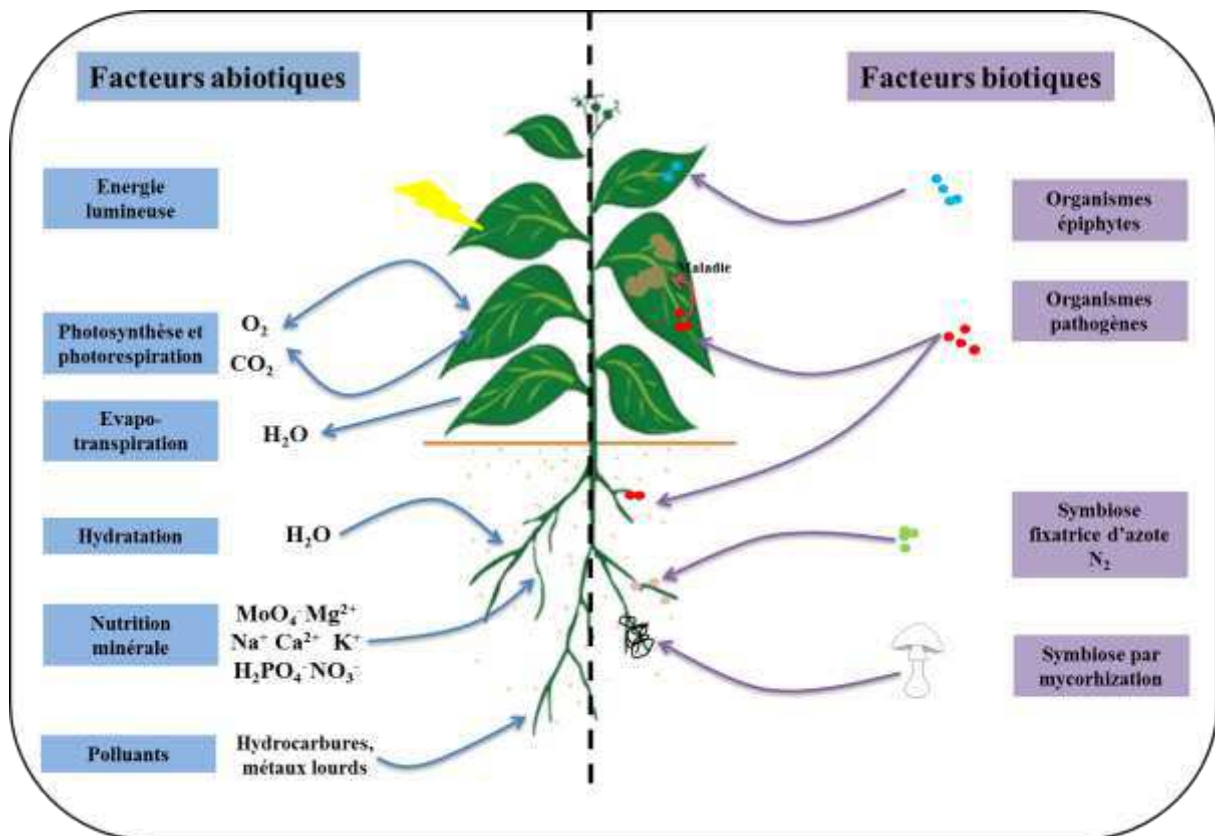
Je commencerai mon introduction par une présentation de la plante dans son environnement et des contraintes qui lui sont imposées d'une part par des facteurs abiotiques (température, lumière, nutriments, eau et métaux lourds) et d'autre part par des facteurs biotiques (virus, champignons, oomycètes, bactéries épiphytes, bactéries phytopathogènes nématodes et insectes ravageurs).

Dans un second temps, je décrirai les stratégies de virulence des agents pathogènes en couvrant 3 grands types d'agents pathogènes tels que les virus, puis les champignons, les oomycètes et enfin les stratégies employées par les bactéries. Puis je me focaliserai sur le cas des bactéries en détaillant notamment le rôle des effecteurs bactériens dans le contournement des défenses de la plante.

Dans une troisième partie, je m'intéresserai au contexte de la plante en décrivant l'immunité végétale. Je me concentrerai tout d'abord sur la mise en place de la défense appelée PAMP triggered immunity (ou PTI) en décrivant les différents aspects développés par la plante pour mettre en place cette défense et je décrirai comment les agents pathogènes peuvent détourner cette défense. Par la suite, je parlerai de l'immunité spécifique nommée ETI pour « Effector Trigger Immunity » et de sa suppression par les bactéries.

Enfin, je terminerai avec une quatrième partie sur notre agent pathogène de référence *Erwinia amylovora* (*E. amylovora*). Après avoir décrit le cycle de la maladie je me concentrerai plus particulièrement sur les facteurs de pouvoir pathogène de la bactérie. Après avoir argumenté sur les raisons de l'étude de l'interaction entre l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) et la bactérie *E. amylovora*, je présenterai mes objectifs de thèse c'est-à-dire comprendre le rôle de DspA/E dans l'induction de la mort cellulaire par une approche suppresseurs et appréhender les mécanismes mis en place lors de cette mort cellulaire.





**Figure 1: Les facteurs en interaction avec la plante**

La plante est soumise à des facteurs abiotiques qui lui sont bénéfiques et/ou néfastes. Elle est capable de capter l'énergie lumineuse et d'assimiler du  $\text{CO}_2$  pour effectuer la photosynthèse, elle assimile également de l' $\text{O}_2$  lors de la photorespiration ce qui limite la photo-inhibition mais qui est néfaste quand elle est plus importante que la photosynthèse car des formes actives de l'oxygène peuvent être produites. La plante absorbe de l'eau par le système racinaire pour son hydratation, cette absorption est en strict équilibre avec l'évapotranspiration ce qui lui permet de contrôler sa température. La nutrition minérale avec les apports en azote pour les protéines, en ions minéraux pour l'équilibre ionique mais aussi en cofacteurs enzymatique et en phosphate pour l'ADN sont également importants. Enfin, certains facteurs tels que les polluants pourront perturber le bon fonctionnement de la plante.

La plante est également soumise à plusieurs facteurs biotiques tels que les organismes épiphytes qui forment un écosystème sur la plante. Elle peut être soumise à des interactions pathogènes, que ce soit en partie aérienne ou racinaire, qui vont limiter sa croissance. Dans certains cas, des interactions bénéfiques peuvent lui permettre d'assimiler des ressources présentes en quantités limitantes. C'est le cas de la symbiose fixatrice d'azote qui permet à la plante de fixer l'azote atmosphérique au niveau de nodules contenant les bactéries fixatrices. Lors de la symbiose par mycorrhization, la plante peut assimiler du phosphate organique.

## I. La plante dans son environnement

La plante est un organisme immobile et sessile qui doit s'adapter de manière permanente aux contraintes imposées par l'environnement. Elle doit donc établir un juste équilibre et puiser les ressources qui lui seront nécessaires pour effectuer la photosynthèse, croître et donner naissance à une descendance. Au cours de son existence la plante est confrontée à deux grands groupes de facteurs qui vont influencer sa croissance, le premier groupe étant les facteurs abiotiques et le second groupe les facteurs biotiques (Figure 1).

### 1. Les facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques représentent tous les phénomènes physico-chimiques indispensables à la survie de la plante comme l'énergie lumineuse, la température, l'hygrométrie, les échanges gazeux, les éléments minéraux présents dans le sol, mais aussi pouvant représenter un danger pour sa survie tels que certains polluants ou une concentration trop élevée de certains minéraux. Ces différents facteurs sont détaillés ci-dessous.

#### 1.1 L'énergie lumineuse

La plante est un organisme dit autotrophe, c'est-à-dire un organisme qui grâce à l'énergie lumineuse est capable de synthétiser ses propres sources de carbone grâce à l'activité photosynthétique. Le processus permettant cette synthèse de ressources se nomme la photosynthèse. Différentes longueurs d'ondes issues directement de l'énergie solaire vont exciter des antennes collectrices situées dans des organites spécialisés, les chloroplastes. Ces antennes collectrices sont situées dans des réseaux de membranes des chloroplastes appelés thylakoïdes. Ces antennes sont constituées de pigments (chlorophylle a, chlorophylle b et des molécules de caroténoïdes). Ces pigments absorbent l'énergie lumineuse qui est transférée à un centre réactionnel constitué de deux molécules de chlorophylle a. Cette énergie lumineuse va permettre l'extraction des électrons aux molécules de chlorophylle a. Ces électrons seront ensuite transférés dans le reste de la chaîne photosynthétique de proche en proche. Ce transfert d'électrons permet l'oxydation de l'eau et la réduction du carbone issu du CO<sub>2</sub> atmosphérique en glucides *via* le cycle de Calvin-Benson (Farineau and Morot-Gaudry, 2006).

#### 1.2 La température

La température joue un rôle important dans la vie de la plante. En effet, comme pour tout autre organisme les variations de température auront une influence sur divers activités enzymatiques mais également sur la fluidité membranaire. Une diminution drastique des températures entrainera un ralentissement au niveau des réactions biochimiques de la plante. En effet, une baisse de température allant jusqu'à 0 à 5°C entraîne une diminution importante de l'activité photosynthétique. Les espèces végétales adaptées à de telles températures ont une production végétale très diminuée (Farineau and Morot-Gaudry, 2006).

Malgré l'adaptation de la plante aux stress chaud ou froid (changement d'orientation des feuilles, modification dans la composition des lipides membranaires...) à long terme, les changements de température peuvent avoir un impact non négligeable sur les cultures. En effet, dans une revue récente parue dans *Frontiers in Plant Science*, des chercheurs expliquent que l'augmentation de température de l'ordre de 3-4°C pourrait conduire à de grandes pertes en termes de productivité de l'ordre de 15 à 35% en Afrique et Asie et 25 à 35% au Moyen-Orient (Bitra and Gerats, 2013).

### 1.3 L'hygrométrie

L'hygrométrie (ou humidité relative) est un facteur fortement lié à l'activité photosynthétique. Lorsque l'hygrométrie est peu élevée, la plante va limiter l'ouverture de ses stomates afin d'éviter une perte d'eau et le contrôle de l'ouverture des stomates réduit les échanges gazeux diminuant ainsi les rendements photosynthétiques. L'humidité relative est donc un facteur qui peut-être limitant pour la croissance de la plante.

D'autre part, des dérégulations de l'hygrométrie environnante de la plante peuvent favoriser le développement d'infections par des agents pathogènes. C'est le cas notamment des thrips, vecteurs de maladies virales, dont le cycle biologique est accéléré dans un cas de forte hygrométrie (Devergne, 1998).

### 1.4 Les échanges gazeux

Les échanges gazeux s'effectuent au niveau des ouvertures naturelles comme les stomates. Chez les plantes ces échanges sont nécessaires non seulement au processus photosynthétique avec la fixation du dioxyde de carbone pour la synthèse de sucres complexes nécessaires à la plante mais aussi à la photorespiration avec la fixation de dioxygène empêchant ainsi la photo-inhibition lorsque la plante est soumise à un fort éclaircissement. Ces échanges gazeux sont dépendants de la température et de l'humidité relative puisque la dissolution de l'oxygène et du dioxyde de carbone varient en fonction de ces deux facteurs, par exemple l'activité photorespiratoire augmente lorsque la température augmente.

### 1.5 Les éléments minéraux

La plante a besoin d'assimiler des oligo-éléments (molybdène, nickel, cuivre, zinc, manganèse, bore, fer et chlore) nécessaires en plus faibles quantités (de l'ordre du nano-molaire) et des macroéléments (soufre, phosphore, magnésium, calcium, potassium et azote) nécessaires en plus grande quantité (de l'ordre du micro-molaire). La plupart de ces éléments servent entre autres à la plante comme régulateurs de l'osmolarité des cellules (potassium, chlore, sodium). D'autres servent comme co-facteurs enzymatiques ou de molécules impliquées dans le métabolisme (magnésium, manganèse, fer). L'un des macroéléments le plus important est l'azote puisqu'il est le constituant essentiel des acides aminés et donc des protéines. Son assimilation se fait essentiellement sous forme de nitrate qui est la forme majoritaire dans le sol sous nos latitudes. Les ions nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) absorbés par des transporteurs membranaires sont stockés dans

la vacuole puis réduits en ions nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) grâce à la nitrate réductase au niveau du cytoplasme. Ces ions nitrites sont transportés dans les plastes où ils sont réduits en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par la nitrite réductase. Ces ions seront ensuite incorporés aux acides aminés (Raven et al., 2000).

### 1.6 Les polluants

Les polluants sont des facteurs qui agissent de manière négative sur l'état physiologique de la plante. Ils peuvent se retrouver sous différentes formes. Ils peuvent même être à l'origine bénéfiques pour la plante et devenir néfastes lorsqu'ils se trouvent en excès. C'est le cas d'un excès de phosphate qui provoque non seulement un brunissement et un noircissement des feuilles mais aussi une précipitation du fer en cristal de phosphate ferreux provoquant ainsi une carence en fer. Cet excès de phosphate stimule également la production de racines au détriment de la partie aérienne. Un exemple proche de celui induisant une carence ferrique, est l'excès de manganèse. Celui-ci entraîne des carences en magnésium et en calcium car il peut se fixer sur les mêmes récepteurs que ces éléments. Il rentre ainsi en compétition avec ces éléments limitant leur absorption et leur transport par la plante. Les métaux lourds tels que le plomb ou le cadmium qui peuvent être trop concentrés dans des sols de zones industrielles, entrent aussi en compétition avec les macroéléments. Enfin, malgré le fait que l'azote soit l'un des éléments les plus essentiels dans la vie de la plante, il n'en reste pas moins préjudiciable lorsqu'il est présent en excès. En effet, il favorise le développement végétatif de la plante au détriment du système racinaire. Cet exemple au même titre que celui de l'excès de phosphore peut être préjudiciable en agriculture (Hopkins, 2003).

## 2. Les facteurs biotiques

Les facteurs biotiques représentent tous les facteurs du vivant qui vont avoir une influence sur l'existence des êtres vivants dans un écosystème donné. Ces facteurs biotiques sont subdivisés en plusieurs catégories.

La première catégorie est constituée par des facteurs physico-chimiques d'origine trophique (action du système racinaire de la plante sur le substrat, création de microclimat par le couvert végétal, modification de la composition du milieu par acidification des sols). La sécrétion de composés toxiques ou bénéfiques va aussi modifier l'environnement chimique des organismes. Un exemple très largement étudié, est l'émission de flavonoïdes par les plantes de type légumineuses qui vont attirer les bactéries de type rhizobium. Celle-ci vont synthétiser des facteurs Nod détectés par la plante qui vont modifier sa physiologie afin d'établir une relation symbiotique fixatrice d'azote (Hartwig et al., 1991). Ces exemples montrent que la plante peut être confrontée à des facteurs physico-chimiques émis par d'autres organismes qui ont un impact sur sa physiologie.

La seconde catégorie comporte les facteurs biotiques intraspécifiques, ces facteurs s'exprimant au sein d'une même espèce. En effet, pour une même plante une compétition peut s'exprimer au niveau des ressources. Pour un couvert végétal trop dense l'absorption de lumière

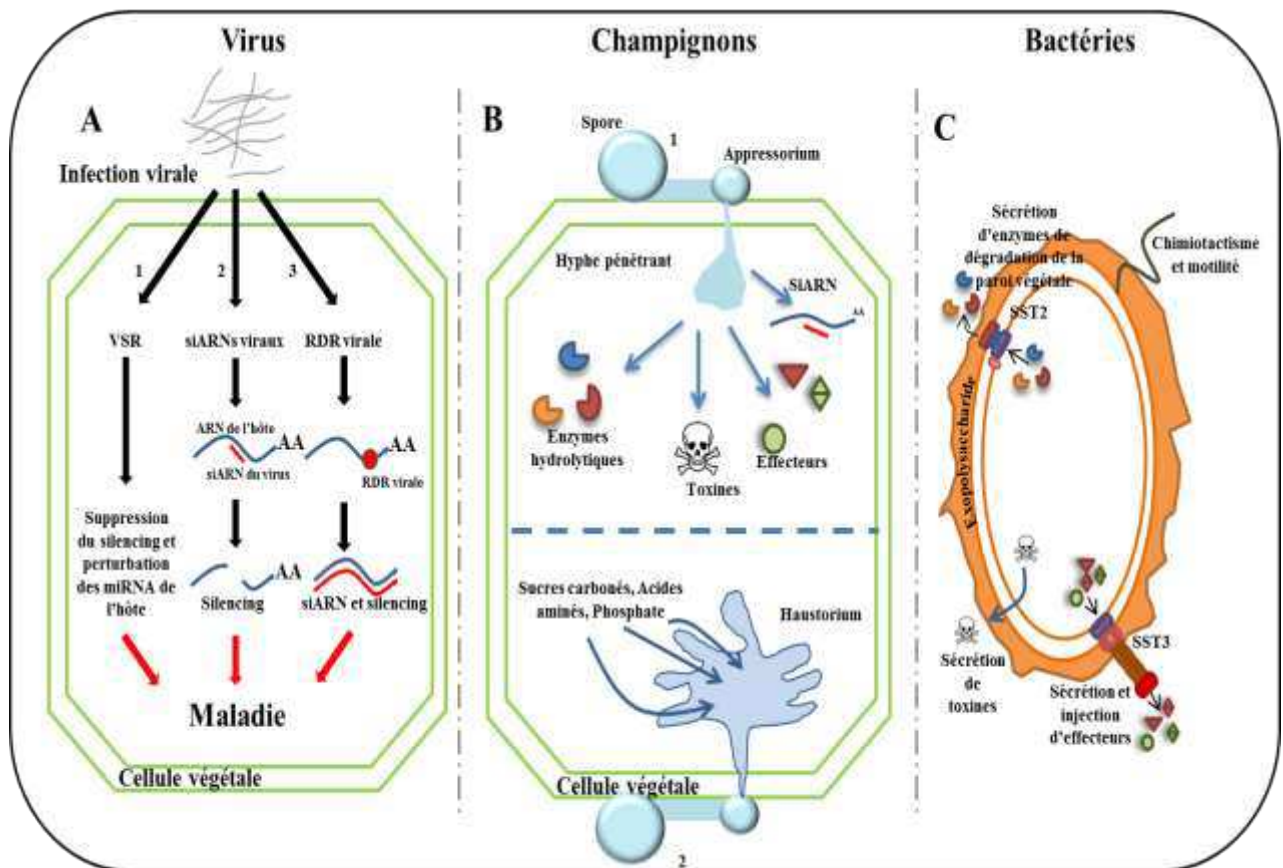
est limitée pour les jeunes plantes. Cela peut être aussi le cas du système racinaire et de la prise d'éléments nutritifs du sol.

Enfin, la dernière catégorie est constituée des facteurs biotiques interspécifiques. Comme les interactions entre une plante et d'autres espèces. Ce groupe comprend un plus grand nombre de facteurs. Les interactions de type neutre avec les organismes épiphytes vivant à la surface des feuilles sans échanges avec la plante que ce soit bénéfique ou néfaste. Les interactions positives comme la symbiose fixatrice d'azote est considérée comme une relation interspécifique ou la symbiose de type mycorhizienne qui permet à la plante d'assimiler plus de phosphate inorganique grâce à l'action d'un champignon. Certaines interactions mutualistes sont bénéfiques pour la plante. Par exemple, les composés volatiles synthétisés par une plante attaquée par un agent pathogène, peuvent servir de messagers aux autres plantes leur permettant ainsi de mettre en place des réactions de défenses contre une attaque éventuelle par ce même agent pathogène. Enfin, parmi les relations interspécifiques, ils existent les relations de type parasitaire. Dans ce cas la plante est confrontée à des agents pathogènes qui vont influencer sa physiologie provoquant une maladie lorsque les réactions de défenses déclenchées ne sont pas en mesure de bloquer la maladie (Ramade, 2009).

Au cours de sa vie la plante peut être soumise à un grand nombre de contraintes physiques (accès aux ressources, à l'eau...). Mais sa physiologie peut être modifiée lors d'une rencontre avec des agents pathogènes. Cette rencontre peut occasionner non seulement une maladie chez la plante mais aussi une mise en place de défenses efficaces pour empêcher l'établissement de la maladie. Pour pouvoir effectuer leur cycle infectieux et contourner les défenses de la plante les agents pathogènes ont mis en place plusieurs stratégies. Certaines de ces stratégies sont développées ci-après.







**Figure 2: Exemples de stratégies de virulence des agents pathogènes**

A: (1) Les virus utilisent entre autre, la stratégie VSR (pour Viral Suppressors or RNA silencing), des supresseurs qui interfèrent avec les microARNs de l'hôte conduisant à la maladie (2). En parallèle, les petits siARNs viraux peuvent directement « silencer » les gènes de l'hôte due à la forte homologie de séquence entre le génome viral et les gènes de l'hôte conduisant ainsi à la maladie (3). Ce « silencing » peut aussi être induit par l'ARN polymérase virale dépendante de l'ARN hôte (ou RDR) qui synthétise un ARN double brin sur un ARNm matrice de l'hôte dû à l'existence de motifs dans l'ARNm qui ressemble à l'origine de réplication du virus.

B: (1) Chez les oomycètes, lorsque la spore a germé, un tube germinatif s'allonge et à son extrémité un appressorium se forme. De cet appressorium un hyphes pénétrant se développe et pénètre à l'intérieur de la cellule végétale. A partir de cet hyphes des enzymes hydrolytiques, des toxines, des effecteurs ou des siARNs seront sécrétés par le champignon. Ces champignons sont souvent des organismes nécrotrophes car ils tuent les cellules pour récupérer leurs nutriments (2). Certains champignons phytopathogènes développent à partir de l'appressorium un haustorium qui sert littéralement d'organe de succion pour que le champignon récupère les nutriments de la plante. Ces champignons sont le plus souvent des organismes biotrophes car ils ne tuent pas les cellules pour récupérer les nutriments, mais puisent ces nutriments directement *via* leur haustorium.

C: Chez les bactéries, le chimiotactisme et la motilité sont impliqués dans la virulence car cela permet à la bactérie de détecter les signaux émis par la plante. L'exopolysaccharide est un facteur de virulence puisqu'il permet aux bactéries de former des biofilms au sein des tissus de la plante. Les bactéries peuvent neutraliser les défenses des plantes en utilisant différents systèmes de sécrétions qui leur permettent de sécréter des toxines, des enzymes de dégradation de la paroi végétale *via* le système de sécrétion de type 2 et des effecteurs *via* le système de sécrétion de type 3.

## 2.1 Cas des virus

Les virus sont des parasites obligatoires des cellules puisqu'ils doivent effectuer leur cycle répliatif à l'intérieur des cellules vivantes. Ils sont constitués d'une capsidie qui entoure et protège un acide nucléique de type ARN ou ADN et dans certains cas des protéines virales. Une plante saine peut être infectée de deux manières. Premièrement par transmission verticale c'est-à-dire de plante à plante par multiplication végétative (tissus infectés portant des particules virales), par le pollen ou par les graines qui véhiculent également des particules virales. Deuxièmement par transmission horizontale, c'est à dire par blessure mécanique (action du vent, de la pluie), mais aussi par des vecteurs animaux (insectes piqueurs-suceurs, broyeurs, nématodes et acariens), des vecteurs végétaux (cas de la cuscute qui transmet les particules virales *via* son haustoria) et par des champignons phytopathogènes (par exemple *Polymyxa graminis* est un vecteur du virus de la mosaïque sur blé).

De manière générale, les virus utilisent la machinerie de la plante afin de répliquer leurs acides nucléiques et de synthétiser leurs protéines que ce soit pour des virus à ARN ou ADN mono ou bicaténaire. La plante, afin d'éviter une utilisation de sa propre machinerie par les virus pour permettre leur multiplication, met en place des réactions de défenses telles que les mécanismes d'ARN interférant. Ces mécanismes se font à l'aide de petits ARNs qui vont reconnaître des séquences sur les ARNs viraux. Cette reconnaissance permet à la plante de dégrader les ARNs viraux grâce aux protéines argonautes et au complexe RISC (pour RNA-Induced Silencing Complex). En contrepartie, les virus contournent cette défense en mettant en place la suppression de l'ARN interférant à l'aide de supresseurs qui interfèrent avec la fonction des petits ARNs de l'hôte. Ces supresseurs de l'ARN interférant vont également supprimer l'ARN interférence des gènes de la plante hôte permettant ainsi au virus de se multiplier (gènes de la machinerie de transcription ou traduction par exemple). Les virus utilisent également de petits ARNs viraux (appelés siARNs pour Short Interfering ARN) qui peuvent éteindre des gènes de l'hôte dû aux fortes homologues de séquences entre ces siARNs et certains gènes de l'hôte. L'ARN interférence hôte peut être aussi induite par les ARN polymérase dépendantes des ARNs de l'hôte (RDR) qui génèrent des ARNs double brin sur un ARN matrice de l'hôte. Ce même ARN double brin est par la suite dégradé par la cellule hôte (Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, 2003; Wang et al., 2012b) (Figure 2).

## 2.2 Cas des champignons et oomycètes

Les premières étapes de l'infection par les champignons phytopathogènes et les oomycètes se fait par contact c'est-à-dire que l'inoculum primaire correspond à l'adhésion sur la cuticule des spores des agents pathogènes. En effet, des mutants dont les spores ont perdu leur adhésion, ne sont plus pathogènes. Cette adhésion se fait grâce à un mucilage constitué de polysaccharides ou de glycoprotéines. Cette adhésion peut se faire également par des interactions entre des lectines (protéines qui lient spécifiquement certains glucides) de l'hôte et les polysaccharides du parasite. Chez les oomycètes l'adhésion se fait dès la germination de la zoospore. Une fois l'adhésion des



spores du champignon phytopathogène faite, ces spores germent, forment un tube germinatif et mettent en place une structure essentielle pour la pénétration de l'hôte, l'appressorium dont la forme diffère en fonction de l'espèce. Par exemple, chez *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) l'appressorium est très simple et consiste en un léger gonflement de l'extrémité de son appareil végétatif filamenteux appelé hyphe. Cet hyphe est issu du tube germinatif et met en place une pointe de pénétration. Chez d'autres espèces, cet appressorium est plus complexe et constitue une structure séparée du tube germinatif par cloisonnement et peuvent être uni ou pluricellulaires. L'hyphe pénétrant issu de l'appressorium va ensuite passer soit par les ouvertures présentes à la surface de la feuille (stomates et blessures) soit en perçant la cuticule de l'hôte. Pour cela, les champignons possèdent un arsenal de cutinases et de pectinases qui permettent de dégrader les acides gras et la pectine de la paroi végétale. C'est le cas par exemple de *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) pathogène du riz et d'*Alternaria brassicicola* pathogène des Brassica. D'autres champignons ne synthétisent pas cet arsenal, mais utilisent plutôt la pression comme force de pénétration, la synthèse de la mélanine qui recouvre la paroi de l'appressorium permettant d'exercer une pression allant jusqu'à 8 MPa (Corbaz, 1990; Robert and Catesson, 2000).

Tous les champignons phytopathogènes n'ont pas le même comportement pendant l'infection. Lorsqu'un champignon phytopathogène provoque la nécrose des cellules, le champignon est désigné comme un nécrotrophe contrairement aux champignons biotrophes ou hémibiotrophes qui mettent en place des structures spécialisées comme les haustoriums qui absorbent les nutriments de la plante sans détruire les cellules végétales. Le mycélium du champignon se déplace alors entre les cellules en mettant en place ces haustoriums. Les cellules sont dans ce cas tuées au dernier stade de l'infection.

Une fois la pénétration de l'hôte effectuée les champignons nécrotrophes vont synthétiser des enzymes hydrolytiques ou des toxines qui vont provoquer la nécrose des cellules. Parmi les toxines sécrétées on trouve des toxines qui agissent de manière directe sur une cible comme l'hélmintosporol de *Bipolaris sorokiniana* qui agit directement sur les pompes ATPases permettant les échanges des cations  $H^+$  et  $K^+$ . D'autres toxines agissent de manière indirecte en passant par des voies de transduction. C'est le cas par exemple de la fusicoccine synthétisée par *Fusicoccum amygdali*. Cette toxine va provoquer une ouverture des stomates irréversible en agissant sur la membrane plasmique de ces derniers. Ceci provoque une sortie de proton  $H^+$  et une sortie de  $K^+$  et une entrée d'eau augmentant ainsi la pression osmotique et la turgescence des cellules de garde (Corbaz, 1990). D'autres exemples de toxines qui agissent de manière indirecte sont la fumonisine B1 et l'AAL-Toxine produites respectivement par *Fusarium moniliforme* et *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Ces toxines inhibent l'enzyme céramide synthase ce qui provoque une forte augmentation des acides gras à longues chaînes telles que la phytosphingosine et la sphinganine (Abbas et al., 1994). Il a été montré que l'augmentation de ces acides gras à longue chaîne est associée à la réaction hypersensible (ou HR<sup>1</sup>) (Peer et al., 2010).

Une autre stratégie adoptée par les champignons et les oomycètes pour envahir les tissus de la plante, est la sécrétion d'effecteurs *via* l'hyphe pénétrant. Cette sécrétion d'effecteurs permet aux champignons et aux oomycètes de contrôler l'hôte en manipulant le métabolisme de la cellule.

<sup>1</sup> Mort cellulaire programmée qui aboutit à une relation incompatible chez une plante résistante à un agent pathogène

Chez les oomycètes la plupart des effecteurs portent des motifs de type RXLR ou CRN. Ces motifs sont impliqués dans la translocation de ces effecteurs. Chez les autres champignons, un motif très court en N-terminal le motif Y/F/WxC a été identifié mais aucune fonction n'a été caractérisée. De plus, aucun motif de translocation conservé n'a été identifié (Yi and Valent, 2013).

Récemment, il a été montré que *B. cinerea*, au même titre que les virus, est capable de synthétiser des siARNs qui contournent la machinerie ARN interférent en interagissant avec Argonaute d'*Arabidopsis*. Ces mêmes siARNs « silencent » sélectivement des gènes d'immunité de l'hôte. Sur les 800 siARNs induits pendant l'infection, 73 d'entre eux sont prédits comme pouvant « silencer » les ARNs messagers de l'hôte et avec comme cibles des gènes de l'immunité d'*Arabidopsis* et de la tomate (Baulcombe, 2013; Weiberg et al., 2013). Ces résultats montrent que même pour des entités du vivant très éloignées d'un point de vue phylogénétique, les stratégies de virulence ne sont pas si différentes.

### 2.3 Cas des bactéries

Les bactéries peuvent vivre de manière épiphyte c'est-à-dire à la surface des feuilles mais cette vie épiphyte n'est que de courte durée pour les bactéries phytopathogènes. En effet, elles mettent en place des structures qui vont les protéger de la dessiccation et des rayonnements ultra-violet tel que l'Exopolysaccharide (ou EPS) en attendant de pénétrer dans les tissus de la plante pour trouver les nutriments nécessaires à leur multiplication et à leur dissémination (Denny, 1995). Bien que l'EPS n'ait pas un rôle direct dans la virulence, il va cependant être utile aux bactéries pour la colonisation de la plante puisque cet EPS va protéger les bactéries des stress présents dans les tissus de la plante. Que ce soit des stress induits par les bactéries elle-même ou générés par la plante. C'est le cas par exemple de la bactérie phytopathogène *E. amylovora* qui résiste au stress oxydatif grâce à son EPS l'amylovorane (Denny, 1995; Venisse et al., 2003). Cet EPS permet dans certains cas aux bactéries de former des biofilms qui permettent aux bactéries de survivre ou de coloniser les tissus de la plante (Rigano et al., 2007).

Un autre exemple de facteur qui n'a pas de rôle direct dans l'infection mais qui est utile aux bactéries est la motilité. En effet, cette motilité, et ce notamment grâce au flagelle, permet à la bactérie de se mouvoir vers des composés de la plante qui attirent les bactéries. Cette attraction est appelée chimiotactisme (Kentner and Sourjik, 2006). Ces exemples de facteurs qui n'ont pas de rôle direct dans la virulence ont une importance pour la fitness des agents pathogènes c'est-à-dire qu'ils vont conférer un avantage évolutif au sein des populations d'une même espèce bactérienne sur une plante hôte donnée. Par exemple l'absence d'EPS limite la formation de biofilms et par conséquent la survie des bactéries dans les tissus de la plante.

Les bactéries phytopathogènes possèdent également des facteurs ayant un rôle direct dans leur virulence mais qui ne sont pas nécessaires à leur survie ou leur multiplication en milieu riche. Ces facteurs peuvent être de nature différente. Ils permettent aux bactéries de modifier ou de manipuler le métabolisme de la plante soit par sécrétion de toxines, de composés hormonaux ou de protéines. Ces composés sont sécrétés *via* des appareils de sécrétion. Huit appareils ont été identifiés jusqu'à présent et six ont été décrits comme ayant un rôle dans la virulence chez les

bactéries phytopathogènes. Le système de sécrétion de type 1 (ou SST1) est un complexe simple similaire aux transporteurs de type ABC. Il permet la sécrétion de toxines comme la toxine RTX ou de lipases. Le système de sécrétion de type II (ou SST2) permet la sécrétion de protéines telles que des protéases, des pectinases et des cellulases. Ce SST2 dépend d'un système Tat ou Sec qui permet un premier transport de protéines dans le périplasme bactérien (Goosens et al., 2013). Les protéines sécrétées sont ensuite exportées dans le milieu extérieur par un complexe de protéines formant un pore dans la membrane externe bactérienne. Le système de sécrétion de type 3 (ou SST3) est une seringue moléculaire qui permet d'injecter des effecteurs directement dans les cellules végétales, il sera décrit de manière plus détaillée dans le paragraphe suivant. Le système de sécrétion de type IV (ou SST4) est capable de transporter de l'ADN et des protéines. Il a été décrit pour la première fois chez *Agrobacterium tumefaciens* dont il constitue le facteur de virulence principal (Christie et al., 2005). Le système de sécrétion de type V (ou SST5) permet à la bactérie de sécréter des adhésines nécessaires pour s'attacher à son hôte. Ce système dépend du système Sec. Les adhésines sont donc sécrétées dans le périplasme et véhiculées ensuite par une aquaporine insérée dans la membrane externe (Gawarzewski et al., 2013). Le système de sécrétion de type VI (ou SST6) permet à la bactérie de mobiliser des effecteurs dans les cellules végétales. Cet appareil est constitué de 2 complexes. Le premier possède des homologues à une queue de phage T4 et le second est un complexe de protéines assemblées à la membrane (Silverman et al., 2012).

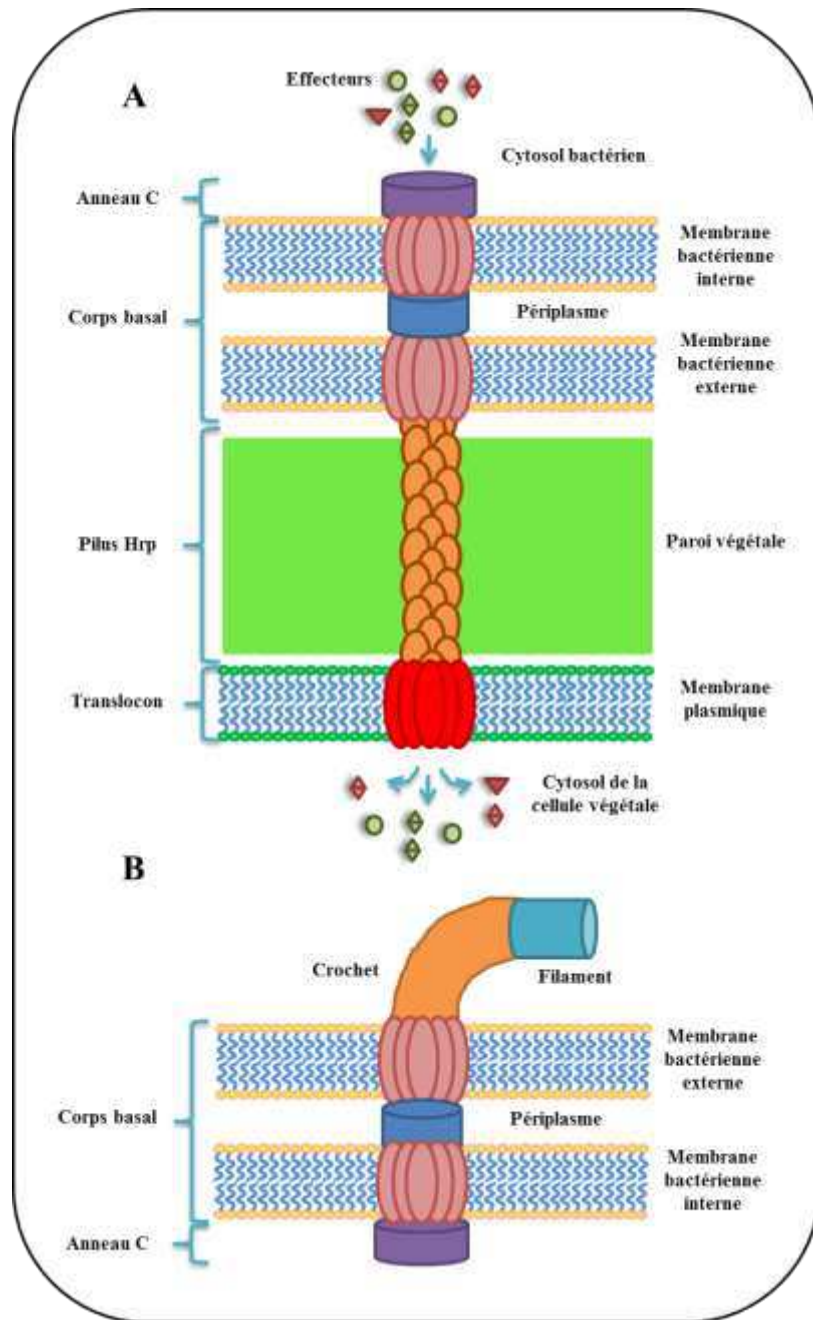
La sécrétion de toxines est une stratégie de virulence importante pour les bactéries phytopathogènes nécrotrophes. Un exemple de bactérie phytopathogène qui synthétise et sécrète des toxines très connu est l'exemple de la bactérie *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*). Elle sécrète notamment la tabtoxine qui a un rôle antimicrobien et induit une chlorose de la feuille par inhibition de la glutamine synthetase enzyme qui permet la détoxication de l'ammonium qui perturbe l'intégrité des membranes des thylakoïdes. Cette bactérie synthétise également de la phaséolotoxine qui est un inhibiteur de l'ornithine carbamoyl transférase. Cette inhibition provoque une déficience du pool d'arginine intracellulaire qui conduit à une nécrose de la feuille. *P. syringae* est capable également de synthétiser la toxine coronatine. Cette toxine possède une structure analogue à la phytohormone l'acide jasmonique (ou JA). Ainsi cette toxine se lie au récepteur du JA, le récepteur COI1, entraînant une activation de la voie du JA qui rentre en compétition avec la voie de l'acide salicylique (ou SA). Cette dernière voie étant réprimée, les défenses de la plante ne peuvent se mettre en place. Cette toxine, de plus, provoque une ouverture active des stomates facilitant ainsi la pénétration de la bactérie dans la feuille (Bender et al., 1999; Geng et al., 2012).

Dans le cas des composés hormonaux, *P. syringae* est capable également de synthétiser de l'auxine (Costacurta and Vanderleyden, 1995). Or, il a été récemment montré que l'application d'auxine exogène provoque une augmentation de la sensibilité d'*A. thaliana* vis-à-vis de la souche sauvage de *P. syringae*. Bien que les auteurs émettent l'hypothèse d'un antagonisme entre la voie SA (impliquée dans la résistance à cette bactérie) et l'IAA, ils montrent que cette augmentation de la sensibilité n'est pas due à la suppression de la voie SA (Mutka et al., 2013).

Les bactéries phytopathogènes ont également la capacité de mettre en place des complexes protéiques élaborés afin de sécréter et d'injecter des protéines soit dans le milieu extérieur ou

directement dans les cellules végétales. C'est le cas par exemple du SST2 qui permet de sécréter des enzymes de dégradation de la paroi végétale (protéases...) lorsque la bactérie est en contact avec la cellule végétale. Non seulement le SST2 va permettre à la bactérie de passer une barrière naturelle de la plante qu'est la paroi mais il va également permettre à la bactérie de récupérer des nutriments (Jha et al., 2005; Lagaert et al., 2009). Le SST2 chez la bactérie *Dickeya dadantii* est essentiel pour son pouvoir pathogène puisque des mutants de ce complexe sont non-pathogènes (Andro et al., 1984; Douet et al., 2009).

Enfin, certaines bactéries phytopathogènes à caractère Gram négatif possèdent le SST3, qui permet la sécrétion et la translocation d'effecteurs de type 3. Ce complexe est très connu chez les bactéries pathogènes animales. Notamment, des bactéries du genre *Salmonella*, ou *Yersinia* dont des représentants comme *Yersinia enterocolitica* et *Salmonella typhimurium* utilisent ce SST3 pour injecter des effecteurs afin de coloniser les cellules de leur hôte (Michiels et al., 1991; Ramos-Morales, 2012). Chez les plantes, les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Erwinia* représentés par *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) et *E. amylovora* ont un SST3 essentiel à leur pouvoir pathogène (Alfano and Collmer, 1997). En effet, des mutants du SST3 ne sont plus pathogènes montrant ainsi l'importance de ce complexe (Alfano and Collmer, 2004). Le SST3 est historiquement appelé HRP pour « Hypersensitive Response and Pathogenicity » chez les bactéries phytopathogènes car comme cela a été montré chez *P. syringae* pv. *Phaseolicola*, des mutants du SST3 n'induisent plus de HR sur plante non-hôte (Lindgren et al., 1986).



**Figure 3: Comparaison entre le système de sécrétion de type 3 et le flagelle bactérien**

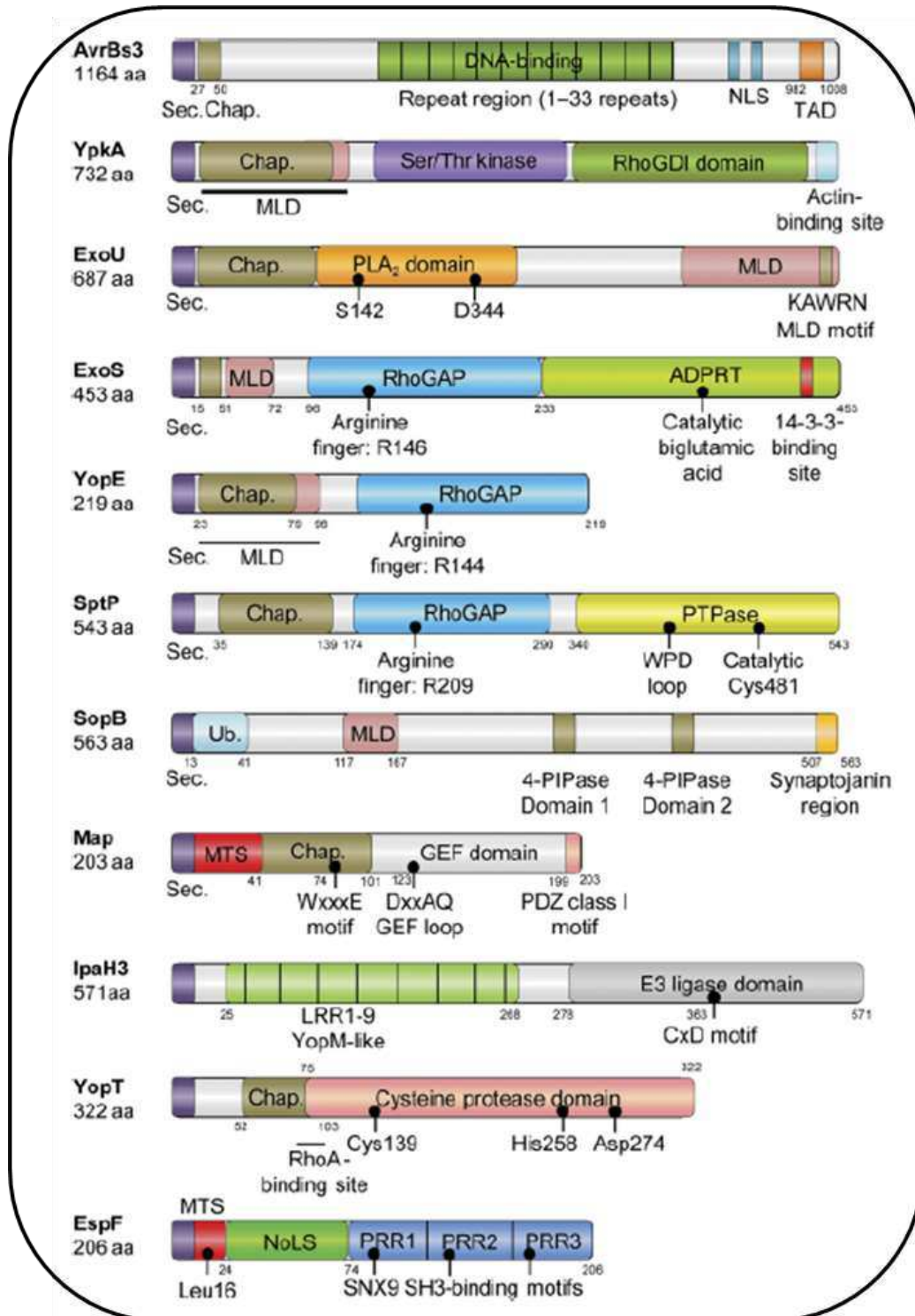
(A) Le système de sécrétion de type 3 est constitué d'un corps basal inséré dans la double membrane de la bactérie, d'un pilus Hrp qui s'insère dans la paroi de la cellule végétale et d'un translocon qui s'insère dans la membrane plasmique de la cellule végétale (B). Le flagelle est quant à lui constitué d'un corps basal inséré dans la double membrane plasmique de la bactérie dont la similarité avec le corps basal du système de sécrétion de type 3 est forte. Le flagelle est aussi constitué d'un crochet et d'un filament situés dans le milieu extérieur (Modifié d'après Büttner 2012).



## 2.4 Le SST3 un complexe structuré et régulé

Le SST3 est un complexe protéique assimilable à une seringue. Son architecture est très proche du flagelle des bactéries. Il est composé de trois grandes parties. Premièrement, il possède un corps basal cylindrique inséré dans les deux membranes plasmique de la bactérie. Cela permet de faire passer les effecteurs par les deux membranes de la bactérie sans transiter par le périplasme. Le corps basal est surmonté d'un pilus Hrp qui constitue l'aiguille de la seringue et dont la longueur varie selon l'espèce bactérienne. Par exemple chez les pathogènes animaux, le pilus n'excède pas 60 nm contrairement aux bactéries phytopathogènes dont la longueur est variable pouvant atteindre quelques micromètres. En effet, la bactérie phytopathogène doit faire face à la barrière pariétale dont l'épaisseur varie d'une plante à l'autre (Cornelis, 2006). Cette longueur est d'ailleurs contrôlée grâce à une règle moléculaire permettant ainsi la mise en place d'un SST3 fonctionnel (Journet et al., 2003). Enfin, le SST3 se termine par un translocon qui s'insère dans la membrane plasmique des cellules hôtes formant ainsi un pore permettant de cette façon aux effecteurs de passer dans le cytoplasme des cellules hôtes. Ce translocon est largement décrit dans le domaine animal et des analyses de cristallographie chez *Salmonella flexneri* ont montré que ce translocon avait des similarités structurales avec des toxines sécrétées par des bactéries qui forment des pores dans la membrane plasmique des cellules suggérant ainsi une origine commune entre ces familles de protéines. Néanmoins, le translocon est nettement moins étudié chez les bactéries phytopathogènes et sa composition précise reste inconnue (Büttner, 2012) (Figure 3)

Les gènes du SST3 sont régulés de manière fine. Les bactéries dont le pouvoir pathogène dépend de ce système n'expriment pas de manière constitutive les gènes du cluster *Hrp*. Ceci permet à la bactérie d'utiliser l'énergie nécessaire à la constitution de ce complexe uniquement en cas de besoin c'est-à-dire dans les conditions retrouvées *in planta* dans l'apoplaste. Ces conditions peuvent être reproduites *in vitro* lorsque la bactérie est cultivée en milieu minimum à basse température et à faible pH (Tang et al., 2006). Le mode de régulation des gènes *hrp*, la similarité entre eux et l'organisation structurale des clusters, ont conduit à classer ces gènes en deux groupes. Le premier groupe comprend les clusters *hrp* des genres *Erwinia* et *Pseudomonas* et le second ceux des genres *Ralstonia* et *Xanthomonas*. Les différences entre les deux groupes s'expriment par une activation de cascades de signalisation différentes. Par exemple, dans le premier groupe, le signal (nutriments faibles, pH et température faibles) est perçu par une histidine kinase HrpX. Cette kinase va phosphoryler un régulateur HrpY qui va induire l'expression du régulateur HrpS. L'expression du gène HrpL va être activée et la protéine codée va se fixer sur tous les gènes contenant une séquence promotrice nommée *hrp*-box (GGAACCNA-N<sub>14</sub>-CCACNNA) (Innes et al., 1993). Parmi ces gènes, on trouve tous ceux codant des protéines du système *Hrp* et des effecteurs de type 3 (Wei et al., 2000; McNally et al., 2012). Pour le second groupe des gènes *hrp*, le signal est perçu par la protéine PrhA qui est ancrée dans la membrane végétale. Cette protéine va par la suite induire une cascade de signalisation qui permet la levée de répression d'un répresseur nommé PrhR. De ce fait, le régulateur PrhJ va être activé transcriptionnellement par PrhL qui à son tour va activer l'expression de HrpG.



**Figure 4: Domaines des effecteurs de type 3**

Exemples d'effecteurs et leurs domaines dont certains ont été décrits en introduction. Tous ces effecteurs possèdent un domaine de sécrétion et la majorité un domaine de fixation à des protéines chaperonnes (D'après Dean, 2011).

Au même titre que HrpS, HrpG va activer HrpB qui se fixe sur les gènes contenant la séquence promotrice TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG appelée *hrpII*-box permettant l'expression des gènes *hrp* (Genin et al., 1992; Fenselau and Bonas, 1995; Brito et al., 1999, 2002).

Une fois le SST3 mis en place dans les conditions de l'apoplaste, la bactérie synthétise son arsenal d'effecteurs qui seront par la suite injectés directement dans le cytoplasme des cellules de la plante. Ces effecteurs ont un rôle essentiel pour les bactéries dont le pouvoir pathogène dépend d'un SST3. En effet les effecteurs vont manipuler le métabolisme de la cellule hôte, supprimer les défenses de la plante pour finalement permettre aux bactéries de coloniser les tissus de la plante (Kjemtrup et al., 2000; Alfano and Collmer, 2004; Gürlebeck et al., 2006). Un descriptif de ces effecteurs et de leurs fonctions sera décrit dans le paragraphe suivant. Le rôle de ces effecteurs dans le contournement des défenses des plantes fera l'objet d'un autre paragraphe.

## 2.2 Les effecteurs de type 3 : Des facteurs de virulence majeurs

Les bactéries dont le pouvoir pathogène dépend des effecteurs peuvent les utiliser de manière concertée comme chez la bactérie *P. syringae* afin d'abolir les défenses de la plante. Les effecteurs peuvent aussi être remplacés par d'autres effecteurs issus du même sécrétôme de la bactérie. Dans ce cas, les effecteurs possèdent la même fonction biochimique appelée redondance fonctionnelle. C'est le cas de la bactérie *R. solanacearum* qui injecte des effecteurs de la famille GALA (effecteurs possédant un domaine de répétition riche en leucines (ou LRR) qui contient un motif GAXALA). Les simples mutants de ces effecteurs sont toujours pathogènes. Par contre des mutations dans les 7 gènes codant ces effecteurs affectent le pouvoir pathogène de la bactérie (Angot et al., 2006). Un cas de redondance fonctionnelle existe également chez *P. syringae* avec l'exemple des effecteurs AvrB et AvrRPM1 qui modifient la même cible végétale RIN4 en la phosphorylant (Mackey et al., 2002). Ces deux exemples illustrent le fait que l'étude du rôle d'un effecteur n'est pas chose aisée. Enfin le pouvoir pathogène de certaines bactéries dépend d'un seul effecteur. C'est le cas d'*E. amylovora* avec l'effecteur DspA/E (Gaudriault et al., 1997).

Les effecteurs sont nommés en fonction de la méthode qui a permis de les découvrir. Par exemple, des effecteurs nommés *Avr* ont été identifiés comme étant des protéines d'avidité qui déclenchent la HR chez certains génotypes hôtes. D'autres ont été identifiés par l'étude des sécrétômes bactériens dépendant du SST3 comme celui du genre *Yersinia* avec les effecteurs nommés *Yop* (Trosky et al., 2008) ou avec les effecteurs *Hop* de *P. syringae* (Lindeberg et al., 2006). Les effecteurs de type 3 sont des protéines constituées de différents domaines qui vont leur permettre d'assurer leur rôle dans la cellule végétale (Figure 4).

Les effecteurs possèdent un signal de sécrétion situé dans les 20 à 30 premiers acides aminés N-terminaux (Sory et al., 1995; Buchko et al., 2010). Ce signal de sécrétion est suivi d'un domaine de translocation et le plus souvent d'un domaine de liaison à de petites protéines appelées chaperonnes codées le plus souvent sur un gène proche au gène codant l'effecteur de type 3. Les effecteurs de type 3 se lient aux protéines chaperonnes grâce à un domaine nommé domaine CBD (Chaperone-Binding Domain) situé dans les 100 premiers acides aminés N-terminaux qui permettent aux effecteurs d'être dans une conformation stable lors de leur injection dans la cellule végétale (He et al., 2004).



Nom de l'effecteur	Fonction biochimique	Rôle	Référence
<i>Pseudomonas syringae</i>			
AvrB	Kinase	Phosphoryle RIN4, RAR1	Mackey <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2005; Shang <i>et al.</i> , 2006
AvrPto		Inhibe FLS2, BAK1, EFR, Pto	Shang <i>et al.</i> , 2008; Xiang <i>et al.</i> , 2011
AvrPtoB	E3 ubiquitine ligase	Ubiquitine et dégrade FLS2, Fen, CERK1. ubiquitine EFR et BAK1	Jansusevic <i>et al.</i> , 2006; Gohre <i>et al.</i> , 2008; Shan <i>et al.</i> , 2008; Gimenez-Ibanez <i>et al.</i> , 2009
AvrRpm1	Kinase	Phosphoryle RIN4	Mackey <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2005; Shang <i>et al.</i> , 2006
AvrRpt2	Protéase	Clive RIN4, stimule turnover des protéines de la voie des auxines	Mackey <i>et al.</i> , 2003; Cui <i>et al.</i> , 2013)
HopAO1	Tyrosine phosphatase	Provoque la suppression du dépôt de callose	Bretz, Espinoza <i>et al.</i> , 2003; Underwood <i>et al.</i> , 2007
HopA11	Phosphothréonine lyase	Déphosphoryle MPK3, MPK4 et MPK6	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2012
HopM1		Provoque la dégradation de AtMIN7 Réduit l'expression de PR1	Gangadharan A <i>et al.</i> , 2013
HopU1	Mono-ADP ribosyl transférase	Cible GRP7	Nicaise <i>et al.</i> , 2013
<i>Xanthomonas species</i>			
AvrXa27	Facteur de transcription	Active la transcription de Xa27 conduisant à la résistance du riz	Gu <i>et al.</i> , 2009
AvrBs3	Facteur de transcription	Active la transcription des gènes <i>UPA20</i> et <i>BS3</i>	Boch et Bonas, 2010
XopD	SUMO-protéase	Désumoyle SIERF4 induisant la répression de la voie éthylène	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Ralstonia solanacearum</i>			
PopP2	Acétyltransférase	Interagit avec RRS1-R et provoque l'immunité	Tasset <i>et al.</i> , 2010
GALAs	Protéines à F-box	Détournent la machinerie du complexe SCF ubiquitine ligase de l'hôte	Magori <i>et al.</i> , 2011

**Tableau 1: Exemples d'effecteurs dont le rôle a été décrit**

C'est le cas par exemple de la protéine HopA1 de *P. syringae* qui interagit avec sa chaperonne ShcA dont l'interaction a été mise en évidence par cristallographie (Janjusevic et al., 2013).

Les effecteurs présentent également des domaines fonctionnels servant à leur adressage comme l'effecteur AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (*Xcv*) qui possède un domaine de localisation nucléaire (NLS) en C-terminal. Celui-ci lui permet d'être transloqué dans le noyau grâce aux importines alpha (Szurek et al., 2001). L'effecteur PopP2 de *R. solanacearum* possède quant à lui une séquence NLS en N-terminal (Dean, 2011). Des domaines différents de localisation à la membrane plasmique ont été également identifiés chez les effecteurs de type 3. C'est le cas pour le domaine PPR qui est constitué d'une région répétée de 20 motifs pentapeptides situé dans la partie C-terminale des effecteurs. Un domaine MLD (pour Membrane Localization Domain) permet également aux effecteurs de cibler la membrane plasmique (Dean, 2011). Pour d'autres effecteurs, des motifs présents dans leur séquence, suffisent à leur localisation. Par exemple l'effecteur AnkB de *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) possède un motif CaaX de prénylation dans sa partie C-terminale qui lui permet d'être ancré à la membrane plasmique. Cet ancrage est nécessaire à la fonction de l'effecteur (Price et al., 2010). Des motifs de N-myristoylation peuvent être trouvés dans les effecteurs et ces motifs sont essentiels pour la virulence. C'est le cas des effecteurs de la famille HopZ (HopZ2 et HopZ1a) de *P. syringae* dont la myristoylation est importante à la fois pour leur localisation à la membrane plasmique et pour leur activité de virulence et d'avirulence chez *A. thaliana* (Lewis et al., 2008). C'est aussi le cas de l'effecteur XopE2 qui possède un motif de myristoylation accompagné d'un motif de palmytoylation important pour sa virulence (Thieme et al., 2007).

Des domaines de localisation aux organites ont été aussi décrits dans la littérature. L'effecteur HopI1 par exemple possède une séquence putative d'adressage au chloroplaste. Cet effecteur localisé au niveau du chloroplaste cause un remodelage des membranes des thylakoïdes grâce à son domaine J et supprime l'accumulation de SA annulant ainsi les défenses de la plante (Jelenska et al., 2007). Les effecteurs possédant un motif MTF (Mitochondrial Targeting Sequence) en N-terminal seront localisés à la mitochondrie. C'est le cas de l'effecteur EspF d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Sans ce motif, EspF est incapable de diminuer le potentiel membranaire des mitochondries conduisant ainsi à la mort des cellules HeLa infectées (Nagai et al., 2005).

En plus de posséder des domaines de localisation dans les différents compartiments cellulaire ou membranaire important pour l'activité de virulence des effecteurs, ces derniers présentent aussi de multiples fonctions biochimiques qui leur permettent de contourner les défenses de leurs hôtes (Tableau 1). En effet, certains effecteurs peuvent ubiquitiner ou provoquer l'ubiquitination des protéines de l'hôte ce qui va conduire à la dégradation de la protéine cible. C'est le cas de la kinase Fen qui est reconnue par l'effecteur AvrPtoB qui possède un domaine E3 ligase en C-terminal. Ce domaine permet de polyubiquitiner la kinase Fen. Cette polyubiquitination est reconnue par la machinerie du protéasome provoquant ainsi sa dégradation (Rosebrock et al., 2007; Chien et al., 2013). Les effecteurs de la famille GALA du genre *Ralstonia* détournent quant à elles les E3 ligases de l'hôte pour l'ubiquitination de leurs cibles (Angot et al., 2006).

Les effecteurs peuvent avoir également des fonctions de protéases qui dégradent directement leur cible ou qui altèrent les modifications post-traductionnelles de leur cible. C'est le cas de l'effecteur XopD de (*Xcv*) qui clive des protéines sumoylées dans le noyau de la cellule végétale chez *Nicotiana benthamiana* (Hotson et al., 2003).

Une autre fonction biochimique des effecteurs décrite est la déphosphorylation des protéines de l'hôte. C'est le cas de l'effecteur HopA1 qui déphosphoryle les kinases MAPK3 et MAPK6 (pour Mitogen Activated Protein Kinase) d'*A. thaliana*. Cette déphosphorylation a pour effet d'empêcher l'activation de la transcription de gènes de défense, empêchant ainsi la plante de se défendre (Block and Alfano, 2011). L'effecteur AvrPto empêche l'activation des MAPK3 et 6 bloquant ainsi l'autophosphorylation des récepteurs FLS2 et EFR normalement activés lors de détection des PAMPS comme la flagelline et EF-Tu.

Chez *P. syringae* une autre fonction a été décrite pour l'effecteur HopU1. Il cible la protéine GRP7 une protéine qui chaperonne des ARNm impliqués dans les défenses d'*A. thaliana* et transfère un ADP-ribose sur GRP7. Ceci va empêcher GRP7 de se lier à ses ARNm cibles, cette action va ainsi limiter la mise en place des défenses de la plante (Jeong et al., 2011).

Enfin, certains effecteurs sont capables d'altérer le cytosquelette de la cellule hôte afin de modifier de nombreux processus physiologiques mettant en jeu la dynamique de la cellule tel que les mécanismes d'endocytose, de sécrétion de division cellulaire et de trafic cellulaire. L'effecteur HopZ1a est capable d'acétyler les tubulines des microtubules empêchant ainsi leur polymérisation. Ceci inhibe la déposition de callose (une réaction de défense) à la surface de la cellule, les polymères de callose n'étant plus transférés *via* le réseau de microtubules (Lee et al., 2012).

Je m'intéresserai par la suite aux défenses des plantes et décrirai les différents niveaux de défenses. Un parallèle avec des exemples de contournement des défenses des plantes par les bactéries phytopathogènes sera décrit.

## II. Les défenses des plantes et leurs interactions avec les agents pathogènes

Les plantes sont des organismes sédentaires qui ne peuvent éviter le danger par la fuite. Elles possèdent donc des moyens de défenses qui leur permettent de résister aux agressions d'agents pathogènes. Ces moyens de défenses commencent par ce que l'on appelle les défenses préformées ou constitutives c'est-à-dire les défenses existantes avant la présence d'un agent pathogène. Dans le cas où les défenses préformées ne sont pas suffisantes pour empêcher un agent pathogène de pénétrer dans les tissus de la plante, la plante met en place ce que l'on appelle la défense induite, une défense impliquant des changements du métabolisme de la cellule végétale après la détection de l'agent pathogène. Ce chapitre présentera donc ces deux types de défenses. Les défenses préformées seront décrites dans un premier temps puis la reconnaissance de l'agent pathogène et les défenses mises en place suite à sa reconnaissance seront présentées dans un second temps.

## 1. Les défenses préformées

Les défenses préformées sont les barrières présentes constitutivement chez la plante. Ces défenses se classent en deux grands groupes ; les barrières physiques et chimiques.

### 1.1 Les barrières physiques

Ce type de barrière est constitué de structures souvent observables à l'œil nu, telles que la cuticule, les trichomes ou les cires. Des structures qui constituent la paroi des cellules végétales comme la lignine, les composants des fibres (cellulose, hémicellulose) et les pectines appartiennent à cette catégorie de barrières. L'écorce des arbres est une barrière solide qui limite l'entrée des agents pathogènes qui ne peuvent pénétrer que par les lenticelles, ouvertures naturelles présentes sur l'écorce (Drénou, 1999). Ces barrières physiques peuvent donc être contournées par les agents pathogènes *via* les ouvertures naturelles de la plante, comme les stomates, les hydathodes, les nectarhodes ou les blessures. L'agent pathogène sera ensuite confronté aux barrières chimiques préexistantes.

### 1.2 Les barrières chimiques

Lorsque l'agent pathogène a réussi à pénétrer à l'intérieur des tissus de la plante il peut être confronté aux barrières chimiques préexistantes de la plante. Parmi ces composés on trouve les métabolites issus du métabolisme secondaire qui ont des propriétés antimicrobiennes ou antifongiques. On trouve notamment des glucosides, des saponides et des composés phénoliques constitutifs appelés phytoanticipines (à ne pas confondre avec les composés phénoliques induits appelés phytoalexines). Les phytoanticipines sont souvent stockés dans la vacuole et parfois dans des cellules spécifiques puis libérés lors d'une interaction avec un micro-organisme. C'est le cas par exemple des glucosinolates qui sont stockés dans la vacuole sous forme inactive (groupement glucose qui les rends stables). Si l'intégrité de la cellule est touchée ces molécules sont relarguées et interagissent avec une enzyme appelée myrosinase qui hydrolysent le glucose de ces molécules les rendant ainsi instables. Des dérivés toxiques pour les herbivores et les micro-organismes tels que des isothiocyanates et des nitriles dérivent par la suite de cette molécule (Chen and Andreasson, 2001; Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, 2003; Lucas, 2009).

La notion de barrières chimiques préformées reste toutefois sujette à débat. En effet, certains auteurs parlent de limite entre les phytoalexines et les phénols constitutifs. C'est le cas par exemple de la scopolétine et de l'umbelliférone. Ces deux molécules apparaissent après une infection chez le platane (ce sont donc des phytoalexines) alors qu'elles sont constitutifs chez certains agrumes (ce sont donc des phénols constitutifs) notamment la scopolétine (Macheix et al., 2005). Ceci soulève une notion intéressante chez les plantes, la notion de défenses induites.

## 2. L'immunité basale chez les végétaux

En plus d'être protégées par des composés préformés et des barrières physiques les plantes ont l'aptitude d'exprimer *de novo* des défenses « dormantes » qui seront activées en plus ou dans le cas où les barrières constitutives ne suffisent pas. Ainsi le métabolisme secondaire joue un rôle essentiel dans la constitution de ces défenses induites mais c'est aussi le cas de bien d'autres types de défenses comme la défense basale et l'immunité spécifique qui mettront en jeu des voies de signalisation hormonales ou le métabolisme secondaire. Cet éveil des défenses induites passe tout d'abord par une reconnaissance de l'agent pathogène. Les points suivants décriront donc les mécanismes de défenses induites par les agents pathogènes en commençant par la reconnaissance des agents pathogènes. J'introduirai la notion de PTI (pour PAMP Triggered Immunity) induite dans le cas de défenses basales après une reconnaissance de motifs structuraux des microorganismes appelés MAMPs (qu'ils soient pathogènes ou non). Je terminerai sur la notion d'immunité spécifique (ou ETI) qui est induite dans le cas d'utilisation d'effecteurs par les agents pathogènes.

### 2.1 Activation de la PTI par les PAMPs

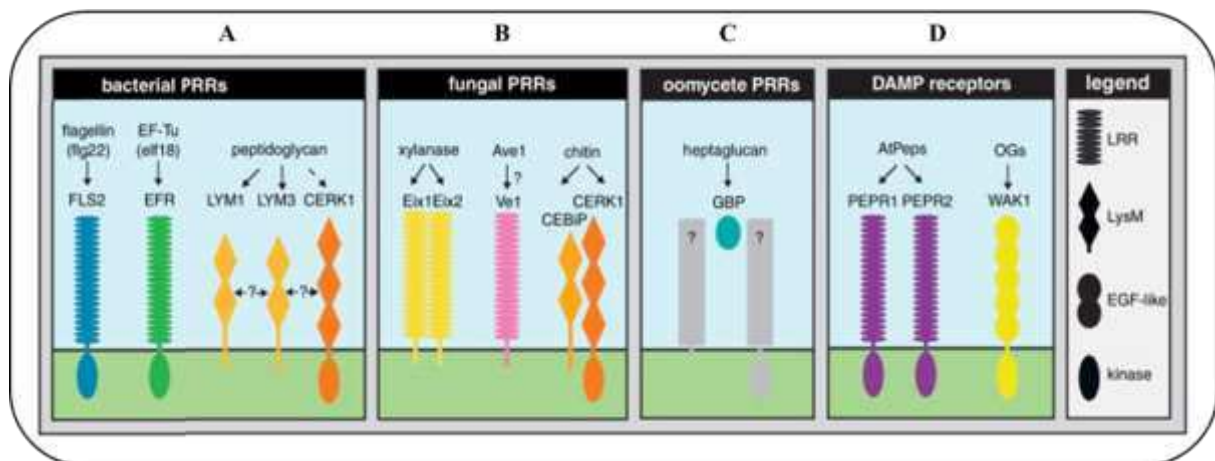
#### 2.1.1 Les PAMPs/MAMPs

Les PAMPs (pour Pathogen Associated Molecular Pattern) sont des motifs structuraux très conservés présents chez les agents pathogènes; on parle de MAMPs dans le cas général des microorganismes). Ces motifs sont généralement conservés chez différents microorganismes, absents chez l'hôte mais peuvent être reconnus par plusieurs espèces végétales. Il se trouve que ces motifs sont généralement essentiels pour la survie des agents pathogènes car ils font partie de composantes obligatoirement présentes chez ces agents pathogènes. C'est le cas par exemple de la chitine ou de l'ergosterol, composantes majeures de la paroi du champignon mais aussi des  $\beta$ -glucanes chez les oomycètes. Chez les bactéries on trouve des protéines de constitution du flagelle, du peptidoglycane, du lipopolysaccharide ainsi que le facteur d'élongation EF-Tu et les protéines de réponse au froid (Cold Shock Protein) (Newman et al., 2013). Ces PAMPs/MAMPs peuvent être détectés par les plantes lors d'une interaction avec un microorganisme. Cette détection va provoquer l'induction de voies de signalisation qui conduisent au développement de la résistance basale. Cette réponse est appelée PTI.

Afin d'étudier l'activation de la PTI par les PAMPs, de court peptides stables issus de séquences protéiques de PAMPs bactériens ont été utilisés. C'est le cas notamment du peptide flg22 de 22 acides aminés N-terminaux de la flagelline, suffisant pour induire les défenses chez *A. thaliana* (Gómez-Gómez et al., 1999). Le peptide efl18 constitué de 18 acides aminés N-terminaux du facteur d'élongation EF-Tu est également suffisant pour induire l'immunité innée chez *A. thaliana* (Kunze et al., 2004).







**Figure 5: Récepteurs des PAMPs et DAMPs**

A: La RLK FLS2 reconnaît la flagelline bactérienne (ou l'épitope actif flg22) chez *Arabidopsis*, la tomate, *N. benthamiana* et le riz. La LRR-RLK EFR spécifique aux *Brassicaceae* reconnaît le facteur d'élongation EF-Tu (ou l'épitope actif elf18). Les LysM-RLPs LYM1 et LYM3 sont les récepteurs pour le peptidoglycane bactérien (PGN) et la LysM-RLK CERK1 lie faiblement le PGN. L'interaction entre LYM1, LYM3 et CERK1 n'a pas encore été montrée mais il est possible qu'elle fonctionne comme un complexe de reconnaissance tripartite pour le PGN chez *A. thaliana*.

B: Le PAMP fongique xylanase est reconnu par les LRR-RLPs de la tomate Eix1 et Eix2. Ave1 est un ligand putatif pour la LRR-RLP Ve1 de la tomate mais la liaison directe n'a pas été montrée. Chez le riz, la LysM-RLP CEBiP lie la chitine et interagit avec la LysM-RLK CERK1 pour permettre la signalisation tandis que chez *A. thaliana*, CERK1 est le récepteur majeur de liaison à la chitine et l'interaction avec les protéines CEBiP-like n'a pas été montrée.

C: Chez les légumineuses, une protéine  $\beta$ -glucane extracellulaire (GBP) se lie avec l'heptaglucon de *P. infestans*, cependant la façon dont cette protéine permet la signalisation est inconnue; les auteurs émettent l'hypothèse qu'il y a une interaction avec un domaine transmembranaire.

D: Les LRR-RLK PEPR1 et PEPR2 lient ATpeps et la RLK WAK1 qui contient un domaine EGF-like est un récepteur pour les oligogalacturonides dérivés de la paroi (Modifié d'après Monaghan et Zipfel, 2012).

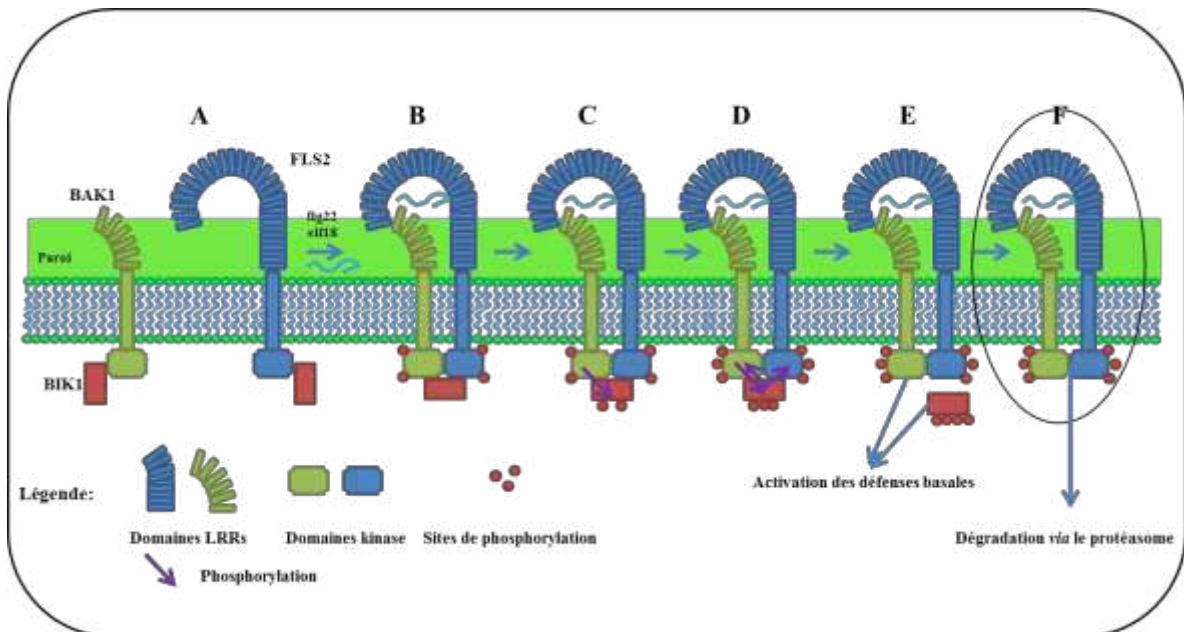
En plus des PAMPs/MAMPs il existe les DAMPs (pour Damage Associated molecular Pattern) qui sont des molécules qui dérivent de la plante hôte issues des premières réponses de défenses de la plante ou de la dégradation de structures de la plante. Par exemple la prosystémine est un précurseur présent dans le cytoplasme des cellules de tomate. Lorsque la cellule est endommagée la prosystémine est convertie en systémine qui agit comme DAMP sur les cellules environnantes afin d'induire les réactions de défenses. C'est aussi le cas de la cutine et des oligogalacturonides issus de la dégradation de la paroi végétale (Newman et al., 2013) (Figure 5).

### 2.1.2 Reconnaissance des PAMPs

Afin de reconnaître les PAMPs/MAMPs et les DAMPs lors d'une interaction, les végétaux possèdent des récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique. Ces récepteurs sont appelés PRR (pour Pattern Recognition Receptor) et peuvent être classés en deux grandes familles. La première est constituée des récepteur de type RLK (pour Receptor Like Kinase) et la seconde des récepteurs de type RLP (pour Receptor Like Protein). Les RLK sont constitués d'une partie extracellulaire possédant un domaine LRR (pour Leucine Rich Repeat), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine kinase. Le récepteur FLS2 d'*A. thaliana* qui permet de détecter la flagelline flg22 et le récepteur EFR qui reconnaît EF-Tu et efl18 sont des récepteurs RLK (Chinchilla et al., 2006; Zipfel et al., 2006). Chez les champignons la chitine est perçue par CERK1 un récepteur de type RLK également (Miya et al., 2007). Les récepteurs RLP ne possèdent pas de domaine extracellulaire. Le récepteur RBPG1 est un exemple de récepteur RLP qui reconnaît les endopolygalacturonases de *B. cinerea* (Monaghan and Zipfel, 2012; Zhang et al., 2013).

Les peptides flg22 et elf18, en se fixant sur leurs récepteurs respectifs FLS2 et EFR, vont provoquer l'hétérodimérisation de ces récepteurs avec un autre récepteur de type RLK, le récepteur BAK1 (pour BR1-Associated receptor Kinase 1) (Chinchilla et al., 2007). Suite à cette hétérodimérisation le complexe va interagir avec la protéine kinase BIK1 (pour Botrytis-Induced Kinase 1) (Lu et al., 2010). Cette interaction entre les 3 partenaires FLS2/EFR, BAK1 et BIK1 provoque une transphosphorylation entre ces 3 partenaires. Une étude récente montre d'ailleurs que des résidus thréonine et une tyrosine de BIK1 sont importants pour son autophosphorylation et la phosphorylation de BAK1. Les auteurs ont également trouvé d'autres sites de phosphorylation de FLS2 par BIK1 (Xu et al., 2013). Ces complexes une fois formés vont déclencher des cascades de signalisation, permettant d'induire les défenses immunitaires de la plante (Abramovitch et al., 2006).





**Figure 6: Modèle d'activation du complexe FLS2/BAK1**

A: En l'absence de flg22 ou elf18, la protéine BIK1 s'associe avec FLS2 et BAK1 qui sont dans un état inactif.

B: La liaison des peptides flg22 ou elf18 à FLS2 provoque l'association entre FLS2 et BAK1.

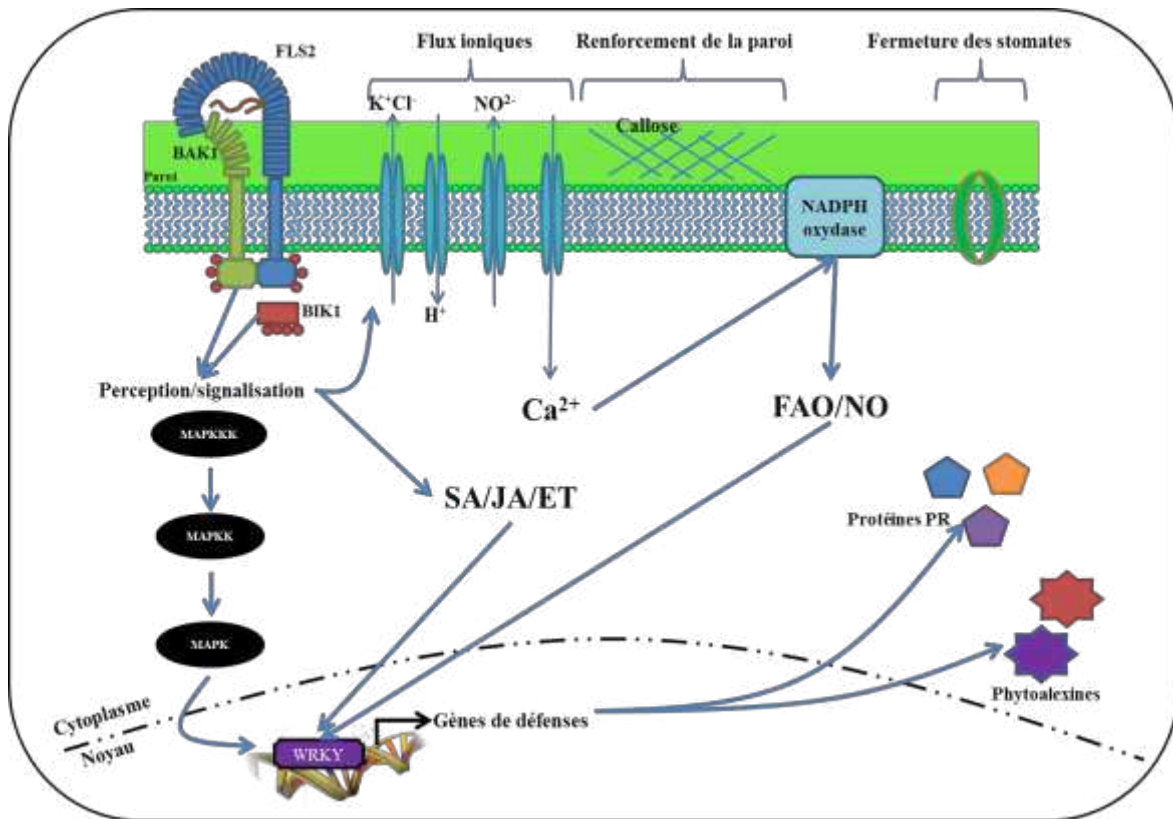
C: BAK1 à l'état actif phosphoryle BIK1.

D: BIK1 phosphoryle à son tour le complexe FLS2/BAK1.

E: Une réaction de transphosphorylation est effectuée et BIK1 est de nouveau phosphorylée et se retrouve déliée du complexe. FLS2/BAK1 et BIK1 déclenchent alors une signalisation permettant la mise en place de la PTI.

F: Le complexe FLS2/BAK1 est ensuite internalisé et dégradé *via* la machinerie du protéasome (Modifié d'après Chinchilla *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2010).

L'exemple des récepteurs FLS2 et EFR montre que BAK1 et BIK1 sont des régulateurs centraux de la signalisation induite après la reconnaissance d'un agent pathogène. D'ailleurs, des mutants *bak1* et *bik1* présentent une réponse nettement diminuée après un traitement aux peptides flg22 et elf18 (Chinchilla et al., 2007) (Figure 6).



**Figure 7: Schématisation des défenses induites par les PAMPs/DAMPs**

L'activation du complexe FLS2/BAK1/BIK1 induite par les PAMPs /DAMPs conduit à la signalisation par les MAPKs et les voies hormonales passant par le SA ou le JA ou l'ET, ce qui permet l'activation de facteurs de transcriptions tels que les WRKYs. Ces facteurs de transcription vont se fixer sur les séquences promotrices des gènes de défenses permettant leur expression. L'expression de ces gènes de défense va conduire à la synthèse de protéines PR et de phytoalexines, à un renforcement de la paroi et à la fermeture des stomates. En parallèle la perception des MAMPs/DAMPs conduit également à des échanges d'ions et notamment à une rentrée de calcium qui va activer la NADPH oxydase qui produit des FAOs qui en tant que messagers secondaires vont activer des gènes de défenses.

### 2.1.3 Les défenses induites

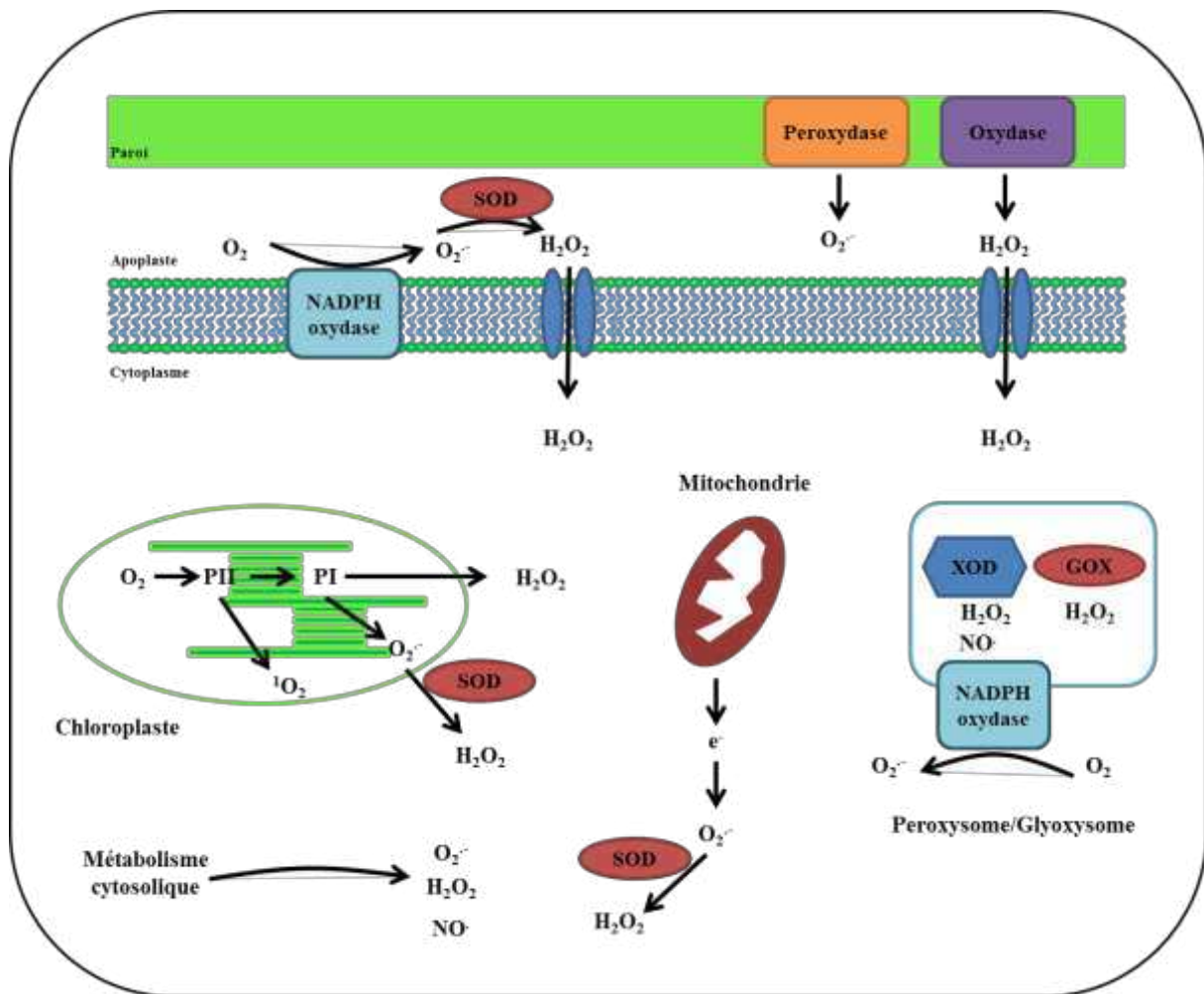
L'induction des défenses immunitaire va provoquer des changements radicaux au sein de la cellule végétale. Ces changements passent notamment par l'activation de flux ioniques (notamment en phase précoce de la détection de l'agent pathogène), par la production de formes actives de l'oxygène (ou FAOs), d'oxyde nitrique (NO), de phytohormones, de lipides comme messagers mais aussi par l'activation de cascades de signalisation conduisant à l'activation de MAPKs, par des cascades de phosphorylation. Ces événements entraînent par la suite une reprogrammation transcriptionnelle notamment par la participation de facteurs de transcriptions de type WRKY de la cellule végétale. Cette participation des facteurs de transcription, qui se déroule dans les phases plus tardives de détection (de l'ordre de l'heure), permet à la plante de produire des composés issus du métabolisme secondaire qui vont renforcer les défenses chimique préétablies telles que les phytoalexines (Hammerschmidt and Dann, 1999), des protéines PR (Pathogenesis Related) mais aussi des composés renforçant les défenses physiques préétablies comme la callose (Underwood, 2012). Une fermeture des stomates empêchant l'invasion des agents pathogènes peut également être mise en place (Melotto et al., 2008) (Figure 7).

#### 2.1.3.1 Flux d'ions

Dès les premières minutes de l'infection une modification dans les flux ioniques de la cellule se produit en particulier avec l'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). En effet, La détection de l'agent pathogène provoque un influx de calcium dans le cytoplasme de la cellule végétale. Cet influx est détecté par des senseurs primaires appelés calmodulines (CaM) et calmodulines-like (CML) qui vont directement réguler l'activité de protéines cibles. L'influx calcique est notamment décisif dans la mise en place de la HR (Bashir et al., 2013) et des mutants des canaux CNGC2 et CNGC4, canaux impliqués dans la diffusion des cations monovalent et divalent, (Zelman et al., 2012), (Cyclic Nucleotide-Gated Channels) ne font plus de HR en réponse à un pathogène avirulent (Balagué et al., 2003; Cheval et al., 2013). L'influx de calcium provoque des efflux d'ions potassium ( $\text{K}^+$ ), chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ainsi qu'un influx de proton ( $\text{H}^+$ ) par rééquilibre des charges.

#### 2.1.3.2 Les formes actives de l'oxygène et le NO

Les formes actives de l'oxygène (FAOs) sont des espèces dérivées directement de l'oxygène. Chez la plante, on trouve les ions superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le radical hydroxyde ( $\text{HO}^\cdot$ ) et l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), les formes les plus courantes étant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^-$ . Les FAOs ont longtemps été considérées comme étant uniquement toxiques pour les plantes car elles sont responsables de dommages occasionnés sur l'ADN, les protéines et les lipides lorsqu'elles sont générées à forte concentration. Cette idée a été largement revue depuis quelques années (Mittler et al., 2011). Les FAOs en faible quantité jouent un rôle de véritables messagers secondaires et sont capables de provoquer des changements transcriptionnels radicaux (Tosti et al., 2006; Straus et al., 2010). Ces FAOs sont générées en réponse au stress biotiques au niveau de plusieurs compartiments cellulaires.



**Figure 8: Origine des FAOs produites par la cellule végétale**

Les FAOs trouvent leurs origines à différentes sources. Elles sont notamment synthétisées au niveau de l'apoplaste par la NADPH oxydase qui oxyde l'oxygène en ions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Des superoxyde dismutases (SOD) utilisent ces ions superoxyde afin de synthétiser du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui passe dans le cytoplasme *via* des canaux. Dans l'apoplaste, des peroxydases peuvent également synthétiser des ions superoxyde et des oxydases du peroxyde d'hydrogène.

Des origines cytosolique existent également. Dans le chloroplaste par exemple où l'oxygène est oxydé par les photosystèmes pour donner de l'oxygène singulet d'une part *via* le photosystème II ( $^1O_2$ ) et des ions superoxyde et du peroxyde d'hydrogène *via* le photosystème I d'autre part. Le métabolisme cytosolique peut générer également des FAOs (ions superoxyde, peroxyde d'hydrogène et espèces nitrosylées ( $NO^{\cdot}$ )). Les électrons générés au niveau de la chaîne photorespiratoire mitochondriale peuvent oxyder l'oxygène afin de former des ions superoxyde qui sont dismutés à leur tour par des superoxyde dismutases cytosolique. Enfin, des réactions de synthèse des FAOs peuvent s'effectuer au niveau des peroxysomes et/ou glyoxysomes *via* des xanthine oxydases (XOD) qui génèrent du peroxyde d'hydrogène et des espèces nitrosylées. Des NADPH oxydases situées sur les membranes des peroxysomes vont également générer des ions superoxydes cytosoliques et des glycolate oxydases vont générer du peroxyde d'hydrogène. (Modifié d'après Mahalingam et Fedoroff, 2003).

(paroi, chaîne respiratoire de la mitochondrie, peroxyosome *via* la photorespiration, métabolisme cytosolique et chaîne photosynthétique du chloroplaste). La Figure 8 résume les origines de production des FAOs. Plusieurs enzymes participant à la balance oxydo-réductive existent chez la plante : par exemple la NADPH oxydase codée par les gènes *RbohD* et *RbohF* qui va provoquer un « burst oxydatif » en générant de l' $O_2^-$  lors de la détection d'un agent pathogène (Torres et al., 2006). Ce « burst oxydatif » permet notamment de provoquer la HR dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *P. syringae* pv. *Tomato* (Torres et al., 2006). En effet, des inhibiteurs de la NADPH oxydase sont capables d'abolir cette HR (Grant et al., 2000). Les gènes *RbohD* et *RbohF* ont aussi été décrits comme des régulateurs négatifs de la propagation de la mort cellulaire provoquée lors de la HR (Torres et al., 2005). Ces résultats soulignent le fait que les FAOs ont des rôles antagonistes en fonction du contexte.

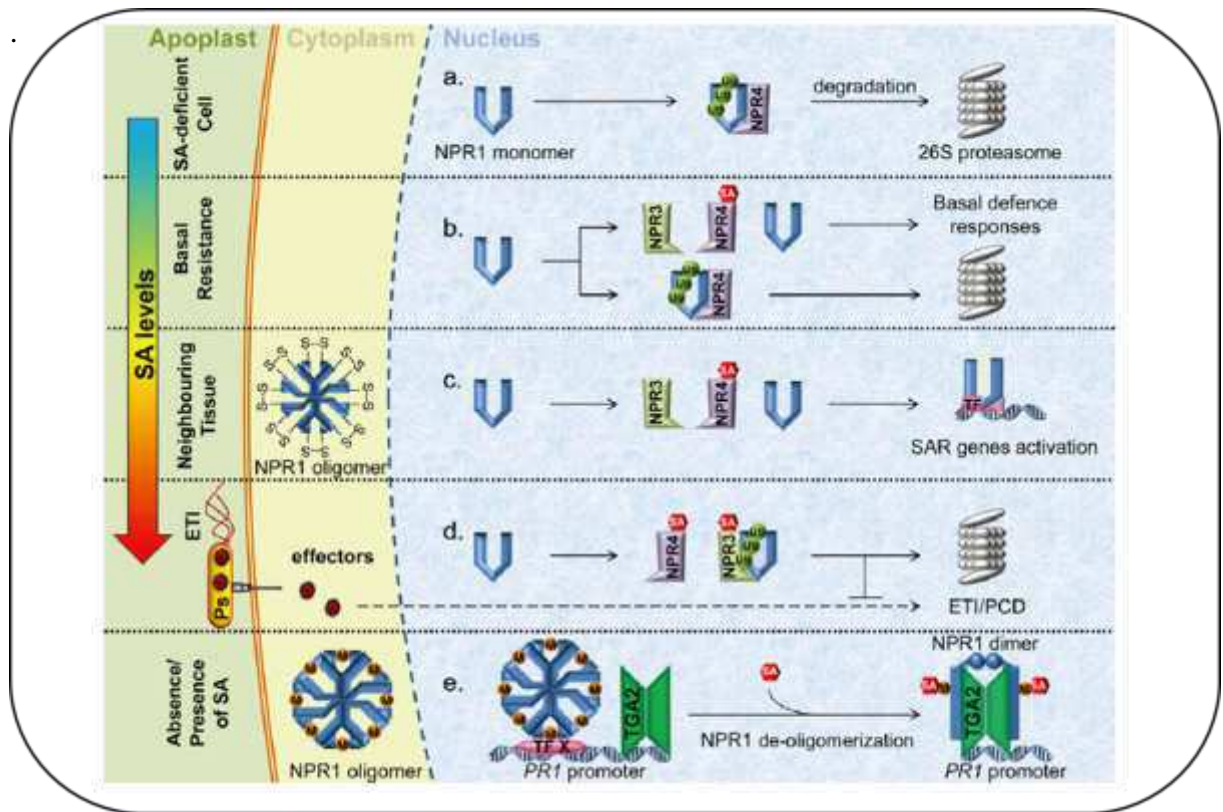
Un autre exemple d'enzyme responsable de la production de FAOs est la glycolate oxydase (GOX). Cette enzyme présente dans le peroxyosome convertit le glycolate en glyoxylate. Pendant la réaction, une molécule d' $H_2O_2$  est relarguée (Foyer et al., 2009). Récemment il a été montré que cette enzyme est une source alternative de production d' $H_2O_2$  au cours de la résistance non-hôte mais aussi dans le cas d'une interaction gène pour gène (Rojas et al., 2012). Les auteurs ont également montré que la glycolate oxydase fonctionne indépendamment de la NADPH oxydase dans le cas d'une résistance non-hôte. Ces résultats montrent que les mécanismes de résistance passant par les FAOs sont spécifiques de l'interaction.

L'oxyde nitrique (ou NO) produit *via* la nitrate réductase ainsi que par les enzymes à activité Nitric oxyde synthase peut être également produit au cours de l'interaction avec un agent pathogène. Il a notamment un rôle de messenger secondaire dans le cas d'une HR (Sun and Li, 2012). De plus, pendant les réponses de défenses, certaines protéines sont S-nitrosylées par le NO provoquant ainsi leur relocalisation ou une modulation de leur activité (Bellin et al., 2013). Le NO est, de plus, impliqué dans la signalisation dépendante des phytohormones puisqu'il intervient dans la biosynthèse, la perception et la transduction des hormones de défenses comme le SA et le JA (Freschi, 2013). Ces résultats montrent l'importance du NO dans les mécanismes de défenses.

### 2.1.3.3 Les phytohormones

De façon similaire au règne animal, les plantes mettent en place des voies de signalisation dépendantes des hormones lors d'une interaction avec un agent pathogène au même titre que plusieurs processus physiologiques tels que la croissance racinaire, la différenciation cellulaire ou la multiplication cellulaire. Il existe plusieurs types de familles de phytohormones : (i) Les auxines et les cytokinines agissent de manière synergique dans le processus de division cellulaire. Indépendamment, les auxines favorisent l'élongation cellulaire tandis que les cytokinines favorisent la différenciation cellulaire. (ii) Les gibbérellines favorisent la germination et l'acide abscissique inhibe la germination. (iii) Les strigolactones contrôlent la ramification des végétaux en inhibant la croissance des bourgeons placés à l'aisselle des feuilles et (iv), les brassinostéroïdes (BR) ont un rôle dans la division cellulaire et dans la régénération de la paroi cellulaire.





**Figure 9: Représentation schématique de la perception du SA**

NPR3 et NPR4 fonctionnent comme des récepteurs au SA.

- (a) En l'absence de SA, l'interaction de NPR1 avec NPR4 conduit à sa dégradation par le protéasome.
- (b) Des concentrations faibles en SA conduisent à sa liaison à NPR4, ce qui a pour conséquence de limiter la capacité de NPR4 à agir comme une protéine de dégradation et de faibles quantités de NPR1 s'accumulent permettant ainsi l'activation des mécanismes de défense.
- (c) Des concentrations modérées en SA accumulées en réponse aux effecteurs du pathogène dans des cellules voisines (réponse systémique) entraîne aussi la liaison du SA à NPR4, ce qui limite plus fortement l'interaction NPR1-NPR4 et conduit à l'activation de la résistance systémique acquise. Une partie des protéines NPR1 interagit dans ce cas avec NPR3 ce qui entraîne sa dégradation.
- (d) Des cellules directement en contact avec un agent pathogène avirulent accumulent de fortes quantités de SA ce qui entraîne la dégradation de NPR1 par NPR3 et l'inhibition de la mort cellulaire programmée.
- (e) Selon l'hypothèse de Wu, 2012, NPR1 pourrait fonctionner comme le récepteur du SA. La forme oligomère du SA contient des ions cuivre ce qui faciliterait la liaison du SA. Dans des conditions réductrices et en présence de SA, NPR1 serait converti sous forme de monomère et pourrait exercer son activité régulatrice sur la transcription des gènes. (Adapté d'après Wu et al., 2012)

Enfin, il existe trois hormones impliquées de près à l'interaction entre la plante et un agent pathogène. Ce sont l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Ces hormones ont été largement étudiées et ce dans un grand nombre d'interactions. Ces études ont permis de démontrer qu'il existe des liens synergiques et antagonistes entre ces trois hormones mais également entre ces trois hormones et les hormones plus impliquées dans les processus développementaux (Kunkel and Brooks, 2002; Thaler et al., 2012). Dans cette partie je décrirai les hormones SA, JA et ET.

Le SA est une hormone dont la biosynthèse dépend de deux voies, de l'isochorismate synthase dans les chloroplastes, le précurseur de synthèse étant l'isochorismate. Mais aussi de la voie des phénylpropanoïdes dans le cytoplasme des cellules végétales, le précurseur étant dans ce cas la phénylalanine. Le SA existe sous plusieurs formes, il peut être glycosylé (SAG) par une SA glucosyltransférase ce qui le stabilise et lui permet d'être transporté d'une partie de la plante à une autre (Pieterse et al., 2012). Il peut être méthylé (MeSA) par une SA carboxyl méthyltransférase lui permettant ainsi de servir de protecteur pour les autres feuilles d'une plante infectée par des insectes herbivores en attirant des parasites des insectes herbivores (James and Price, 2004). Plusieurs acteurs clés ont été identifiés dans la voie SA. C'est le cas des gènes *PAD4* et *EDS1* qui activent la synthèse de SA lors de la détection d'un agent pathogène en interagissant avec *ICS1* et *EDS5*.

L'accumulation de SA va provoquer une modification de l'homéostasie redox du cytoplasme de la cellule végétale en rendant l'environnement du cytoplasme réducteur. Ce changement dans le statut redox provoque la monomérisation de la protéine NPR1, élément central dans la signalisation de la voie SA. Présent à l'état d'oligomère NPR1 va être réduit par des thioredoxines TRHX3/TRHX5 au niveau des ponts disulfures liant les monomères de NPR1. Les monomères issus de cette réduction sont ensuite transloqués dans le noyau. Ils vont ensuite interagir avec des facteurs de transcription de type TGA et WRKY qui se lient aux promoteurs des gènes de réponse au SA provoquant ainsi leur transcription. Des régulateurs négatifs tels que *SNI1* et *NIMIN* limitent l'expression des gènes de la voie SA (Pieterse et al., 2012).

Enfin, il a été montré récemment que le SA a comme récepteurs NPR3 et NPR4 au même titre que NPR1. En effet, NPR1 et NPR4 interagissent en absence de SA provoquant ainsi la dégradation de NPR1 *via* le protéasome. Lorsque le SA est en faible concentration NPR4 lie le SA et se dissocie de NPR1 permettant ainsi une accumulation de monomères de SA qui activeront les défenses de manière modérée. A une concentration moyenne de SA dans des cellules voisines d'une cellule infectée, NPR4 lie le SA limitant un peu plus l'interaction entre NPR1 et NPR4 conduisant ainsi à la résistance systémique acquise. Une partie des protéines NPR1 interagit avec NPR3 ce qui conduit à la dégradation de NPR1. Lorsque les cellules sont en contact direct avec un agent pathogène avirulent, elles accumulent beaucoup de SA ce qui entraîne une interaction importante entre NPR1 et NPR3. Ceci entraîne la dégradation de NPR1 et l'inhibition de la mort cellulaire programmée (Wu et al., 2012; Fu and Dong, 2013) (Figure 9).

Le JA est une hormone de type lipidique issue de la voie des oxylipines. Sa synthèse commence par une libération de l'acide linoléique issu des membranes des cellules. Une fois cet



acide libéré, des enzymes telles que des lipoxygénases (LOX) vont le transformer en hydroperoxide. Cette molécule sera ensuite transformée en cyclopentones (OPDA) par l'intermédiaire des allènes oxydes synthase (AOS) et des cyclases. Cette formation de cyclopentones se fait dans le chloroplaste. L'étape suivante est peroxyssomale où les cyclopentones sont réduits puis oxydés en JA. Ce n'est que dans le cytoplasme que le JA est converti sous ses formes actives, le méthyl jasmonate (MeJA) d'une part par des carboxyl méthyl transférases (JMT) et le JA-isoleucine (JA-Ile) par une JA conjugate synthase (JAR1) (Wasternack and Hause, 2013). Le MeJA est une forme volatile qui permet la communication d'une plante agressée par un agent pathogène aux autres plantes pouvant potentiellement être agressées

L'un des éléments clé de la signalisation du JA est la protéine COI1 considérée comme le récepteur du JA-Ile (Yan et al., 2009). Il a notamment été montré que la protéine COI1 est nécessaire pour la résistance contre des pathogènes nécrotrophes (Guo and Stotz, 2007). Le JA-Ile se lie au complexe SCF<sup>coi1</sup> (pour E3 ubiquitin ligase SKP1-cullin-Fbox complex). Par la suite, le complexe SCF<sup>coi1</sup> se lie aux protéines JAZ *via* leur domaine J. Cette liaison va permettre au complexe d'ubiquitiner ces protéines JAZ qui seront dégradées par la machinerie du protéasome 26S. Les protéines JAZ sont des répresseurs transcriptionnels des gènes de réponse au JA. L'un des régulateurs les plus étudiés de la voie JA est MYC2. Ce dernier coordonne les défenses dépendantes du JA en régulant deux voies différentes de la signalisation JA c'est-à-dire la voie MYC associée à la résistance contre les insectes herbivores et les blessures et la voie ERF associées à la résistance contre les pathogènes nécrotrophes qui dépend également de l'éthylène. MYC2 induit notamment l'expression des gènes marqueurs *VSP2* et *LOX2* (Pieterse et al., 2012; Kazan and Manners, 2013). Les gènes marqueurs *PDF1.2* et *ERF1* sont induits par le JA et l'ET ce qui montre qu'il existe une synergie entre les voies JA et ET. Ce synergisme entre les deux voies conduirait notamment à établir la réponse systémique induite (ou ISR) (Pieterse et al., 2009).

L'éthylène est une molécule gazeuse de formule C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Son rôle en tant qu'hormone végétale a été découvert en 1901. En effet, les arbres dont les feuilles se trouvaient à proximité des lampadaires à bec de gaz tombaient précocement ce qui suggérait que ce composé pouvait avoir un rôle dans le processus de sénescence des feuilles. Ce n'est que pendant les années 60 que l'éthylène a été dosé pour la première fois dans les plantes par chromatographie en phase gazeuse. Ce composé est synthétisé à partir du S-adénosylméthionine (SAM) converti par l'ACC synthétase en 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique qui lui-même est à son tour décarboxylé par l'ACC oxydase pour former de l'éthylène. Plusieurs récepteurs membranaires de l'éthylène ont été décrits comme ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 et ERS2 (ETR= Ethylene Response, EIN= Ethylene INsensitive, ERS= Ethylene Response sensor). Ces récepteurs possèdent en partie N-terminale un domaine de liaison au cuivre et à l'éthylène et dans leur partie C-terminale un domaine d'interaction avec le régulateur négatif Constitutive triple response 1 (CTR1).

La voie de signalisation de l'éthylène passe par une dégradation de facteurs *via* le protéasome. Le régulateur CTR1, en absence d'éthylène, est activé par les récepteurs membranaires. CTR1 induit *via* EIN2 la dégradation du facteur de transcription EIN3. En présence d'éthylène, CTR1 est inactivé ce qui empêche la dégradation de EIN3 qui s'accumule dans la cellule végétale et va induire l'expression d'autres facteurs de transcriptions tels que le facteur Ethylene Response

Factor 1 (ERF1) (Guo and Ecker, 2004; Yoo and Sheen, 2008). Le gène *ERF1*, lorsqu'il est activé, permet à son tour d'activer l'expression d'autres gènes de défenses comme le marqueur *HEL* (Kunkel and Brooks, 2002). Le rôle de l'éthylène dans les mécanismes de défenses des plantes n'est pas toujours très clair. En effet, des mutants de perceptions ou de signalisation de l'ET ne répondent pas de la même manière à un même agent pathogène et des résultats contradictoires peuvent être trouvés dans la littérature (van Loon et al., 2006a).

Des connexions entre les voies de signalisation entre le SA et l'ET existent. Par exemple, l'ET serait un régulateur négatif des réponses dépendantes du SA. EIN3 et EIL1 répriment alors le gène *SID2* responsable de la synthèse de SA (Chen et al., 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Enfin, malgré le fait que les hormones SA, JA et ET soient connues pour leur implication dans les défenses des plantes, cela ne cantonne pas les autres hormones végétales à un rôle uniquement porté sur le développement de la plante. C'est le cas par exemple de l'auxine qui a un rôle important dans l'établissement de la résistance systémique acquise (ou SAR<sup>2</sup> pour Systemic Acquired Resistance), comme l'atteste l'étude de (Truman et al., 2010). Les auteurs ont montré que l'inoculation de mutants de biosynthèse ou de perception de l'auxine par une souche avirulente de *P.syringae* pv. *tomato* (AvrRPM1) puis par une souche virulente *P.syringae* pv. *maculicola* ne peuvent plus établir de SAR, ce qui montre que l'auxine est importante dans l'établissement d'une SAR efficace. L'ABA a aussi un rôle important dans les défenses, il aurait un rôle positif pendant l'interaction entre *A. thaliana* et *P. syringae* virulent et avirulent en provoquant la fermeture des stomates empêchant ainsi l'entrée de l'agent pathogène dans la plante (Melotto et al., 2006). Les GAs quant à eux participent à la tolérance contre les agents pathogènes biotrophes et à la sensibilité contre les agents pathogènes nécrotrophes (Navarro et al., 2008).

#### 2.1.3.4 Les lipides

Des études portant sur lipides et plus particulièrement sur la classe des sphingolipides<sup>3</sup> montrent de plus en plus le rôle de ces molécules comme messagers participant à la mort cellulaire programmée et notamment à la HR (Berkey et al., 2012). Chez le champignon *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* la toxine AAL secrétée est un analogue structural des sphingosines (W. Thomas Shier, 1995). Cette toxine est nécessaire pour le pouvoir pathogène du champignon et est un inducteur de la mort cellulaire programmée (Wang et al., 1996). De même que la fumonisine B1 induit la mort cellulaire associée avec la production de FAOs, de déposition de callose et l'expression de gènes *PR*, des processus impliqués lors du déclenchement de la HR (Stone et al., 2000). Des approches de génétique classique ont permis d'isoler des mutants d'*A. thaliana* présentant des lésions spontanées de type HR (appelés LMM pour Lesion Mimic-Mutants) dont certains expriment constitutivement des gènes *PR* dépendant du SA. Certains gènes identifiés dans ce type de génétique sont impliqués dans le métabolisme des lipides

<sup>2</sup> Réponse de résistance qui se généralise à la plante entière.

<sup>3</sup> Lipides composés d'une sphingosine, d'un acide gras à longue chaîne, d'un ester d'acide phosphorique et/ou d'une base azotée, d'un oligosaccharide ou d'un monosaccharide

(Lorrain, 2003; Moeder and Yoshioka, 2008). Parmi ces gènes on trouve *FBR11* qui code une sous-unité de la sérine palmitoyltransférase (Chen et al., 2006, 1), *ACD5* qui code une ceramide kinase (Wang et al., 2008) et *ACD11* qui code un transporteur de sphingolipide (Brodersen et al., 2002). Des approches de génétique inverse ont permis d'identifier d'autres gènes tels que *LCB2* une autre sous-unité de la sérine palmitoyltransférase (Dietrich et al., 2008), et des gènes *LOH1/2/3* qui codent une ceramide synthase (Markham et al., 2011). Enfin, le facteur de transcription MYB30 d'*A. thaliana* qui a été décrit comme étant un régulateur positif de la HR (Vailleau et al., 2002) contrôle l'expression de gènes codant 4 sous-unités enzymatique du complexe d'élongation acyl-coA requis pour la biosynthèse des Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA) ou acides gras à très longue chaîne (Raffaele et al., 2008). Les auteurs énoncent que la HR serait régulée positivement par MYB30 en activant transcriptionnellement des gènes du métabolisme des VLCFA qui serviraient de messagers secondaires dans l'induction de la HR. Plus tard la même équipe a montré que l'effecteur XopD de la bactérie (*Xcv*) interagit avec MYB30 conduisant à l'inhibition de l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour le complexe d'élongation des VLCFA ce qui supprime la mise en place de la HR (Canonne et al., 2011). La HR dans l'exemple de MYB30 est finement régulée d'une part par des mécanismes d'ARN-silencing (Froidure et al., 2010) et par ubiquitination d'autre part (Marino et al., 2013) empêchant ainsi à ce mécanisme d'induction de la mort cellulaire de s'emballer. L'ensemble de ces études montre le rôle important des lipides dans les mécanismes de la mort cellulaire programmée et les régulations fines permettant de contrôler cette mort cellulaire programmée.

#### 2.1.3.5 Signalisation par les MAPK

Les MAPKs sont des kinases à sérine/thréonine qui sont activées en amont de différentes voies de signalisation. Cette activation va conduire à la régulation de nombreux processus cellulaires comme la mitose, la survie des cellules et l'apoptose par exemple. Chez les plantes se sont des médiateurs en réponse à plusieurs stress tel que le stress osmotique, le stress froid et le stress oxydatif (Rodriguez et al., 2010; Sinha et al., 2011). Ces résultats montrent que les MAPKs sont omniprésentes dans les processus de développement de la plante.

Les MAPKs sont activées par phosphorylation par des MAPK kinases (MAPKKs) qui sont elles-mêmes phosphorylées par des MAPKK kinases (MAPKKKs) qui sont activées en amont par un stimulus. Les MAPKs une fois activées vont phosphoryler des protéines en aval de la signalisation (comme des facteurs de transcription). Cette phosphorylation va permettre de déclencher les processus cellulaires décrits ci-dessus.

Les MAPKs ont également un rôle crucial dans les défenses des plantes. Elles sont impliquées non seulement dans des voies de signalisation de la PTI en réponse aux PAMPs/MAMPs et aux DAMPs mais également dans les mécanismes mettant en jeu la défense contre les effecteurs et la HR (Meng and Zhang, 2013). Dans le cas de la PTI, lorsque les récepteurs FLS2 et EFR sont stimulés, les MAPKs 3, 6, 4 et 11 sont activées. La chitine des champignons phytopathogènes et les protéines NLPs (Nep1-like proteins) des oomycètes conduisent également à l'activation des MAPKs 3,4 et 6 (Qutob et al., 2006; Miya et al., 2007). Lorsque les bactéries et les champignons injectent des effecteurs dans la cellule les MAPKs peuvent être également activées. C'est le cas

de l'effecteur fungique Avr9 qui active les MAPKs dans des cultures cellulaires de tabac et dans les feuilles (Romeis et al., 1999), mais aussi de l'effecteur AvrRpt2 porté par *P. syringae* qui provoque une activation prolongée des MAPKs 3 et 6 par rapport à une souche de *P. syringae* qui ne produit pas cet effecteur (Underwood et al., 2007). Dans le cas de l'activation des MAPKs pendant la HR il a été montré que la MAPKKKε est un régulateur positif de la HR (Melech-Bonfil and Sessa, 2010). De même, une cascade de MAPKs permet de générer des FAOs issues du chloroplaste conduisant à la HR (Liu et al., 2007). Ces résultats montrent que les MAPKs sont également omniprésentes pour assurer les défenses de la plante.

### 2.1.3.6 Les facteurs de transcription de type WRKY

Ces facteurs de transcription portent la dénomination « WRKY » car ils possèdent un domaine de fixation à l'ADN qui contient une ou deux fois la séquence en acides aminés très conservée constituée d'un tryptophane (W), d'une Arginine (R), d'une lysine (K) et d'une tyrosine (Y) (Rushton et al., 1996). Ces facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation ainsi que des domaines divers comme un domaine NLS, et/ou un domaine leucine-zipper (Eulgem et al., 2000). De nombreuses études indiquent que les facteurs de transcription de type WRKY sont impliqués dans les défenses des plantes. C'est le cas par exemple des gènes codant pour WRKY54 et WRKY70 d'*A. thaliana* qui ont été identifiés comme ayant la capacité de cibler NPR1 (Wang et al., 2006). Le gène *WRKY54* est d'ailleurs un régulateur positif de la résistance non-hôte d'*A. thaliana* contre *E. amylovora* au même titre que le gène *WRKY46* tandis que le gène *WRKY70* est un régulateur négatif (Moreau et al., 2012). Le gène *WRKY45* chez le riz est quant à lui un régulateur positif de la résistance contre le champignon phytopathogène *M. grisea*. Ce gène est induit après un traitement avec un analogue du SA le benzothiadazole (BTH) (Shimono et al., 2007). Les gènes *WRKY18* et *WRKY40* d'*A. thaliana* régulent quant à eux positivement les gènes de la voie JA contre l'agent pathogène *Blumeria graminis* (*B. graminis*) (Pandey et al., 2010). D'autres études ont montré que les WRKY et les MAPKs sont connectés. En effet, la MAPK 4 et WRKY33 forment un complexe avec MAPK substrate 1 (MKS1). Ce complexe se dissocie en cas d'attaque par un agent pathogène ce qui permet la liaison de WRKY33 au promoteur du gène *PAD3* (pour PhytoAlexine Deficient 3) qui est un marqueur de la voie de l'acide jasmonique (Qiu et al., 2008). Ces résultats montrent que les facteurs de transcription de type WRKY sont des facteurs importants dans la transduction du signal pour les défenses des plantes.

Numéro	Identifié chez la plante	Taille (kDa)	Fonction/rôle	Référence
PR1	Tabac	15	Anti-fongique	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR2	Tabac	30	$\beta$ -1,3-Glucanase	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR3	Tabac	25-30	Chitinase (classe I,II, IV,V,VI,VI)	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR4	Tabac	15-20	Chitinase (classe I,II)	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR5	Tabac	25	Thaumatine-like	Van Loon <i>et al.</i> , 1982
PR6	Tomate	8	Inhibiteur de protéase	Green <i>et al.</i> , 1972
PR7	Tomate	75	Endoprotéase	Vera <i>et al.</i> , 1988
PR8	Concombre	28	Chitinase (classe III)	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR9	Tabac	35	Peroxydase	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR10	Persil	17	Ribonucléase-like	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR11	Tabac	40	Chitinase (classe I)	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR12	Radis	5	Défensine	Terras <i>et al.</i> , 1995
PR13	Arabidopsis	5	Thionine	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR14	Orge	9	Protéine de transfert de lipide	Garcia-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR15	Orge	20	Oxalate oxidase	Zhang <i>et al.</i> , 1981
PR16	Orge	20	Oxalate oxidase-like	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR17	Tabac	24-26	Peptidase putative	Okushima <i>et al.</i> , 2000

**Tableau 2: Liste des protéines PR et leur fonction**



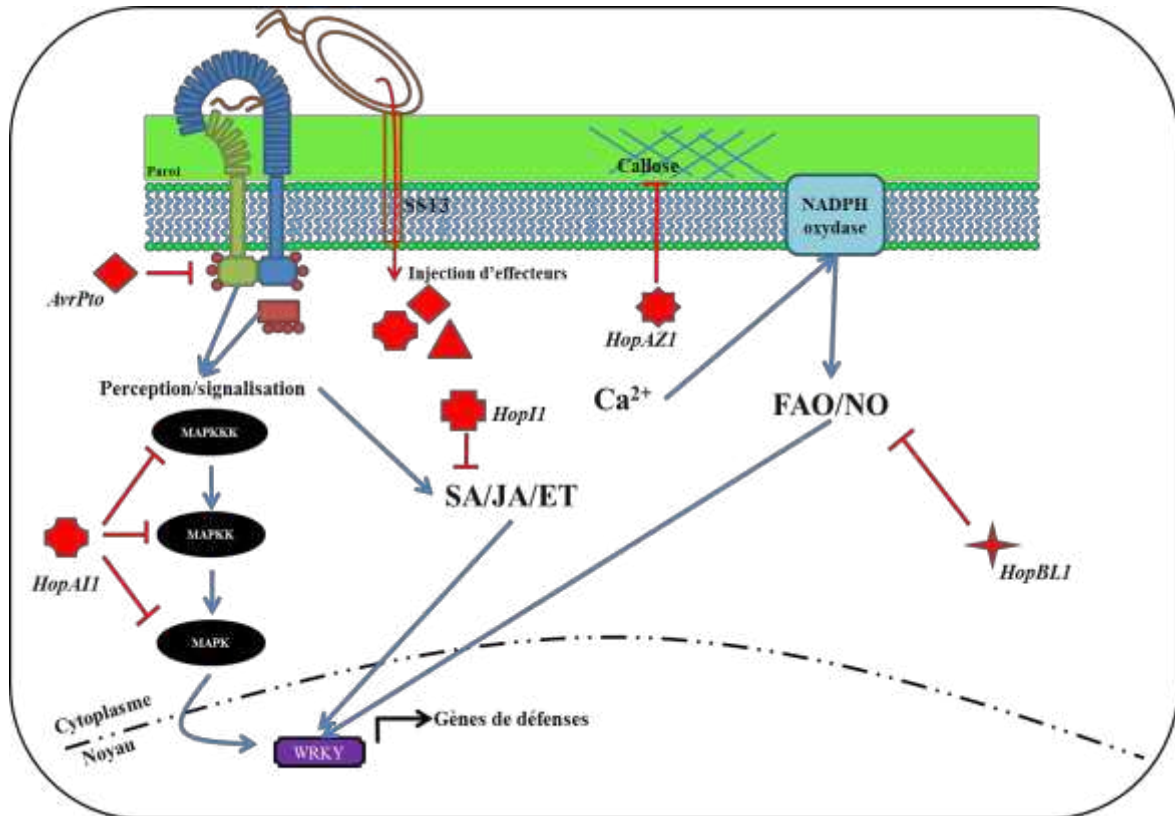
### 2.1.3.7 Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des composés induits après la détection d'un agent pathogène contrairement aux phytoanticipines qui appartiennent aux défenses chimique préformées (cf. §III.1.2). Les phytoalexines sont de faible poids moléculaire et de nature hétérogène. En effet, on trouve des isoflavonoïdes comme la pisatine du pois qui est toxique contre *Fusarium solani* f.sp.*pisi*, des stilbènes comme le resvératrol qui permet à la vigne de résister à une attaque de *B. cinerea*, de coumarines comme la méthoxymelléine de la carotte qui lui permet de résister à l'attaque du champignon *Ceratocystis fimbriata*, et des terpénoïdes comme le capsidiol qui contribue à la résistance du poivron vis-à-vis du champignon phytopathogène *Phytophthora capsici*. Les phytoalexines sont caractéristiques d'une espèce végétale considérée indépendamment de l'agent pathogène inducteur (Egea et al., 1996; Hirai et al., 2000; Macheix et al., 2005).

Une phytoalexine bien connue, la camalexine est synthétisée par différentes espèces de plantes. Elle est majeure chez la brassicacée *A. thaliana*. Cette phytoalexine lorsqu'elle est synthétisée, permet de lutter contre une large gamme d'agents pathogènes (biotrophes et nécrotrophes) ainsi qu'en réponse aux PAMPs/MAMPs (Bednarek, 2012). Le précurseur de ce composé est le tryptophane qui subit plusieurs étapes de conversion par des protéines de la famille des cytochromes P450. L'avant dernier composé de la voie de biosynthèse de la camalexine se nomme l'acide dihydro-camalexique. Ce composé est convertit en camalexine par le cytochrome CYP71B15, appelé PAD3 (Ahuja et al., 2012).

### 2.1.3.8 Les protéines PR

Les protéines PR sont des protéines solubles qui s'accumulent suite à l'infection par un agent pathogène. Elles furent identifiées en 1970 sur des feuilles de tabac inoculées par le virus de la mosaïque du tabac. Elles sont classées en 17 familles selon leur activité biochimique. L'accumulation de certaines de ces protéines dépend des voies des phytohormones montrant ainsi l'importance des voies hormonales dans la réponse aux agents pathogènes. Par exemple les protéines PR1, PR2 et PR5 dépendent du SA tandis que PR12 dépend de la voie JA. Les protéines PR3 et PR4 dépendent elles de l'ET et PR13 dépend des voies JA/ET. Ces exemples de protéines PR sont utilisés comme marqueurs des voies dépendantes de ces hormones. Certaines protéines PR ont des activités chitinase (PR3, PR4 et PR11), glucanase (PR2) ou endoprotéase (PR12, PR13). D'autres génèrent des FAOs (PR15, PR16) ou servent à détoxifier des FAOs (PR9). Enfin, PR14 a une activité de transfert de lipides (van Loon et al., 2006b) (Tableau 2).



**Figure 10: Contournement de la défense induite par les PAMPs**

Les bactéries phytopathogènes sont capables d'injecter des effecteurs de type 3 dans la cellule végétale (représentés en rouge). Ces effecteurs vont supprimer les défenses induites lors de la détection de l'agent pathogène. Cette suppression s'exerce à plusieurs niveaux. Les effecteurs vont inhiber la transduction du signal de perception de l'agent pathogène conduite par les MAPKs (Exemple de AvrPto). Ils vont également inhiber la signalisation conduite par les hormones (Exemple de HopI1). Ils peuvent inhiber les enzymes de formation des FAOs (Exemple de HoBL1). Ils peuvent empêcher le renforcement de la paroi en inhibant la formation d'un dépôt de callose (Exemple de HopAZ1).

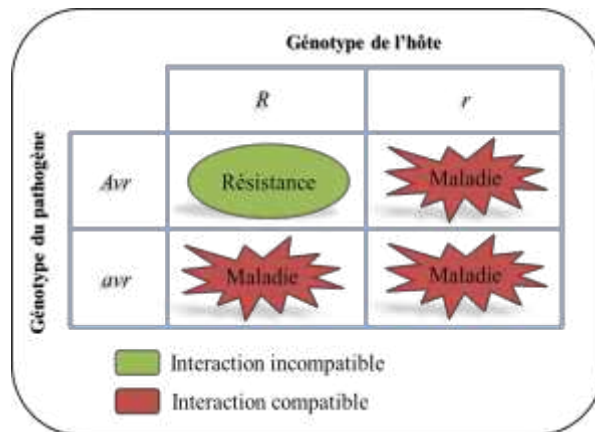
## 2.2 Contournement de la défense induite par les PAMPs

Suite à la reconnaissance ou en réponse à un agent pathogène, les plantes sont capables de mettre en place un grand nombre de réactions de défense. Certains pathogènes se sont adaptés de façon à pouvoir contourner les défenses induites lors de la PTI (Figure 10). Afin d'éviter d'être reconnus par les PRR, des PAMPs comme le lipopolysaccharide ou la flagelline peuvent évoluer c'est-à-dire subir des modifications dans leur composition. C'est le cas de *R. solanacearum* qui possède une séquence du peptide flg22 qui n'est pas reconnu par la plante *A. thaliana* empêchant ainsi la mise en place des défenses (Pfund et al., 2004). C'est aussi le cas de certaines bactéries symbiotiques comme *Sinorhizobium meliloti* qui ne doivent pas être détectées par la plante comme étant un agent pathogène (Tellström et al., 2007). Les modifications post-traductionnelles des flagellines de *P. syringae* pv. *glycinea* comme leur glycosylation peuvent aussi empêcher la reconnaissance de cet agent pathogène (Takeuchi et al., 2003; Taguchi et al., 2006).

Une autre stratégie pour contourner les défenses induites par les PAMPs est l'utilisation d'effecteurs de type 3 qui vont supprimer la PTI. Cette suppression de la PTI par les effecteurs se nomme Effector Triggered Susceptibility (ETS). Un exemple de bactérie phytopathogène qui utilise cette stratégie de contournement est la bactérie *P. syringae* dont plusieurs de ces 40 effecteurs sont capables de bloquer la PTI (Block and Alfano, 2011). Par exemple les effecteurs HopF2 (ADP ribosyl-transférase) et HopAII (une phosphotréonine lyase) empêchent l'activation des MAPKs 3 et 6 lors de la détection de la bactérie. HopF2 et HopAII empêche la phosphorylation de MKK5 par déphosphorylation directe (Li et al., 2007; Wang et al., 2010). L'effecteur AvrPphB quant à lui qui est une cystéine protéase clive le corécepteur BIK1 empêchant ainsi la transduction du signal lors de la détection d'un agent pathogène par le complexe-récepteur FLS2-BAK1 (Zhang et al., 2010). Chez la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) l'effecteur AvrAC cible la protéine BIK1 en ajoutant sur les sites conservés de phosphorylation de BIK1 une uridine-5-monophosphate grâce à son activité uridylyltransférase (Feng et al., 2012). Un autre exemple, est la bactérie Xcv dont les effecteurs XopB et XopS suppriment l'expression de gènes de défenses de la PTI. Cependant les mécanismes de cette suppression restent inconnus (Schulze et al., 2012). Chez le champignon phytopathogène *M. grisea* l'effecteur AvrPiz-t supprime la génération de FAOs induite suite à la reconnaissance de Flg22 et de la chitine permettant ainsi d'augmenter la sensibilité du riz au champignon. Ceci indique que l'effecteur AvrPiz-t de *M. grisea* est capable de supprimer la PTI. Tous ces exemples montrent que les agents pathogènes ont mis au point plusieurs types de stratégies qui leur permettent de contrecarrer les défenses menées *via* la PTI.

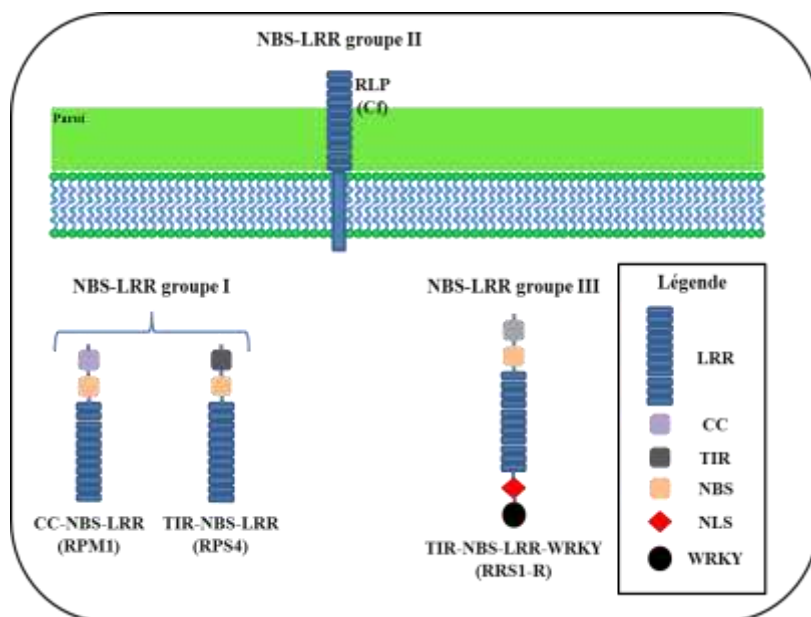
Au regard de ces études il n'est pas difficile de remarquer que les bactéries possèdent un avantage sur les plantes grâce à l'injection d'effecteurs qui leur permettent d'inhiber les défenses des plantes. Cependant les plantes ne restent pas sans défenses face à ces effecteurs. En effet au cours de l'évolution elles se sont adaptées pour reconnaître certains de ces effecteurs de type 3. Cette reconnaissance constitue l'immunité spécifique des plantes et se nomme l'Effector Triggered Immunity (ETI). Je vais maintenant décrire l'ETI en m'intéressant à sa mise en place de cette défense et à son contournement.





**Figure 11: Le modèle de Flor (ou modèle gène-à-gène)**

La présence d'un gène de résistance (*R*) chez la plante et de l'allèle dominant *Avr* du gène d'avirulence chez l'agent pathogène conduit à la reconnaissance du pathogène par la plante. Cette dernière déclenche la réaction dite hypersensible (HR) conduisant à une réaction incompatible. Dans le cas d'absence de gène de résistance (*r*) ou du gène d'avirulence (*avr*) ou d'hétérozygotie d'un des deux gènes (*R et Avr*), la maladie a lieu. On parle dans ce cas d'interaction compatible (d'après Flor, 1955).



**Figure 12: Structure des protéines de résistance R**

Les protéines de résistance R sont classées en 3 groupes. Le groupe I est constitué des CC-NBS-LRR et TIR-NBS-LRR représenté respectivement par RPM1 et RPS4. Le groupe II est constitué des protéines R à domaine extracellulaire LRR et à domaine transmembranaire représenté par les protéines Cf. Le groupe III est constitué des protéines particulières TIR-NBS-LRR possédant un domaine NLS et WRKY représenté par la protéine RRS1-R. RLP: Receptor-Like Protein; LRR: Leucine Rich Repeat; CC: Coiled-Coil; TIR: Toll-Interleukine I Receptor; NBS: Nucleotide-Binding Site; NLS: Nuclear Localization Signal.

### 3. L'immunité spécifique

#### 3.1 Le modèle gène à gène

La reconnaissance spécifique d'un effecteur (bactérien ou fongique) par la plante se fait par une protéine dite de résistance. Le modèle génétique qui explique ce type de résistance est expliqué par la théorie « gène à gène » découverte en 1956 et décrite en 1971 par Flor (Flor, 1956, 1971). D'après ce modèle, l'établissement de la résistance chez la plante dépend de la présence du gène R de résistance auquel correspond le gène Avr d'avirulence chez la bactérie ou le champignon. L'interaction entre ces deux gènes conduit à la mise en place de la résistance spécifique de la plante. Cette interaction est une réaction dite incompatible. Ceci conduit au suicide de la cellule végétale, c'est la HR qui permet d'empêcher l'agent pathogène de se propager au sein des tissus de la plante (Figure 11).

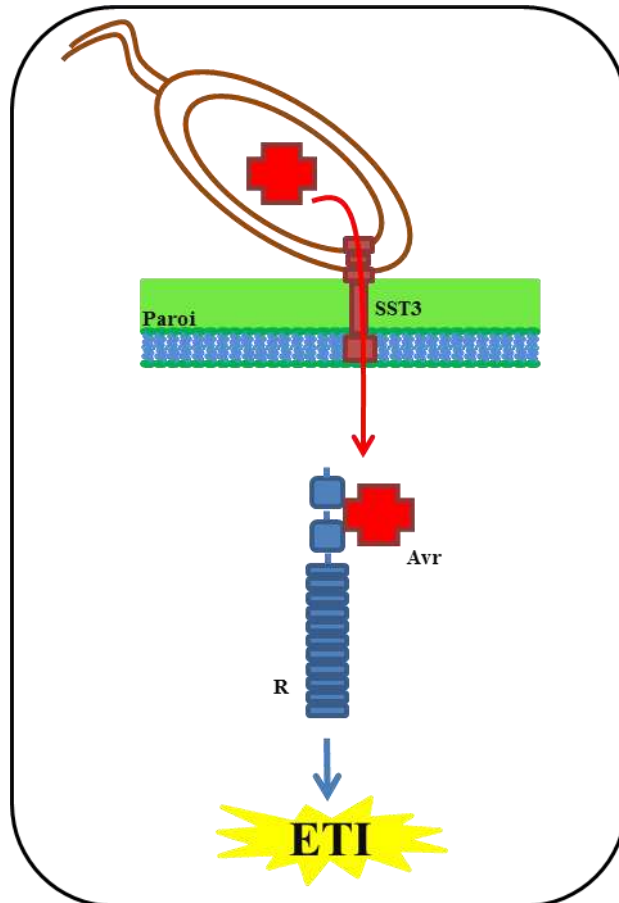
#### 3.2 Reconnaissance de l'interaction

##### 3.2.1 Les protéines de résistance

Les protéines de résistance R sont très nombreuses dans le règne végétal. Environ 150 gènes codent potentiellement des protéines R chez *A. thaliana* et environ 460 chez le riz (Chen et al., 2010; Tamura and Tachida, 2011). Ces protéines sont classées en trois groupes (Figure 12).

Le premier groupe, le plus important, est constitué de protéines de type Nucleotide-Binding Site-Leucine Rich Repeat (NBS-LRR). L'interaction entre les protéines NBS-LRR et les effecteurs de type 3 peut se faire de manière directe ou indirecte par l'intermédiaire de protéines qui forment un complexe avec les protéines NBS-LRR.

Le domaine NBS des protéines NBS-LRR est associé à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP tandis que le domaine LRR est impliqué dans les interactions protéine-protéine. Les protéines NBS-LRR peuvent être classées en deux sous-groupes de par leur différence dans leur partie N-terminale. Le premier sous-groupe est constitué des protéines CC-NBS-LRR (CC pour Coiled-Coil) et comporte 51 protéines, le second sous-groupe est constitué des TIR-NBS-LRR (TIR pour Toll-Interleukin-1 Receptor) et comporte 91 protéines. Le domaine CC a un rôle dans les interactions protéine-protéine et le domaine TIR participe à l'activation de la protéine R, à la reconnaissance des protéines Avr ou aux interactions protéine-protéine (Rafiqi et al., 2009). Un exemple de protéine R de type CC-NBS-LRR est la protéine RPM1 qui reconnaît les effecteurs bactérien AvrRPM1 et AvrB. La protéine RPS4 reconnaissant l'effecteur bactérien AvrRps4 est un exemple pour les TIR-NBS-LRR (Dangl and Jones, 2001).



**Figure 13: Reconnaissance par interaction directe entre une protéine R et Avr**

Le modèle par interaction directe est aussi appelé modèle ligand-récepteur. Dans ce modèle la protéine d'avirulence (Avr) interagit directement avec la protéine de résistance (R). Cette interaction permet le déclenchement de l'ETI.

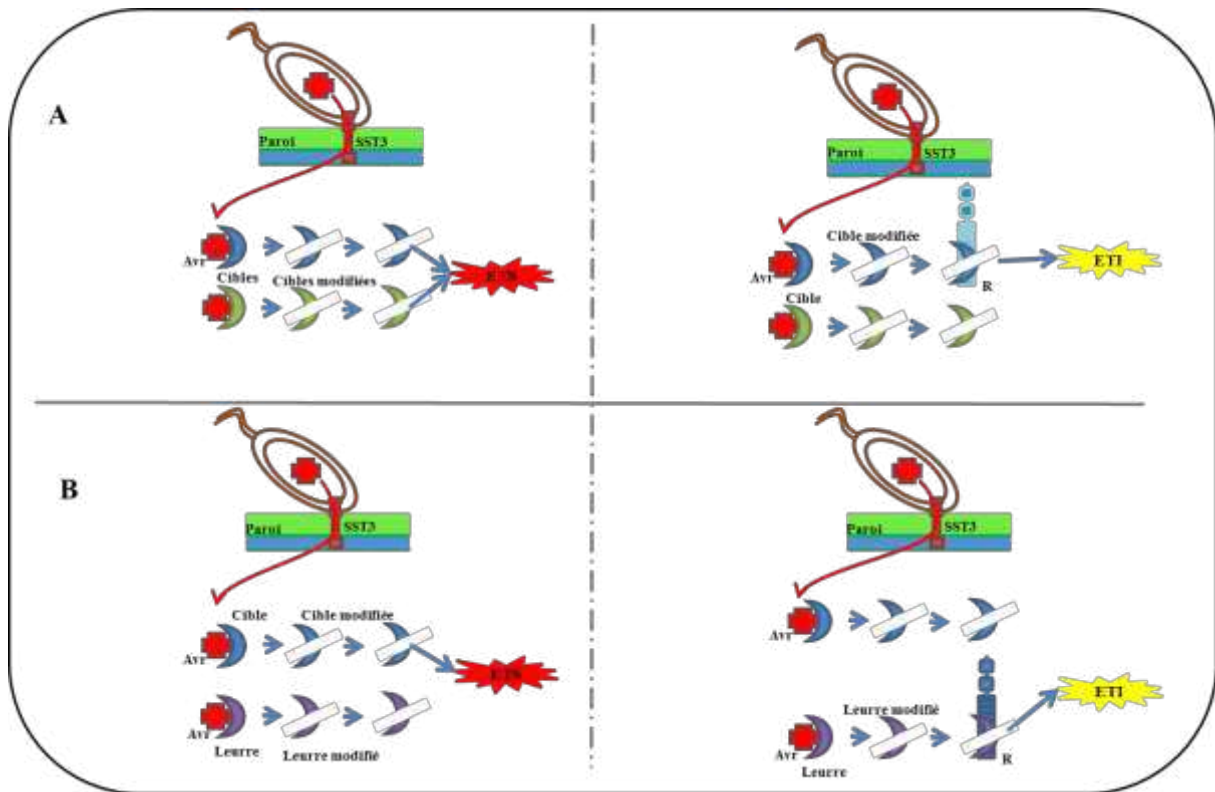
Le second groupe est constitué des protéines de résistance qui possèdent un domaine transmembranaire RLP, d'un domaine extracellulaire LRR et parfois d'un domaine kinase cytoplasmique ; ces protéines sont nommées Receptor-Like Kinase (RLK). Ce groupe est également constitué des protéines Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP). L'exemple de famille la plus représentative de cette classe est la famille des protéines Cf qui confèrent la résistance de la tomate au champignon phytopathogène *Cladosporium fulvum* (Rivas and Thomas, 2005). La protéine de résistance de type RLP, MLO, confère quant à elle la résistance de l'orge contre le champignon phytopathogène *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Opalski et al., 2005).

Enfin, le dernier groupe est constitué des protéines de résistances qui présentent une structure originale par rapport aux protéines des deux premiers groupes. Ces protéines sont au nombre de deux. La protéine RRS1 d'*A. thaliana* appartient à ce groupe. Elle permet à la plante de résister en reconnaissant l'effecteur PopP2 de *R. solanacearum*. Cette protéine R est de type TIR-NBS-LRR mais elle possède également un domaine NLS et un domaine homologue aux facteurs de transcription WRKY (Deslandes et al., 2003). Un autre exemple de protéine R présentant une structure originale est la protéine de résistance Pto de la tomate qui est une kinase cytoplasmique sans domaine LRR. L'inhibition de cette kinase par les effecteurs AvrPto et AvrPtoB permet la détection de *P. syringae* par la plante qui déclenche ses réactions de défenses (Munkvold and Martin, 2009; Ntoukakis et al., 2013).

La majorité des protéines R possède donc un domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine suggérant que la majorité des reconnaissances de type R/Avr se fait par interaction directe. En effet, plusieurs études l'ont prouvé. Néanmoins, cette reconnaissance par interaction directe n'est pas systématique. En effet, de plus en plus d'études attestent l'existence d'une reconnaissance indirecte (Luderer and Joosten, 2001). Les différents modes de reconnaissances sont présentés dans le paragraphe suivant.

### 3.2.2 Reconnaissance par interaction directe

L'exemple de la protéine de résistance Pi-ta du riz interagissant avec l'effecteur AvrPita de l'ascomycète phytopathogène *M. grisea* est l'un des premier cas d'interaction directe décrit. Les deux protéines interagissent en double hybride et *in vitro*, cette interaction est donc nécessaire pour provoquer la HR (Jia et al., 2000). Un autre exemple d'interaction directe est celui de l'interaction entre l'effecteur AvrL567 du champignon phytopathogène *Melampsora lini* et des protéines de résistances L5, L6 et L7 du lin (Dodds et al., 2006). Côté bactérie, il a été montré que l'effecteur PopP2 et la protéine de résistance RRS1 interagissent directement également (Deslandes et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que l'interaction de l'effecteur ATR1 de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* lève l'autoinhibition de la protéine de résistance RPP1 d'*A. thaliana* permettant ainsi la signalisation pour la résistance (Steinbrenner et al., 2012) (Figure 13).



**Figure 14: Reconnaissance indirecte entre une protéine R et Avr. Cas des modèles de garde et du leurre.**

A: Dans le cas du modèle de garde, la protéine d'avirulence interagit avec ses cibles dans la cellule végétale. L'effecteur va modifier ces cibles (Phosphorylation, clivage...). Cette modification conduit à l'ETS si aucune protéine R correspondante n'est présente pour détecter la modification. Lorsqu'une protéine de résistance R détecte la modification ceci déclenche l'ETI.

B: Dans le cas du modèle du leurre, la protéine d'avirulence va modifier la protéine leurre. Cette altération ne participe pas à la virulence si aucune protéine de résistance R n'est présente pour détecter cette modification. Dans le cas contraire en présence de protéine de résistance R, l'ETI est déclenchée. Le leurre est donc nécessaire au fonctionnement de la protéine R mais n'a aucune fonction dans l'établissement des défenses en absence de la protéine R correspondante.

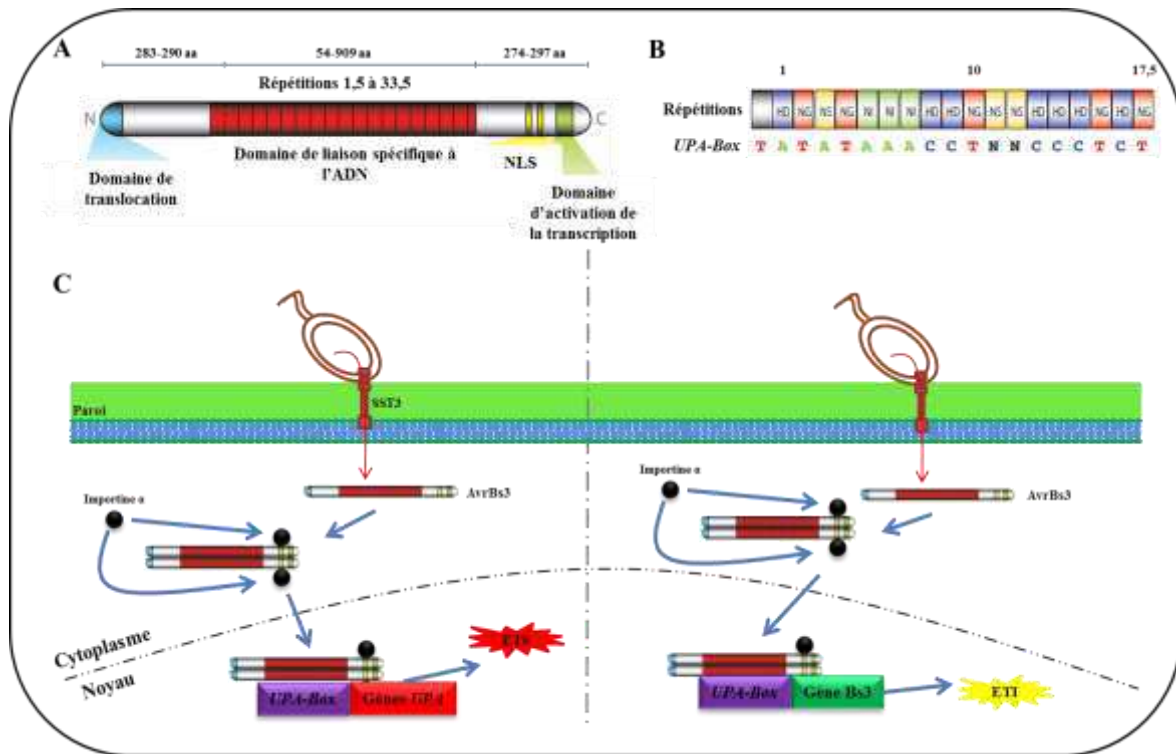
### 3.2.3 Reconnaissance indirecte

#### 3.2.3.1 Le modèle de garde

Pour certains effecteurs, des auteurs ont tenté de montrer qu'il existait une interaction directe entre un gène R et son complémentaire Avr. Malgré l'emploi de plusieurs méthodes l'interaction directe n'a pas été révélée (Luderer et al., 2001). Ces effecteurs provoquent pourtant une HR et la reconnaissance pourrait être non pas de l'effecteur directement mais plutôt de modifications perçues par la cellule végétale. Cette reconnaissance indirecte est appelée le modèle de garde (ou « Guard model ») (Van der Biezen and Jones, 1998). Les protéines R de ce modèle agissent comme des gardiens de l'homéostasie de la cellule végétale. L'altération de protéines végétales par les effecteurs est ainsi détectée par les protéines R qui déclenchent ainsi la signalisation conduisant aux défenses de la plante. Ce modèle présente un avantage pour les cellules végétales puisqu'une seule protéine de garde est capable de détecter la modification de différentes protéines de la cellule. De plus, ceci est cohérent avec le fait qu'il existe environ 150 protéines de type NBS-LRR alors que le nombre d'effecteurs est bien plus important (Dangl and Jones, 2001). L'exemple qui a permis de décrire le modèle de garde est celui de la perception de l'action de l'effecteur AvrPto par les protéines de résistances Pto et Prf (Martin et al., 1993). Les protéines Prf et Pto forment un complexe oligomérique. Les effecteurs AvrPto et AvrPtoB interagissent avec Pto et inhibent son activité kinase. Cependant cette inhibition de l'activité ne déclenche pas la HR. Des analyses par cristallographie et de biochimie du complexe Prf/Pto ont montré que ces deux protéines interagissent *via* une boucle de Pto qui maintient Prf dans un état inactif. L'interaction d'AvrPto/AvrPtoB provoque une trans-phosphorylation de Pto. Ce qui est possible puisque Pto et Prf forment un complexe oligomérique. L'inhibition de l'activité kinase et cette phosphorylation *en trans* permettent l'activation de Prf qui déclenche la signalisation conduisant à la HR. Ces résultats montrent que la kinase Pto fonctionne comme un verrou pour garder Prf sous forme inactive. Cet exemple montre que l'activité des effecteurs AvrPto et AvrPtoB modifie une protéine cible, Pto, cette modification étant détectée par la protéine de résistance Prf qui déclenche les réactions de défense. La protéine Pto est donc le gardien de la protéine de résistance Prf (Xing et al., 2007; Ntoukakis et al., 2013). Cet exemple montre de plus qu'une seule protéine R peut détecter plusieurs effecteurs permettant d'expliquer ainsi pourquoi la plante possède aussi peu de protéines de résistance R par rapport au nombre d'effecteurs d'agents pathogènes.

#### 3.2.3.2 Le modèle du leurre

La différence entre le modèle de garde et le modèle du leurre (« Decoy model ») repose sur le fait que l'altération du leurre par l'effecteur de type 3 ne participe pas à la virulence de l'effecteur (Figure 14). Lorsque la plante possède une protéine R gardant le leurre, la modification de ce leurre par l'effecteur déclenche l'ETI. Ainsi le leurre n'aura qu'un rôle dans le déclenchement de l'ETI contrairement au modèle de garde où la protéine cible aura un rôle dans la virulence de l'effecteur si la protéine R permettant la reconnaissance est absente (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Un exemple original illustrant le modèle du leurre est le cas AvrBs3/Bs3. L'effecteur bactérien AvrBs3 appartient à la famille des effecteurs Transcription Activator Like (TALs).



**Figure 15: Rôle de l'effecteur AvrBs3 de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

A: Schéma de la protéine AVRBS3. La protéine possède dans sa partie N-terminale un domaine de translocation *via* le SST3. Dans sa partie centrale la protéine possède le domaine de liaison à l'ADN dont le nombre de répétitions varie entre 1,5 et 33,5. En C-terminal la protéine possède un domaine NLS et un domaine d'activation de la transcription.

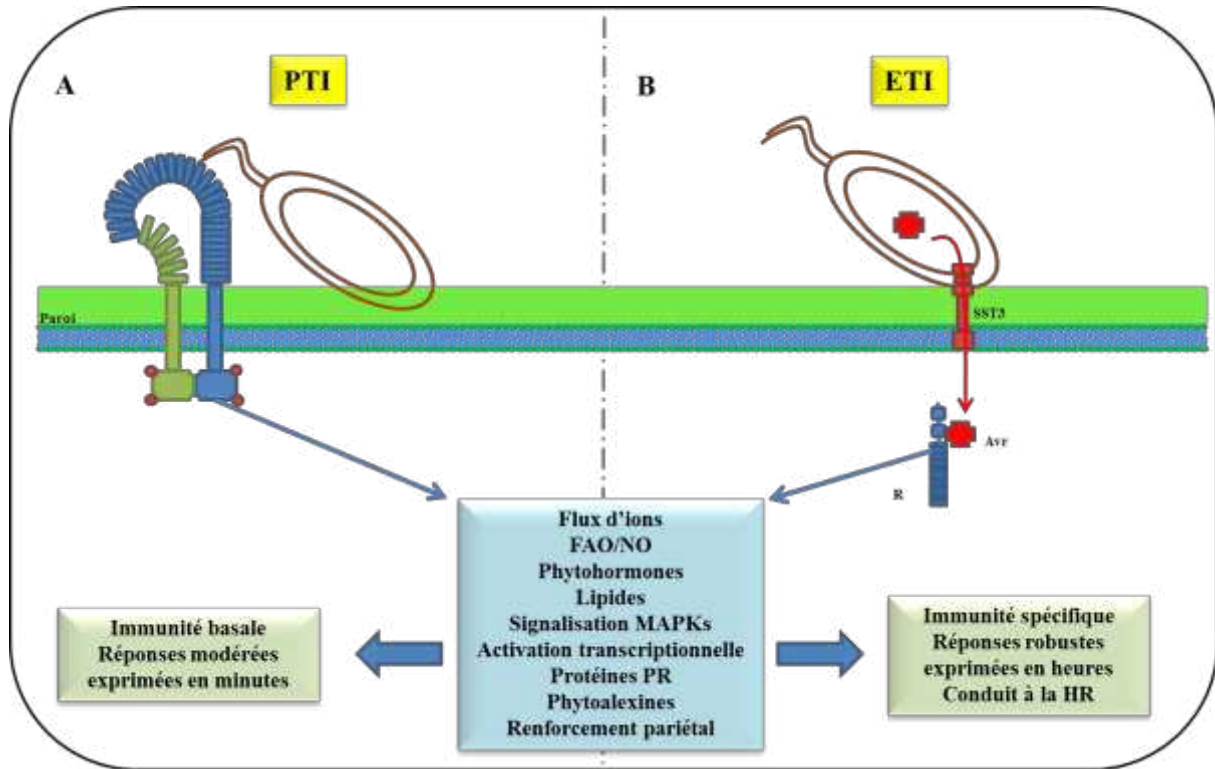
B: Structure du domaine central de liaison à l'ADN d'AVRBS3. Les 17 répétitions sont presque identiques. Les seules différences résident dans les acides aminés 12 et 13 qui sont variables dans chaque répétition. La séquence *UPA-box* représentée est la correspondance « RVD-paire de base » (Repeat Variable Diresidue).

C: Illustration du mode d'action d'AvrBs3. Une fois injecté dans la cellule végétale, l'effecteur AvrBs3 se dimérise. Des importines  $\alpha$  se lient aux domaines NLS permettant la translocation du dimère dans le noyau qui va se lier aux *UPA-box* des gènes *UPA*. Par exemple le gène *UPA20* sera transcrit et activera la transcription du gène *UPA7* qui déclenche l'ETS. Dans le cas de la présence du gène *BS3*, la liaison du dimère d'AvrBs3 provoque la transcription du gène *BS3* qui provoque l'ETI. (Modifié d'après Boch et Bonas, 2010)



Les effecteurs de cette famille possèdent une séquence de localisation nucléaire NLS et un domaine central répété qui leur permet de se dimériser et de se lier sur des séquences promotrices de l'ADN de la cellule végétale appelées UPA-box (Boch et al., 2009). Le domaine répété d'AvrBs3 comprend 17 répétitions de 34 acides aminés. Ces répétitions sont très conservées entre les différents TALs. Cependant les acides aminés 12 et 13 du domaine répété d'un effecteur TAL à l'autre sont hypervariables ce qui va permettre à chaque TAL de se lier à des séquences très spécifiques de l'ADN. Au final, chaque changement d'acide aminé d'un TAL va correspondre à une base nucléotidique de la séquence promotrice UPA-box. Ceci permet aux TALs d'activer de manière spécifique des gènes portant une séquence UPA-box dans leur promoteur qui leur sont propres (Boch et al., 2009; Boch and Bonas, 2010). Dans le cas d'AvrBs3, le gène de résistance *BS3* porte une séquence UPA-box dans son promoteur. La transcription du gène *Bs3*, qui code une flavine monooxygénase conduit à la HR (Römer et al., 2007) (Figure 15). Le rôle de la protéine *BS3* en tant que flavine monooxygénase reste inconnu mais il a été montré que le gène *FMO1* codant une flavine monooxygénase chez *A. thaliana* est important pour l'établissement de la SAR probablement en synthétisant un métabolite nécessaire à la transduction et à l'amplification d'un signal pendant les phases précoces de la SAR (Mishina and Zeier, 2006). Des analyses d'allèles de *BS3* sur plusieurs accessions de poivrons montrent que plusieurs de ces accessions portent un variant non-fonctionnel. Ces accessions ne montrent aucun trouble développemental ou physiologique ce qui suggère que *BS3* a un rôle uniquement dans la résistance. De plus, l'effecteur AvrBs3 peut se fixer sur d'autres promoteurs portant des UPA-box permettant la virulence de la bactérie. Ces arguments montrent qu'au cours de l'évolution, la plante a mis au point ce type de leurre qui agit comme mécanisme de défense. D'autres exemples comme les cas de l'effecteur Avr2 de *Cladosporium fulvum* et de la protéine leurre RC3 de la tomate ou encore de la protéine RIN4 d'*A. thaliana* illustrent l'existence du modèle du leurre (van der Hoorn and Kamoun, 2008)





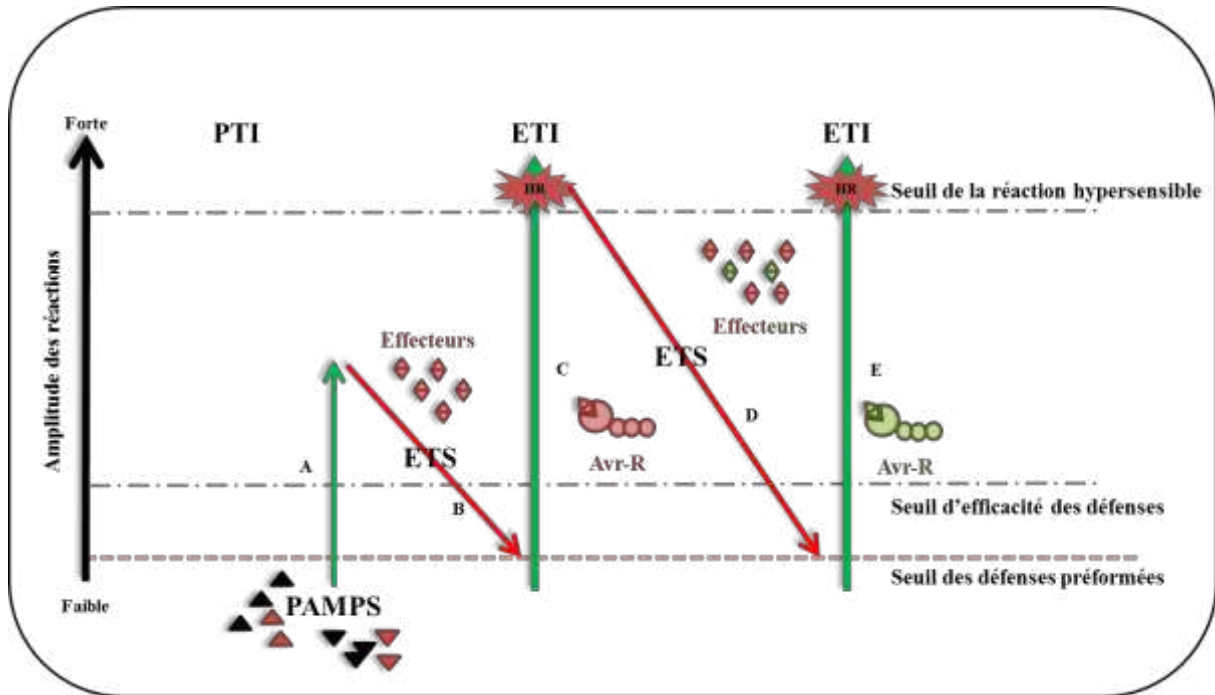
**Figure 16: Différences et similarités entre PTI et ETI**

A: Dans le cas de la PTI, la bactérie est reconnue par le récepteur de type PRR. Cette détection provoque les réactions de défenses décrites dans l'introduction. Ces réactions de défenses vont déclencher l'immunité basale qui s'exprime de manière modérée et sur une durée courte.

B: Dans le cas de l'ETI, la bactérie injecte un effecteur détecté par la protéine de résistance R comme protéine d'avirulence Avr. Cette détection provoque les mêmes réactions de défenses que dans le cas de la PTI. La différence s'exprime au niveau de la robustesse de ces réactions de défenses et au niveau de la durée de cette défense qui s'exprime plutôt en heures. Cette immunité spécifique conduit plus généralement à la mort cellulaire programmée de type HR.

### 3.3 Défenses déclenchées par l'ETI

Suite à la reconnaissance d'un effecteur par sa protéine R correspondante, une signalisation est mise en place conduisant à l'ETI. La signalisation qui conduit à la l'ETI passe par les mêmes défenses que la PTI (Flux ioniques, production de FAOs et de NO, activation des MAPKs, participation des phytohormones et des protéines PR et synthèse de composés anti-microbiens). Ceci montre qu'il existe une connexion entre la PTI et l'ETI (Tsuda and Katagiri, 2010). Toutefois, des différences existent entre les deux voies d'immunité. Ces différences s'expriment de manière quantitative et d'un point de vue cinétique. Ainsi au cours de la PTI les défenses induites seraient transitoires alors qu'elles seraient plus durables au cours de l'ETI conduisant à une résistance plus robuste dans le cas de l'ETI (Tao et al., 2003) (Figure 16). Cette défense au cours de l'ETI conduit plus souvent à la HR contrairement à la PTI. Ceci correspond plus à un effet de seuil de la HR atteint pendant l'ETI plutôt qu'une différence de programme de défense. Le modèle en « zig-zag » présenté en Figure 17 illustre cet effet de seuil (Jones and Dangl, 2006).

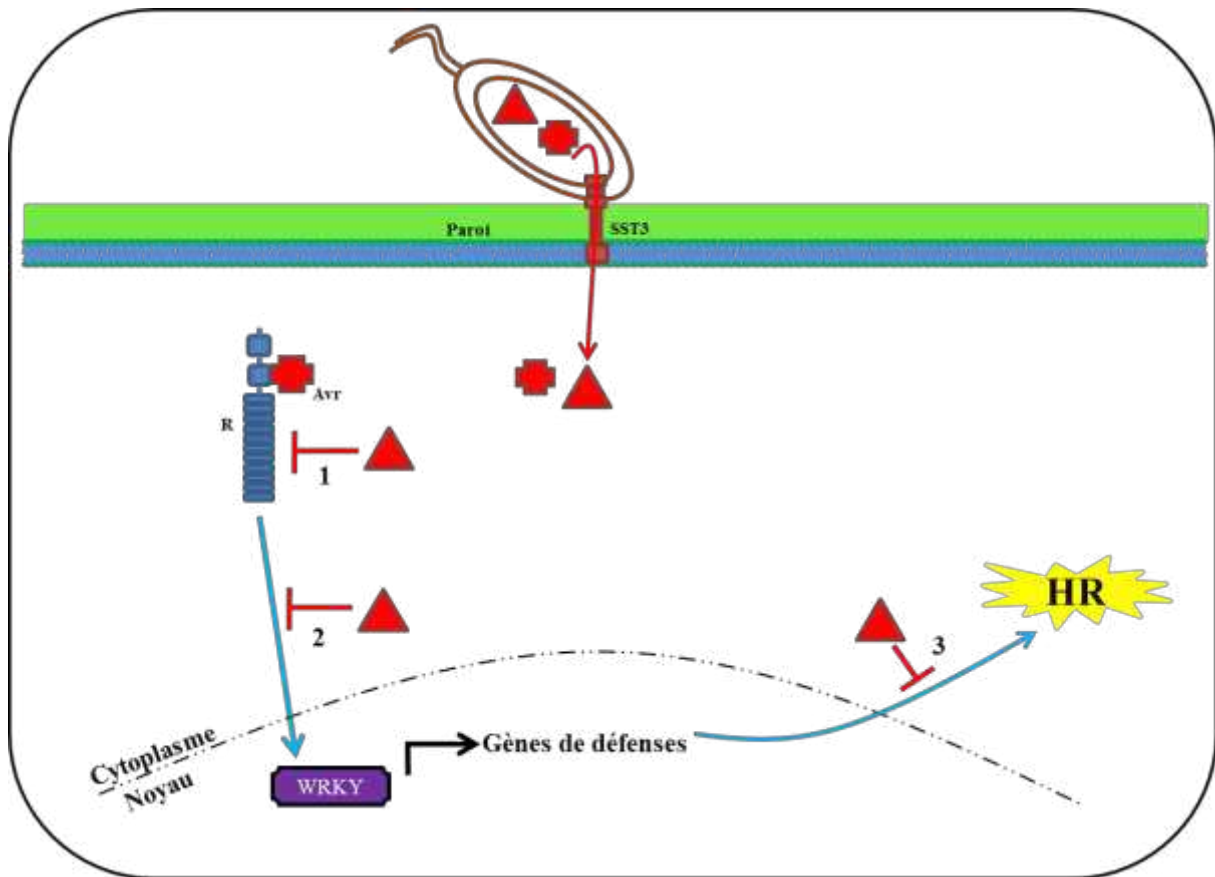


**Figure 17: Le modèle en « zig-zag »**

Modèle mettant en évidence les mécanismes de mise en place de l'immunité innée chez les plantes et de son possible contournement. Phase A, les PAMPS d'un agent pathogène sont détectés par les récepteurs de type PRR de la plante qui met en place l'immunité nommée PTI. Phase B, l'agent pathogène va délivrer des effecteurs qui inhibent les réactions de défenses dues à la PTI conduisant à une diminution de l'amplitude des défenses, on parle d'ETS. Phase C, un effecteur (Avr) est reconnu par la plante par une protéine de résistance (R), ceci augmente fortement l'amplitude des défenses conduisant à la réaction hypersensible, on parle d'ETI. Phase D, l'agent pathogène possède de nouveaux effecteurs qui inhibent l'ETI diminuant l'amplitude des défenses, l'ETS est de nouveau provoquée. Phase E, la sélection naturelle permet de sélectionner des plantes portant un nouvel allèle qui code une protéine pouvant détecter les nouveaux effecteurs permettant ainsi de déclencher l'ETI. PAMPS: Pathogen Associated Molecular Pattern, PTI: PAMP Triggered Immunity, ETS: Effector Triggered Susceptibility, ETI: Effector Triggered Immunity. Modifié d'après Jones et Dangl 2006

### 3.4 Contournement de l'immunité spécifique

Comme il a été présenté précédemment, les plantes ont développé plusieurs moyens pour se défendre contre les effecteurs de type 3. Comme le montre le modèle en « zig-zag » (Figure 17) les effecteurs déclenchent l'ETI lorsqu'ils sont détectés par la plante. La seconde phase du modèle montre que les bactéries contournent cette ETI par des changements qui apparaissent pour un effecteur ou dans les gammes d'effecteur. Ces changements s'opèrent soit par mutation, soit par suppression des effecteurs de type 3 reconnus par la plante, soit par acquisition de nouveaux effecteurs. Au cours de l'évolution la pression de sélection exercée sur les bactéries par la présence des protéines R permet ce type de changement. Contrairement aux PAMPs/MAMPs les effecteurs ne sont pas indispensables à la viabilité de la bactérie et ils sont, le plus souvent, soit regroupés en îlots de pathogénicité, soit cernés par des éléments mobiles. Des mutations ponctuelles dans les séquences promotrices des effecteurs peuvent empêcher les effecteurs d'être synthétisés. Ceci explique pourquoi il n'est pas difficile pour les bactéries de muter ou de perdre leurs effecteurs de type 3 lorsqu'ils entravent la virulence d'un agent pathogène (Alfano and Collmer, 2004).



**Figure 18: Suppression de l'ETI par les effecteurs**

La bactérie injecte des effecteurs dans la cellule végétale. Un effecteur de type Avr reconnu par la protéine de résistance R déclenche l'ETI dans le cas d'une mise en place des défenses efficace. Au cours de l'évolution la bactérie acquiert des effecteurs qui vont empêcher la mise en place des défenses à différents niveaux possibles. Dans le cas (1), l'effecteur va directement inhiber la reconnaissance R-Avr. Dans le cas (2), l'effecteur va supprimer la signalisation déclenchée par la reconnaissance. Dans le cas (3), les effecteurs peuvent être des suppresseurs de la HR induite.

### 3.4.1 Suppression de l'ETI par les effecteurs

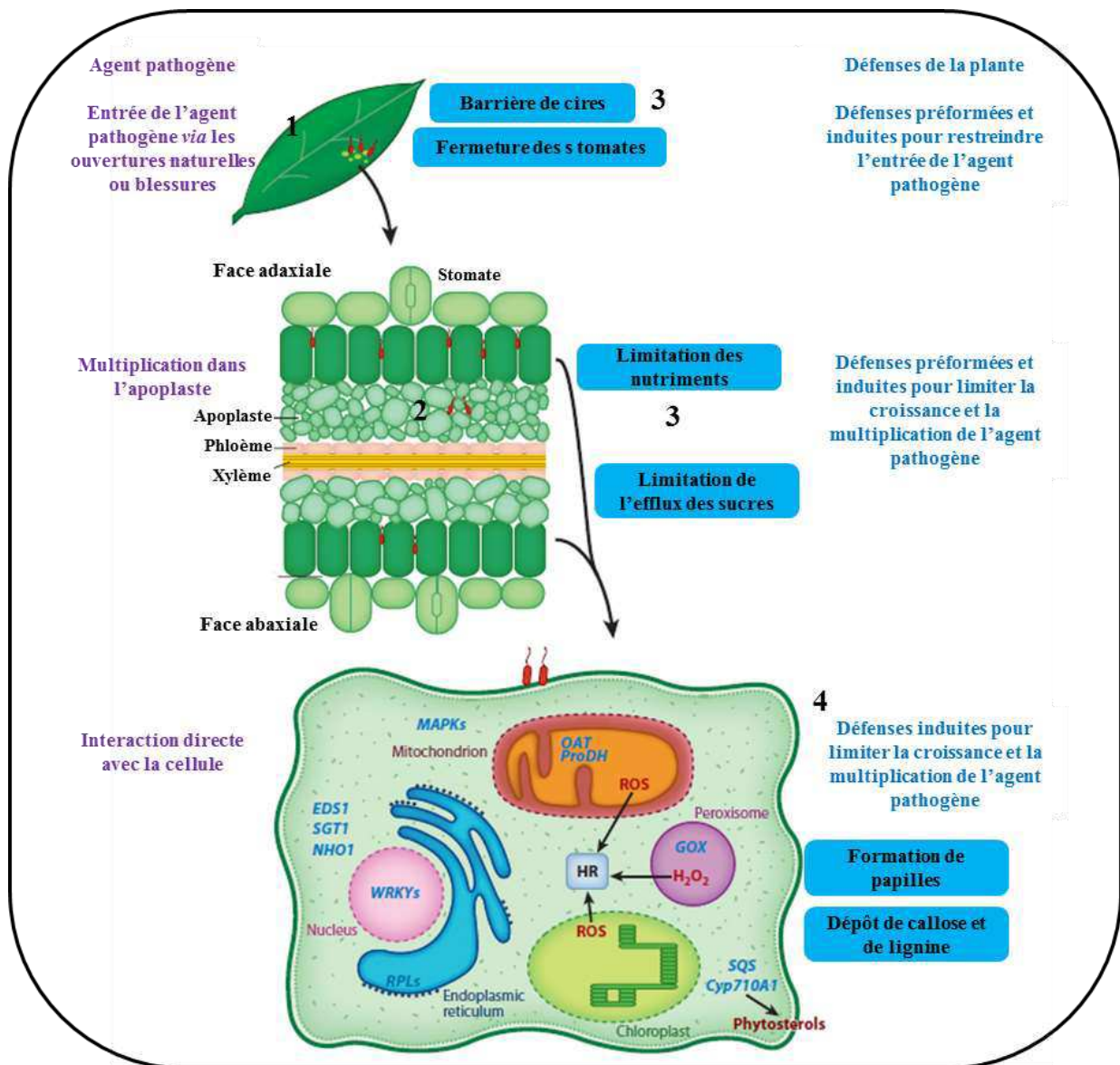
Un exemple bien décrit de la suppression de l'ETI par un effecteur est l'exemple de la suppression de la modification de la protéine végétale de résistance RIN4 par l'effecteur AvrRPT2 de *P. syringae*. La bactérie injecte dans la cellule les effecteurs AvrRpm1 et AvrB, ces deux effecteurs vont phosphoryler la protéine RIN4, cette phosphorylation est détectée par la protéine RMP1 qui permet le déclenchement de la HR (Mackey et al., 2002). A cette étape la bactérie ne peut donc pas supprimer les défenses de la plante et se multiplier. Pour pallier à ce problème la bactérie injecte également l'effecteur AvrRpt2. Grâce à son activité cystéine protéase cet effecteur clive RIN4 qui se retrouve dégradée par la machinerie du protéasome et empêche sa détection par la protéine RMP1 (Axtell et al., 2003; Kim et al., 2005). L'exemple de l'effecteur AvrRpt2 n'est pas le seul cas de figure observé dans la suppression de l'ETI. Chez *P. syringae* il a également été montré l'existence d'autre type de suppression de cette voie de défense avec le cas de l'effecteur AvrB (Block and Alfano, 2011). C'est aussi le cas pour la bactérie *Xcv* dont l'effecteur AvrBsT est capable de supprimer la HR induite par l'effecteur AvrBs1 sur poivron (Szczesny et al., 2010) (Figure 18). Ces exemples illustrent le fait que l'ETI a été contournée de nombreuses fois au cours de l'évolution.

L'histoire de la protéine RIN4 ne se cantonne pas qu'à une simple suppression par l'effecteur AvrRpt2. En effet, la plante a su s'adapter pour empêcher la suppression de ses défenses. Pour cela elle a mis en place une protéine de résistance RPS2 qui va de nouveau détecter la modification par clivage de RIN4 et permettre de déclencher la HR (Axtell and Staskawicz, 2003; Day et al., 2005). L'exemple de la protéine de résistance RIN4 et de l'effecteur AvrRpt2 est intéressant d'un point de vue évolutif car il illustre parfaitement cette lutte pour la survie des deux protagonistes. La dernière phase du modèle « zig-zag » montre cette dernière étape de l'évolution de la plante permettant de déclencher l'ETS. Ce modèle n'est pas figé, il est en constante évolution, les auteurs parlent d'ailleurs d'une course à l'armement dans la lutte pour la survie (Jones and Dangl, 2006).

### 3.5 La résistance non-hôte, une résistance efficace

La résistance non-hôte est une résistance à large spectre qui confère l'immunité de tous les écotypes d'une même espèce contre tous les isolats d'un microorganisme pathogène (Senthil-Kumar and Mysore, 2013). Cette résistance non-hôte est classée en deux catégories. Le premier groupe est représenté par la résistance non-hôte de type I, dans ce cas l'issue de l'interaction ne conduit pas à des symptômes nécrotiques de type HR tandis que pour le second groupe (type II) l'interaction conduit à des symptômes nécrotiques de type HR (Mysore and Ryu, 2004). Jusqu'à récemment, la résistance non-hôte correspondait uniquement aux défenses préformées de la plante et à la PTI. Dorénavant plusieurs études attestent que les mécanismes de défenses non-hôte se déroulent également *via* l'ETI (Daniels et al., 1987; Deslandes and Rivas, 2012; Moreau et al., 2012; Rojas and Mysore, 2012). Une étude en particulier démontre le rôle de l'ETI dans la résistance non-hôte (Sohn et al., 2012). Au final, cette résistance est mise en place grâce à une large gamme de mécanismes et est gouvernée par un grand nombre de gènes (Ham et al., 2007).





**Figure 19: La résistance non-hôte, une résistance multi-couches**

(1) Lorsqu'elle se retrouve à la surface de la plante, une bactérie potentiellement pathogène pénètre dans le mésophylle *via* les stomates ou les blessures. (2) Une fois dans l'apoplaste un agent pathogène manipule la cellule végétale de façon à ce qu'elle relargue des nutriments. Ainsi l'agent pathogène peut se multiplier et éventuellement provoquer la maladie. Cependant dû à la résistance non-hôte, tous les agents pathogènes ne peuvent réussir ces deux étapes. (3) La première couche de défense des plantes à la surface des feuilles et dans l'apoplaste possèdent des barrières préformées ou induites, comme les cires et/ou les défenses par des molécules chimiques tels que des composés antimicrobiens. (4) Les réponses de défenses induites se déclenchent tout d'abord par la perception des PAMPs et dans les stages les plus avancés par la reconnaissance d'effecteurs. L'interaction directe entre l'agent pathogène et la cellule végétale initie des réactions de défenses supplémentaires et dans certains cas la HR limitant ainsi la progression de l'agent pathogène. Quelques exemples de la résistance non-hôte identifiés récemment sont montrés.

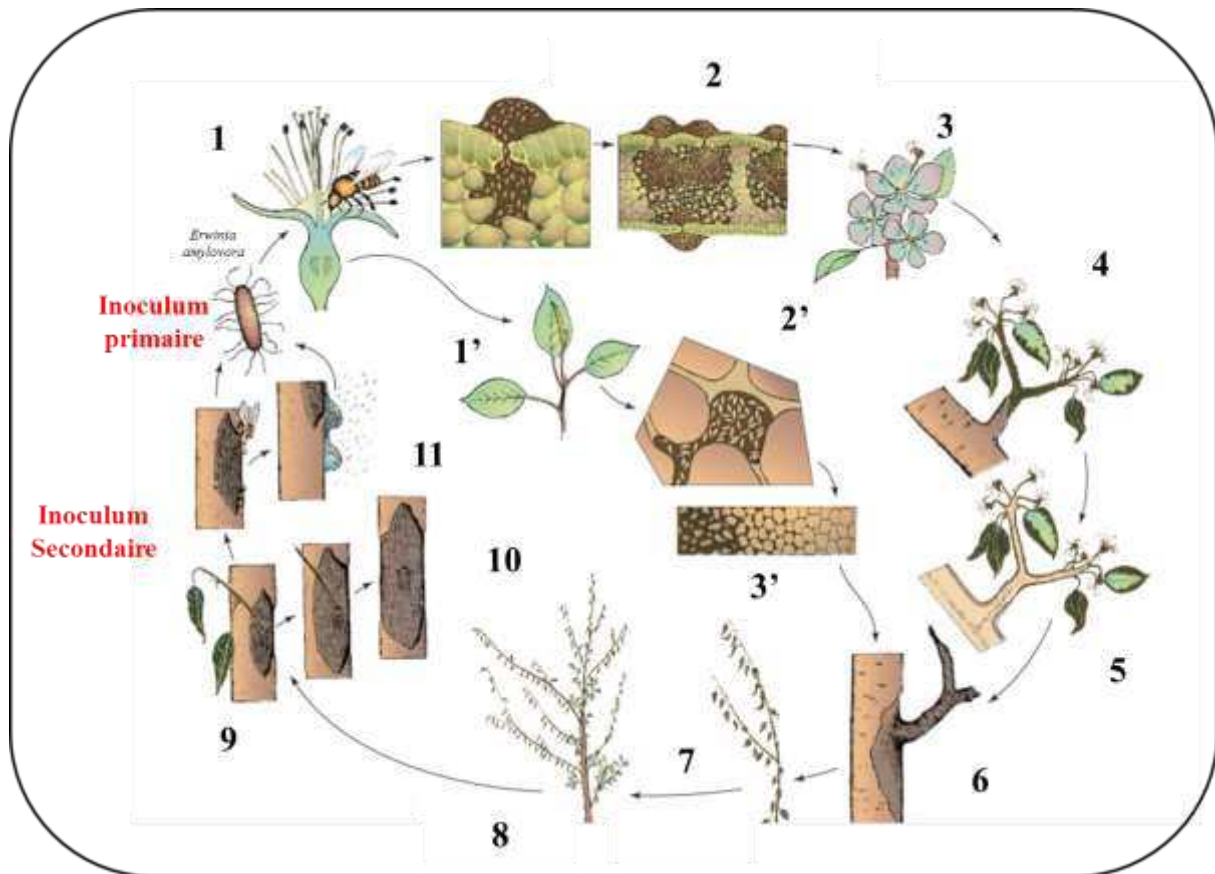
*Cyp710A1*, famille des cytochrome p450 sous-famille A et polypeptide 1; *EDS1* Enhanced Disease Susceptibility 1; *GOX*, Glycolate OXidase; *NHO1*, nonhost 1; *OAT*, Ornithine- $\delta$ -aminotransferase; *ProDH*, Proline deshydrogenase; ROS, Reactiv Oxygen Species; *RPL*, Ribosomal Protein L; *SGT1*, Suppressor of G2 allele of SKP1; *SQS*, Squalene Synthase (Modifié d'après Senthil-Kumar and Mysore, 2013).



Parmi les mécanismes impliqués, des candidats de la PTI et de l'ETI ont été identifiés (Figure 19). Des MAPKs peuvent être impliquées, c'est le cas par exemple des MAPKs induites chez le tabac en réponse à la harpigne de *P. syringae* pv. *Phaseolicola* (Lee et al., 2001). Des gènes participant à l'induction de FAOs ont été identifiés comme la glycolate oxidase (GOX) dont la mutation compromet fortement la résistance non-hôte chez le tabac contre *P. syringae* pv. *Tomato T1*. De même chez *A. thaliana*, des mutants de plusieurs membres de la famille des gènes *GOX* sont affectés dans la mise en place de la résistance non-hôte contre *P. syringae* pv. *tabaci* (Rojas and Mysore, 2012). Enfin, Moreau et al., 2012 ont identifié le gène *EDSI*, un gène impliqué dans la mise en place de la HR dans le cas d'une interaction incompatible, qui permet de restreindre la croissance de la bactérie *E. amylovora* chez la plante non-hôte *A. thaliana*.

La résistance non-hôte est une résistance efficace car elle concerne la mise en place de plusieurs couches de défenses. De plus, beaucoup de gènes identifiés et impliqués dans la résistance non-hôte sont requis pour le métabolisme primaire chez la plante (comme le gène codant la proline déshydrogénase ou la protéine ribosomale L) et sont donc indispensables pour la plante.

Je vais par la suite présenter la bactérie phytopathogène *E. amylovora* responsable du feu bactérien sur pommier et poirier. Cette bactérie est intéressante en tant qu'outil sur la plante *A. thaliana* puisqu'elle permet d'étudier les mécanismes de la résistance non-hôte et le rôle des effecteurs de type 3 pendant l'interaction.



**Figure 20: Cycle du feu bactérien des Pyroïdeae**

(1): Les insectes transportent la bactérie sur les fleurs. (2): La bactérie pénètre dans les fleurs *via* les nectarthodes et dans les feuilles *via* les blessures ou les stomates. La bactérie se multiplie et se propage entre les cellules. (3): Les inflorescences deviennent noires et meurent. (4): L'infection s'étend aux autres fleurs, brindilles et feuilles. (5): La bactérie colonise le reste de la plante *via* les tissus conducteurs xylémiens. (6): Formation de nouveaux chancre sur les branches et les souches. Une autre voie permettant à la bactérie d'infecter la plante est possible. (1'): Infection directe des jeunes brindilles. (2'): Multiplication intercellulaire et colonisation de la bactérie dans l'écorce. (3'): Les cellules de l'écorce infecté s'effondrent. (7): Brindille tuée par le feu bactérien et feuilles mortes restant accrochées à la brindille. (8): Jeune plant hautement infecté par le feu bactérien. (9): La bactérie passe l'hiver dans les chancre. (10): Le chancre s'élargit et encercle la branche ou la souche. (11): Les bactéries dans les exsudats sont disséminées par les insectes et la pluie (Modifié d'après Plant pathology cinquième édition, Agrios 2005).

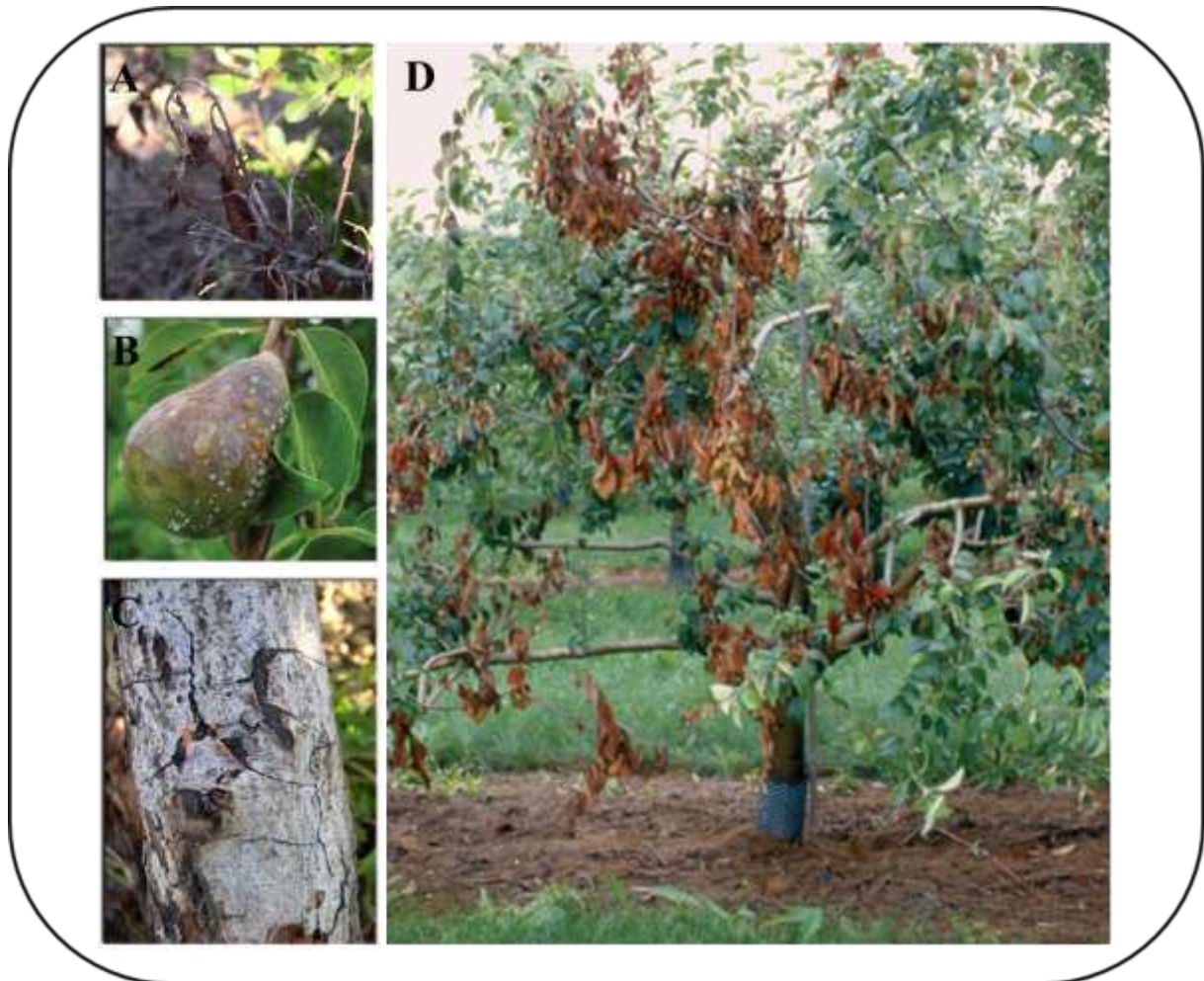
## IV. *Erwinia amylovora*

### 1. Le feu bactérien

La bactérie phytopathogène *E. amylovora*, bacille motile gram-négative et appartenant à la classe des protéobactéries et à la famille des entérobactéries est l'agent responsable de la maladie appelée le feu bactérien. Cette maladie, observée pour la première fois aux États-Unis dans l'état de New York, affecte les plantes de la sous-famille des *Maloideae* et plus particulièrement la tribu des *Pyrae*. La bactérie infecte des plantes d'intérêt agronomiques telles que le pommier, le poirier et le cognassier, mais également des plantes ornementales telles que l'aubépine et le cotoneaster. La maladie a fait son apparition en Europe à partir de 1957 et est détectée pour la première fois en France en 1972. Le dernier pays où la maladie a été détectée est la Tunisie en 2011.

### 2. Cycle de la maladie

*E. amylovora* infecte essentiellement les plantes hôtes par les inflorescences et ce notamment grâce aux insectes pollinisateurs qui servent de vecteurs pour la bactérie. Une fois la bactérie présente sur les inflorescences, elle va pénétrer dans les tissus *via* les structures synthétisant le nectar appelées nectarthodes, les stomates mais aussi *via* les blessures qui peuvent être provoquées au niveau des trichomes des feuilles par le vent ou par les insectes (on parle de phénomène de « crack-entry ») (Bogs et al., 1998). Une fois dans les tissus, la bactérie va se multiplier dans les espaces intercellulaires. Sur plante hôte, cela se traduit par une coloration brune des inflorescences qui se dessèchent et se nécrosent mais aussi par un recourbement en forme de crosse de l'inflorescence. Par la suite, l'infection se propage aux autres fleurs, feuilles puis aux branches. Ceci est dû à une multiplication de la bactérie dans le xylème et à une migration progressive de cette dernière vers les tissus vivants. Cette colonisation des tissus provoque la formation de chancres au niveau des branches dans un premier temps, puis au niveau du tronc lorsque la sévérité de la maladie sur l'arbre est plus importante. Ces chancres, permettent à la bactérie de se maintenir durant l'hiver constituant ainsi un *inoculum* pour la saison suivante (Paulin and Sampson, 1973). En condition de forte hygrométrie, des gouttelettes riches en bactéries appelées exsudat bactérien se forment au niveau des fruits, des branches ou des chancres. Les bactéries peuvent être ainsi disséminées grâce aux insectes mais aussi par les gouttes de pluies (on parle de phénomène de splashing) sur les plantes voisines. Le cycle continue ainsi (Agrios, 2005) (Figure 20).



**Figure 21: Symptômes du feu bactérien**

(A) Noircissement et courbure en crosse de l'inflorescence après infection. (B) Symptômes sur poire avec formation de gouttellettes d'exsudats bactérien. (C) Formation de chancre automnal permettant la conservation d'inoculum secondaire. (D) Aspect brûlé d'un pommier lors d'une infection sévère.

Crédit photo: Frédon Rhône-Alpes (A, B et C) et site du ministère de l'agriculture et de l'alimentation en Ontario, Canada (D).

(<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/fireblight.htm>)

Il est facile d'identifier le feu bactérien (Figure 21). En effet, la bactérie en colonisant les tissus provoque la nécrose de ces derniers et confère un aspect brûlé à la plante d'où le nom donné à la maladie.

### 2.2 Méthodes de lutte

Le feu bactérien peut provoquer la destruction complète d'un verger en une saison de culture. Cela dépend de la variété cultivée, mais aussi des pratiques agricoles employées pour limiter la propagation de la bactérie une fois présente dans le verger.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode efficace de lutte contre le feu bactérien, des méthodes dites de prévention sont employées. En effet, de bonnes pratiques culturales mais aussi des moyens de lutte chimique biologique et génétique empêcheront un développement important de la maladie.

#### 2.2.1 Pratiques culturales

La gestion de la vigueur des plantes est un facteur important. Par exemple, une taille trop importante provoquera une croissance excessive et vigoureuse des jeunes pousses rendant les arbres plus sensibles à la maladie (<http://www.agr.gc.ca>). La nutrition azotée joue également un rôle important dans la vigueur, un apport azoté trop important provoquera une forte croissance des pousses rendant les arbres plus sensibles (plus d'ouvertures naturelles notamment) (Agrios, 2005).

L'environnement de culture a également un effet sur la maladie. Il est important d'avoir un verger bien dégagé dans les allées, de permettre la circulation de l'air, d'éviter l'arrosage par aspersion durant la floraison et en cas de températures propices au feu bactérien créant un microclimat défavorable à la bactérie. Une lutte intégrée contre les insectes (pucerons, cicadelles...), une élimination des déchets de culture (chancres, branches mortes) et un arrachage des arbres malades sont des moyens complémentaires à la mise en place de ce microclimat (<http://www.agr.gc.ca>).

Le choix des cultivars et porte-greffes peu ou pas sensibles au feu bactérien joue également un rôle dans la diminution de la propagation de la maladie. En France, un arrêté préfectoral datant du 12 août 1994 stipule que certaines variétés sont interdites à la plantation et à la multiplication tels que le pommier *Malus domestica* variété Peau de chien et le poirier *Pyrus communis* variété Passe-crassane.

#### 2.2.2 Lutte chimique

A l'heure actuelle, il existe plusieurs types de traitements chimiques susceptibles de limiter la propagation de la maladie.

La bouillie bordelaise dont le principe actif est le cuivre peut être utilisée au verger. Néanmoins, ce composé n'aura qu'un effet bactériostatique sur *E. amylovora* et doit être employé



de manière raisonnée afin d'éviter d'importantes pollutions des sols et d'éliminer des microorganismes susceptibles d'entrer en compétition avec *E. amylovora* et donc d'empêcher sa progression. Un autre exemple de bactériostatique qui peut être employé a été publié récemment avec l'utilisation de courts acides gras tel que l'acide propionique (Konecki et al., 2013).

L'emploi d'antibiotiques tels que la streptomycine et l'oxytétracycline est une méthode efficace contre *E. amylovora*. Le problème de ce type de composés est l'apparition de résistances plasmidiques (Schroth et al., 1974). De ce fait, les antibiotiques sont autorisés mais de manière contrôlée dans certains pays Européens (Suisse, Allemagne...) mais interdit en France. Néanmoins ils sont toujours utilisés aux États-Unis et ce depuis les années 50.

Des études ont également été effectuées dans le but de pré-induire les défenses de la plante hôte en utilisant notamment des éliciteurs de défenses chez la plante. C'est le cas de l'utilisation de l'acide benzolar-S-méthyl (le Bion<sup>®</sup>) qui est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique (SA), inducteur de la résistance systémique acquise. Il existe aussi le prohexadione-calcium qui est un régulateur de croissance des pousses et qui permet de diminuer les symptômes du feu bactérien sans affecter la population bactérienne (McGrath et al., 2009). Cependant, l'utilisation de ces composés en champs pour limiter le développement de la maladie, doit encore être étudiée. D'autres composés éliciteurs sont encore en cours d'étude (Brisset et al., 2000). Enfin, une étude récente montre que certains composés phénoliques tels que l'acide 4-Methoxy-cinnamic et l'acide benzoïque peuvent inhiber la formation du système de sécrétion de type 3 de la bactérie (Khokhani et al., 2013)

Au même titre que les pratiques culturales, l'emploi de composés chimiques n'empêchera pas la mise en place de la maladie s'ils ne sont pas utilisés de manière efficace et ce uniquement à titre préventif.

### 2.2.3 Lutte biologique

Le but de la lutte biologique contre le feu bactérien, est de provoquer un antagonisme vis à vis d'*E. amylovora* en utilisant des bactéries non-pathogènes pour la plante. Cet antagonisme peut s'exprimer de deux manières :

-La première consiste à utiliser une espèce bactérienne qui synthétise des antibiotiques pouvant inhiber la croissance d'*E. amylovora*. C'est le cas de *Pantoea agglomerans* dont certaines souches synthétisent un antibiotique, la pantocine (Pusey et al., 2011; Wodzinski and Paulin, 1994) Un produit contenant la souche C9-1 et E235 de *Pantoea agglomerans* est commercialisé sous le nom de BlightBan<sup>®</sup> et Bloomtime<sup>®</sup>. Ces produits sont appliqués sur les inflorescences.

-La seconde, consiste à utiliser une bactérie antagoniste d'un point de vue ressources nutritives et spatial. En effet, l'application de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*, sur les jeunes inflorescences, permettrait d'occuper la place et d'empêcher *E. amylovora* de coloniser les espaces susceptibles d'accueillir cette dernière (Wilson, 1993; Cabrefiga et al., 2007; Stockwell

and Stack, 2007). Le produit commercialisé contenant *P. fluorescens* se nomme BlightBan A506®.

#### 2.2.4 Lutte génétique

Un vaste programme de création de variétés résistantes par hybridation entre variétés résistantes a été entrepris depuis plusieurs années en France. Ce programme a permis de mettre en évidence des QTLs majeurs de résistance expliquant 37 à 47 % de la variation phénotypique (Calenge et al., 2005; Khan et al., 2011). Un autre QTL majeur de résistance a été découvert par la suite permettant d'expliquer 80% de la variation phénotypique (Peil et al., 2007). Cependant il a été montré que ce QTL a été contourné par une souche très agressive d'*E. amylovora* (Ea 266) (Durel et al., 2009). Récemment, deux autres QTLs mineurs expliquant 15 à 17% et 10 % de la variation phénotypique ont été décrits (Le Roux et al., 2010). Malgré le fait que la recherche de QTL soit longue et demande beaucoup d'investissements, plusieurs QTLs majeurs stables de la résistance au feu bactérien ont été décrits. Ces recherches de QTLs couplées à la sélection variétale assistée par les « Marker-assisted breeding » (MAB) (Malnoy et al., 2012) permettront de mieux comprendre les mécanismes de résistances au feu bactérien et donc de lutter plus facilement contre la maladie.

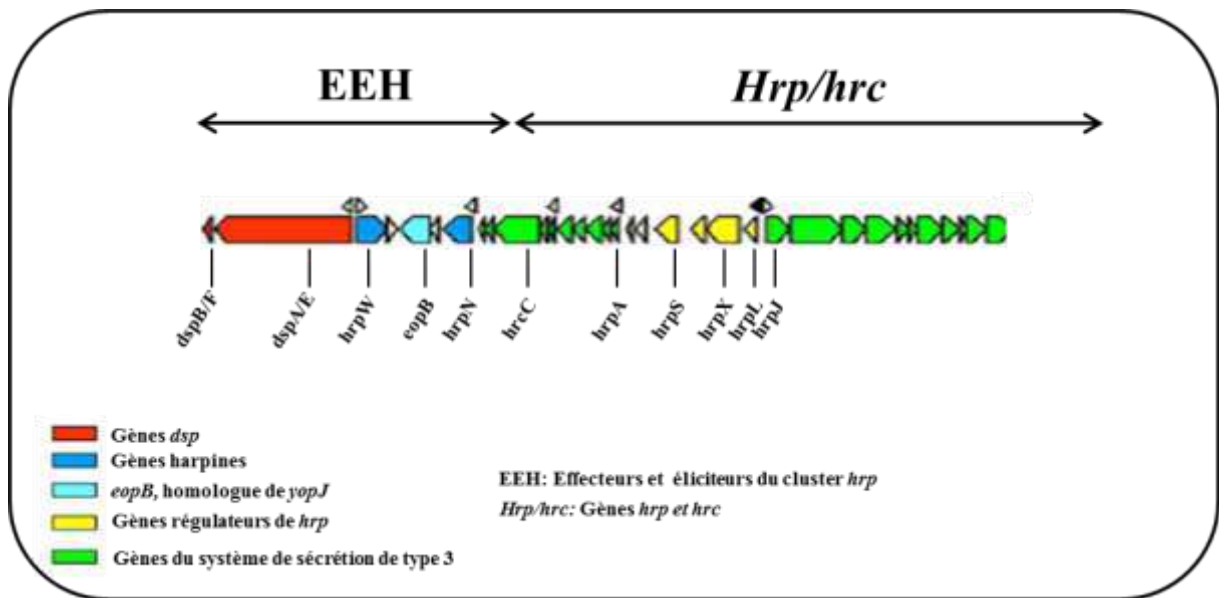
La transgénèse pour obtenir des résistances est un autre moyen de lutte envisageable contre le feu bactérien. En effet, ce type d'étude reste moins long à poursuivre que la création variétale par hybridation classique. Cependant, ce type d'étude reste un sujet sensible en France et les mécanismes d'interaction entre *E. amylovora* et ses plantes hôtes, demande encore à être connus de manière fine. Par exemple, une étude récente montre qu'une résistance monogénique de type R-Avr existe dans l'interaction *E. amylovora* et *Malus robusta*. La présence d'*E. amylovora* dans la plante hôte se ferait par détection de son effecteur AvrRpt2(EA) puisque le mutant bactérien de cet effecteur peut provoquer le feu bactérien sur ce génotype. Dans ce cas, le gène avrRpt2(EA) est considéré comme un gène d'avirulence (Vogt et al., 2013).

Enfin, le séquençage récent du génome du pommier constituera une base solide quant à la compréhension des mécanismes de résistances (Velasco et al., 2010).

### 3. Etude de la diversité d'*E. amylovora*

Les populations d'*E. amylovora*, sont très homogènes. Par exemple le génome des souches Ea 273 (souche américaine) et CFPB 1430 (souche Européenne) sont identiques à 99.99% (Smits et al., 2010), leurs génomes ont d'ailleurs été séquencés. Les variations que l'on peut observer entre les souches concernent la gamme d'hôtes infectés. Notamment, certaines souches infectent le genre *Rubus* mais pas les genre *Malus* ou *Pyrus* (Momol and Aldwinckle). La différence peut s'observer également au niveau de la sensibilité à la streptomycine et à certains phages (Paulin, 2000). Plus récemment, une étude a mis en évidence une nouvelle méthode pour étudier la diversité entre les souches d'*E. amylovora*





**Figure 22: Cluster *hrp/dsp* d' *E. amylovora***

Ce cluster comprend la région EEH, qui code pour les protéines *dsp* (disease specific) et les harpines. Ce cluster comprend également la région *hrp/hrc* qui code pour des protéines régulatrices et structurales de *hrp* permettant la construction d'un SSTT fonctionnel (Modifié d'après Oh et Beer, 2005).

grâce aux CRISPR (pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Ce sont des *loci* qui contiennent de courtes mais multiples répétitions, décrites comme étant un mécanisme d'immunité chez les bactéries en empêchant l'invasion par de l'ADN étranger (Barrangou et al., 2007). Les auteurs ont montré notamment que des différences ont été observées au niveau de ces répétitions entre les différentes souches d'*E. amylovora*.

#### 4. Le génome d'*E. amylovora*

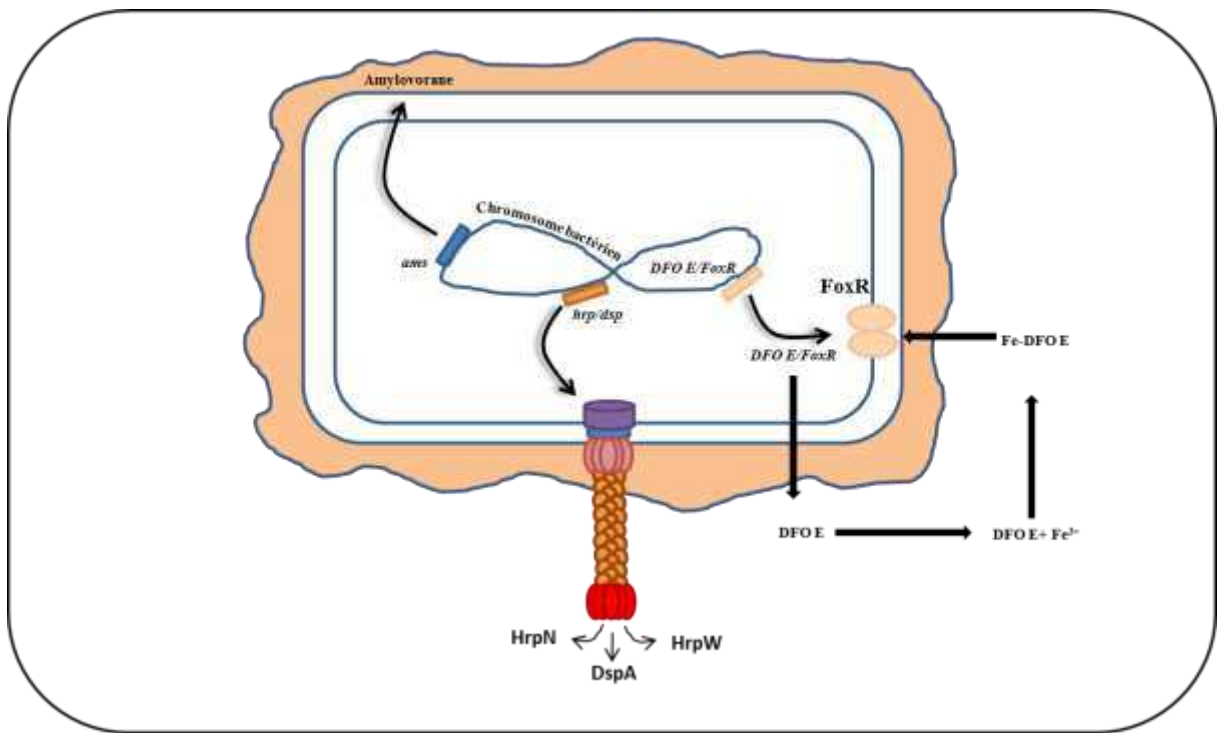
Le génome de la souche CFPB 1430 est constitué d'un unique chromosome circulaire de 3.8 mégabases et possède un plasmide quasi-ubiquitaire nommé pEA29. Sans ce plasmide, la virulence des souches sur poirier et leur croissance sur milieu minimum sans thiamine seraient légèrement altérées (Laurent., 1989; McGhee and Jones, 2000).

Le génome de la souche Ea 273, est constitué d'un unique chromosome circulaire de 3.8 mégabases et de deux plasmides pEA72 et pEA29. Le plasmide pEA72 n'a pas de rôle précis à l'heure actuelle pour la virulence. Les séquences codantes putatives portées par ce plasmide représentent des gènes de conjugaison (A M Bocsanczy).

La séquence du chromosome de ces deux souches, a permis de mettre en évidence des sets de gènes impliqués dans diverses fonctions. Notamment, des sets de gènes codant protéines de biosynthèse du flagelle, chimiotaxie, et d'exopolysaccharides comme le levane et l'amylovorane. On trouve également des sets de gènes impliqués dans l'acquisition du fer ainsi que la sécrétion de type I, II et VI sans rôle majeur dans la virulence. Des gènes codant des éléments du quorum-sensing ont été également identifiés.

Enfin, on trouve des gènes de biosynthèse de trois types de systèmes de sécrétion de type III. Dans un premier temps, le cluster *hrp-dsp* (hypersensitive response and pathogenicity-disease specific) codé par l'îlot de pathogénicité I (PAI-1) avec des gènes de régulation, de structure pour le pilus et des gènes de protéines secrétées via le pilus. Cet îlot de pathogénicité est le plus important en ce qui concerne la virulence et ce particulièrement pour les gènes codant pour le pilus et les protéines secrétées (Figure 22). Il existe également les îlots de pathogénicité II et III (PAI-2 et PAI-3). Le rôle de ces deux îlots n'est pas décrit mais il a été montré qu'ils n'ont aucun rôle majeur dans la virulence (Zhao et al., 2009; Smits et al., 2010).

En résumé, les gènes du cluster *hrp-dsp* (et des gènes codant les protéines de biosynthèse de l'amylovorane) sont essentiels au pouvoir pathogène d'*E. amylovora*. Le rôle de ces gènes et le rôle d'autres facteurs du pouvoir pathogène seront décrits de manière plus exhaustive dans la partie suivante.

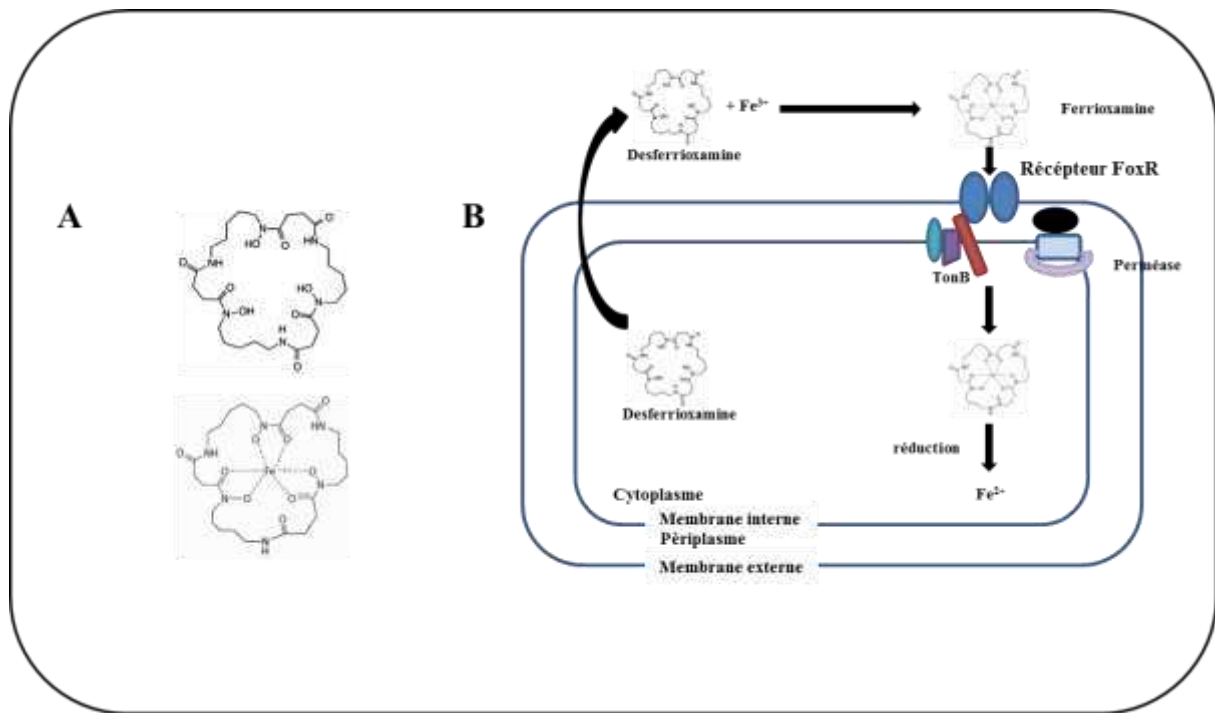


**Figure 23: Facteurs du pouvoir pathogène d'*E. amylovora***

Les facteurs importants du pouvoir pathogène sont répartis sur différents clusters du chromosome bactérien. Le cluster *ams* en bleu permet la synthèse de l'exopolysaccharide de surface l'amylovorane. Le cluster *hrp/dsp* permet la synthèse du système de sécrétion de type III (SSTT) et des effecteurs transportés *via* ce SSTT. Et le cluster *DFO E/FoxR* permet la synthèse des composants d'acquisition du fer ferrique.

## 5. Les facteurs du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de la bactérie *E. amylovora* dépend donc d'un système de sécrétion de type III fonctionnel et des protéines secrétées via ce complexe. Mais son pouvoir pathogène dépend également d'un système d'acquisition du fer et de l'exopolysaccharide de surface l'amylovorane (Figure 23).



**Figure 24: Système d'acquisition du fer chez *E. amylovora***

A: Structure de la desferrioxamine E seule ou complexée au fer (ferrioxamine)

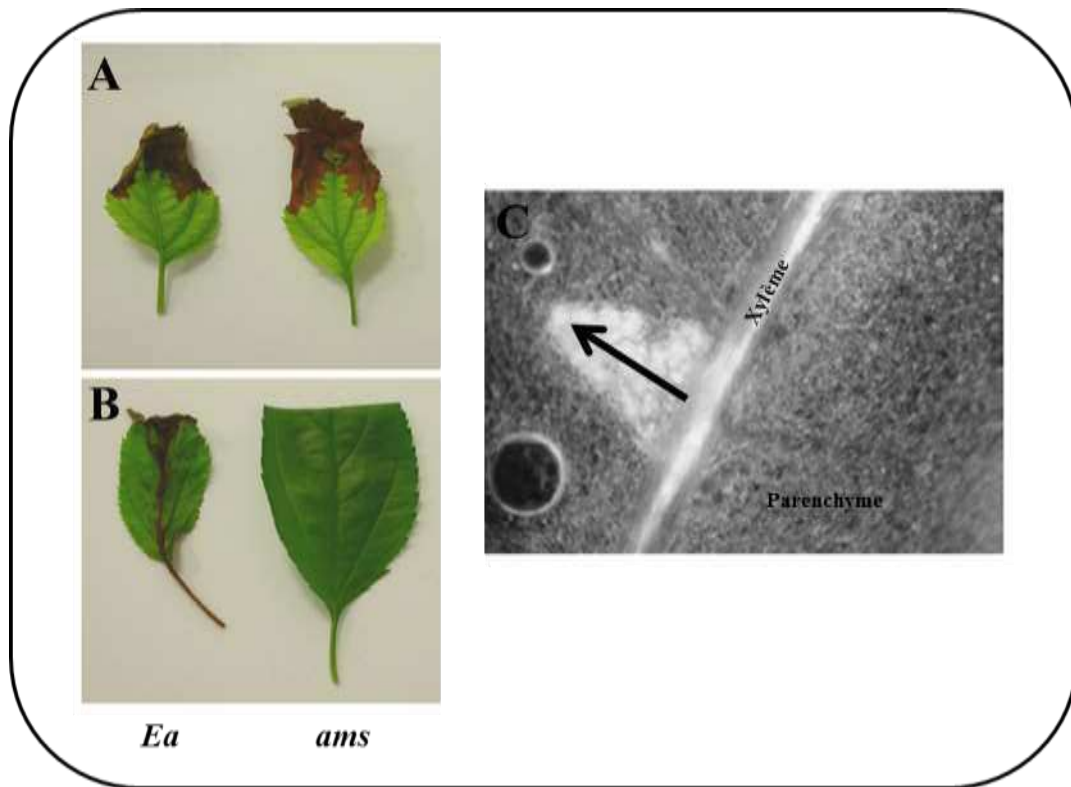
B: Schématisation du transport du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) chez *E. amylovora*. La desferrioxamine E est synthétisée dans le cytoplasme et exportée dans le milieu extracellulaire. La desferrioxamine E se complexe avec le fer ferrique pour donner la ferrioxamine. Le récepteur FoxR permet de faire passer la ferrioxamine du milieu extracellulaire dans le periplasme. Le transport dans le cytoplasme nécessite le complexe TonB couplé à une perméase. Le fer ferrique est libéré de son complexe et réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui est utilisé dans le métabolisme cellulaire. (Modifié d'après Vanneste, 2000, chapitre Expert *et al.*, 2000).

### 5.1 Le système d'acquisition du fer et le stress oxydatif

Le fer est une ressource essentielle pour les organismes vivants, puisque certaines protéines ont besoin de cet élément en tant que cofacteur pour leur fonction. Le fer étant en quantité limitante dans la nature du fait de son insolubilité en conditions aérobies, certaines bactéries pathogènes ont mis en place un système d'acquisition de cet élément leur permettant de se multiplier dans les cellules de leur hôte. C'est le cas par exemple des bactéries du genre *Shigella*, responsables de la dysenterie qui synthétisent des sidérophores (molécules qui possèdent une très forte affinité pour le fer ferrique) dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ces sidérophores leur permettent de se multiplier dans les cellules épithéliales (Payne et al., 2006). *E. amylovora*, possède aussi ce type de système d'acquisition du fer. En effet, elle est capable de synthétiser des sidérophores nommés desferrioxamines (DFO). Elle synthétise notamment les formes E, D, G et X. La E est majoritaire et joue un rôle dans la virulence de la bactérie puisque des mutants affectés dans la biosynthèse de DFO E ne peuvent plus coloniser les inflorescences de la plante hôte (Kachadourian et al., 1996; Dellagi et al., 1998) (Figure 24). La DFO E, une fois synthétisée, se lie au  $\text{Fe}^{3+}$  pour former la ferrioxamine, ce complexe est ensuite internalisé grâce au récepteur FoxR puis le fer est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  et rendu disponible pour les besoins cellulaires (Vanneste, 2000).

Les sidérophores n'ont pas seulement un rôle d'assimilation du fer pour la bactérie. Durant la maladie, *E. amylovora* induit une forte accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (comme les ions superoxydes  $\text{O}_2^-$  et du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Venisse et al., 2001). Les sidérophores vont protéger la bactérie contre l'accumulation de radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ) formés en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  et de peroxyde d'hydrogène grâce à la réaction de Fenton (Dellagi et al., 1998). En effet, il a également été montré que des mutants de biosynthèse de la DFO E sont plus sensibles que la souche sauvage à des concentrations croissantes d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Venisse et al., 2003).

Enfin, des mutants de l'amylovorane sont plus sensibles au stress oxydatif et moins virulents (Berry et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la tolérance au stress oxydant est un élément clé dans le pouvoir pathogène d'*E. amylovora*. Par ailleurs, Venisse et al., 2001 émettent l'hypothèse que la production d'un burst oxydatif pourrait être bénéfique à la bactérie.



**Figure 25: Importance de l'amylovorane dans la colonisation des tissus par *E. amylovora***

A, B: Des feuilles de pommier ont été inoculées par infiltration sous vide (A) ou à l'aide de ciseaux (B) avec une suspension bactérienne sauvage (*Ea*) ou mutante pour l'exopolysaccharide de surface l'amylovorane (*ams*).

Les photos sont prises une semaine post-inoculation (Barny et Fagard, non-publié).

C: Des feuilles de pommiers âgés de 5 à 7 semaines ont été inoculées à l'aide d'une souche sauvage d'*E. amylovora* transformée avec un plasmide permettant d'exprimer la GFP. La flèche indique la direction de déplacement des bactéries, des vaisseaux du xylème vers le parenchyme (Modifié d'après Bogs *et al.*, 1998).



## 5.1 L'amylovorane

L'amylovorane est un oligosaccharide complexe (Nimtz et al., 1996) dont la biosynthèse requiert un nombre important de gènes. La majorité de ces gènes, sont organisés en opérons de 12 ORFs dans une région du chromosome de 17 kb appelée *ams* (Bugert and Geider, 1995). Le pouvoir pathogène d'un mutant *ams* dépend du mode d'inoculation. Lorsque l'on inocule des feuilles de pommier à l'aide de ciseaux trempés dans une suspension bactérienne, ce mutant est capable de provoquer une nécrose au niveau du site d'infection par infiltration. Par contre, l'inoculation par blessure montre que le mutant *ams*, n'est plus capable de progresser dans les tissus vasculaires contrairement à la souche sauvage (Bellemann and Geider, 1992; Bogs et al., 1998) (Figure 25). Enfin, une étude récente montre que des mutants du gène orphelin AmyR, régulateur négatif de la synthèse de l'amylovorane, induisent plus de symptômes que la souche sauvage (Wang et al., 2012a). Tous ces résultats montrent que l'amylovorane est un facteur essentiel au pouvoir pathogène d'*E. amylovora* et ce notamment pour la colonisation des tissus de l'hôte.

## 5.2 Le système de sécrétion de type III (SSTT)

Le système de sécrétion de type III d'*E. amylovora* est indispensable pour son pouvoir pathogène. En effet, des mutants dans les gènes codant les protéines de structure (HrpA) du complexe ne sont plus pathogènes sur plante hôte et ne provoquent plus de HR sur une plante non-hôte, le tabac (Barney et al., 1990). L'expression de ces gènes est régulée en fonction des conditions environnementales. En effet, la mise en place de ce complexe demande de l'énergie à la bactérie. Afin de limiter l'utilisation de cette énergie, l'expression des gènes de ce complexe est réprimée en milieu riche et activée *in planta* dans l'apoplaste, un environnement pauvre en nutriments. L'expression de ces gènes est aussi régulée en fonction de la température et du pH (Wei et al., 1992b). Une étude récente montre que l'acidification du pH pendant l'infection provoque une diminution de l'expression de certains gènes du cluster (Pester et al., 2012).

En 2007, une étude a permis de montrer que le secrétome d'*E. amylovora* est composé d'au moins 12 effecteurs de type III (Nissinen et al., 2007). Ce qui représente un faible nombre par rapport à *P. syringae* capable de sécréter jusqu'à 35 effecteurs (Block and Alfano, 2011) et *R. solanacearum* avec plus de 70 (Poueymiro and Genin, 2009). Le descriptif détaillé de ces effecteurs sera présenté dans la partie suivante.

## 5.3 Les effecteurs de type III d'*E. amylovora*

### 5.3.1 La harpine HrpN

Cette harpine a été caractérisée comme étant le premier éliciteur de la HR chez le tabac (Wei et al., 1992a). Elle a aussi été caractérisée comme étant un inducteur du stress oxydatif sur poirier (Venisse et al., 2003) et sur plant de tabac. La partie C-terminale de cette protéine est essentielle pour ses activités de virulence et d'avirulence ainsi que pour sa translocation (Sinn et al., 2008). Au final HrpN joue un rôle important dans le pouvoir pathogène d'*E. amylovora*

puisque'une souche mutante de cette harpine va provoquer des symptômes sur pommier qui ne seront que locaux (Barney, 1995).

La recherche d'interacteurs protéiques de HrpN, a été effectuée grâce à un crible double hybride. Ce crible a permis d'identifier une protéine appelée HIPM, pour *HrpN Interacting Protein of Malus* localisée dans la membrane plasmique des cellules (Oh and Beer, 2007). Chez *A. thaliana*, l'homologue AtHIPM a été identifié dans la même étude et est également présent dans la membrane plasmique. Cependant, malgré la présence d'interacteurs d'HrpN dans le pommier et *A. thaliana*, deux espèces phylogénétiquement éloignées, HrpN est perçue différemment. En effet, la harpine induit des flux ioniques différents chez le pommier et *A. thaliana* (Reboutier and Bouteau, 2008). Enfin, Il a été montré que HrpN est impliqué dans la translocation de l'effecteur DspA/E (Bocsanczy et al., 2008) et pourrait également participer à la translocation d'effecteurs induisant un dépôt de callose chez le pommier comme HrpW (Boureau et al., 2011).

### 5.3.2 La harpine HrpW

HrpW n'est pas nécessaire au pouvoir pathogène de la bactérie. Il a été montré que cet effecteur ne participait pas à la mise en place de la mort cellulaire sur pommier puisque'un mutant *hrpW*, provoque des symptômes au même titre que la souche sauvage d'*E. amylovora* (Gaudriault et al., 1998). De plus, HrpW a un rôle antagoniste à HrpN en inhibant les flux ioniques et la mort cellulaire déclenchée par HrpN sur des cellules d'*A. thaliana* (Reboutier et al., 2007). Ces deux harpines agissent donc de manière antagoniste sur la mise en place de la mort cellulaire chez *A. thaliana*.

### 5.3.3 L'effecteur DspA/E

Historiquement cet effecteur a été décrit et nommé DspA en 1997 (Gaudriault et al., 1997). Un groupe aux États-Unis a nommé la même protéine DspE (Bogdanove et al., 1998). Le premier groupe, a montré que la sécrétion de cet effecteur était dépendante de la protéine DspB/F qui joue un rôle de protéine chaperonne de DspA/E en la stabilisant (Gaudriault et al., 2002). La partie N-terminale de DspB/F est requise pour permettre l'interaction avec DspA/E (Triplett et al., 2010). L'injection directe de DspA/E dans la cellule végétale, n'a été montrée que plus tard grâce à un système de protéines fusionnées. La partie N-terminale de DspA/E et la protéine Cya ont été fusionnées. L'injection dans la cellule, a été visualisée grâce à l'accumulation d'AMP cyclique issu de la conversion de l'ATP par la protéine Cya lorsqu'elle se lie à la calmoduline (Bocsanczy et al., 2008). Le second groupe, a étudié les homologies de séquence entre divers effecteurs. Il a été montré que DspA/E présente des homologies de séquence avec AvrE de *P. syringae* pv *tomato*. Ces deux protéines appartiennent à une famille d'effecteurs très conservée chez les bactéries qui utilisent un système de sécrétion de type III pour leur pouvoir pathogène. D'autre part les effecteurs de cette même famille complètent en partie le pouvoir pathogène d'un mutant *dspA/E* d'*E. amylovora* et inversement (Bogdanove et al., 1998).

DspA/E est une grosse protéine de 198 kDa indispensable au pouvoir pathogène de la bactérie. En effet, un mutant *dspA* est non-pathogène et ne se multiplie plus *in planta* (Gaudriault et al., 1997). La fonction de DspA/E reste à ce jour inconnue. Cependant, il a été montré que cet effecteur est impliqué dans plusieurs processus. Notamment, DspA/E supprime les défenses sur plante hôte puisqu'un mutant *dspA* n'induit plus de dépôt de callose contrairement à la souche sauvage (DebRoy et al., 2004). DspA/E est également impliqué dans l'induction d'enzymes de détoxification d'espèces réactives de l'oxygène chez le pommier. Il a d'ailleurs été proposé que DspA/E participerait à l'induction du burst oxydatif provoqué par *E. amylovora*. Enfin, il a été montré que DspA/E induit une nécrose lorsqu'il est exprimé de manière transitoire chez le pommier mais aussi chez une plante non-hôte le tabac (Boureau et al., 2006). De plus, DspA/E est toxique lorsqu'il est exprimé dans la levure (Oh and Beer, 2007). Cette toxicité est associée à une perturbation de l'actine et de l'endocytose (Siamer et al., 2011). Ces résultats suggèrent que DspA/E cible un ou des mécanismes conservés à travers le règne eucaryote.

La recherche d'interacteurs de DspA/E a permis d'identifier 4 protéines de pommier nommées les DspA/E Interacting Protein of Malus (DIPM) (Meng et al., 2006). Les auteurs ont montré que DspA/E interagit avec le domaine kinase intracellulaire putatif des DIPM. Cependant, la signification de cette interaction n'est pas encore connue. Chez *A. thaliana*, la recherche d'interacteurs a conduit à l'identification d'une histone méthylase putative à domaine Jumonji (Fagard, non-publié). De même, la signification fonctionnelle de cette interaction reste inconnue.

La séquence protéique de DspA/E a été analysée, et ceci a permis d'identifier plusieurs motifs. Une séquence NLS a été identifiée et une mutation de cette séquence n'altère pas la fonction de DspA/E. Montrant ainsi que ce motif n'est pas indispensable à la fonction de DspA/E. Une séquence d'adressage au peroxyosome a également été identifiée ainsi que des motifs leucine-zipper mais aucune signification fonctionnelle n'a été décrite pour ces motifs. Une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique a été identifiée et il a été montré que ce domaine est important pour l'effecteur WtsE de la bactérie *Pantoea stewartii* (*P. stewartii*) car le mutant altéré dans ce motif est moins virulent que la souche sauvage (Ham et al., 2009). Ceci suggère que la localisation de WtsE au niveau de la membrane du réticulum est nécessaire à sa fonction. Des motifs WXXXE qui permettraient de mimer des protéines GEFs eucaryotes ont été identifiés également. Ces motifs sont importants pour la fonction de l'homologue fonctionnelle WtsE de *P. stewartii* puisqu'une mutation de ces derniers altère le pouvoir pathogène de la bactérie *P. stewartii*. Il se trouve d'ailleurs que des insertions dans ces domaines, altèrent la fonction de DspA/E. Les auteurs, ont aussi identifié un double domaine  $\beta$ -propeller, domaine étant décrit comme un domaine d'interaction protéines-protéines (Jawad and Paoli, 2002) présent chez tous les effecteurs de la famille AvrE. De plus, la construction de protéines portant des mutations pentapeptides altèrent la stabilité et la fonction de DspA/E ce qui suggère que ce domaine est sujet à des contraintes structurales importantes pour la fonction de DspA/E (Siamer et al., 2013).

### 5.3.4 Autres effecteurs

*E. amylovora* secrète d'autres effecteurs qui ont un rôle mineur dans le pouvoir pathogène de la bactérie dans certains cas et majeur dans d'autres cas. La fonction de ces effecteurs est détaillée ci-après :

HrpJ : Cet effecteur participe à l'accumulation extracellulaire des harpines HrpN et HrpW montrant ainsi son rôle indirect dans le pouvoir pathogène (Nissinen et al., 2007)

HrpK : Cet effecteur n'a pas de rôle dans la virulence d'*E. amylovora* et a une fonction différente de celle de son homologue de *P. syringae* (Oh et al., 2005).

Les Protéines Eop1 et HopPtoCEa : Les fonctions de ces effecteurs sont à l'heure actuelle inconnues. Des mutants bactériens de ces protéines ont la même virulence que la souche sauvage (Oh et al., 2005; Zhao et al., 2005).

La Protéine Eop4 ou AvrRpt2Ea : Cette protéine contribuerait à l'agressivité d'*E. amylovora*, puisque les mutants de cet effecteur sont moins pathogènes sur poires immatures (Zhao et al., 2006).

Les Protéines Eop3, TraF, FlgL : La fonction de ces protéines reste à déterminer

La protéine HrpA : Cette protéine n'est pas un effecteur en soi mais est retrouvée dans le sécrétome d'*E. amylovora*. Son rôle pour la virulence est important puisqu'elle constitue la sous-unité structurale du pilus Hrp. La mutation de cette protéine, entraîne une suppression de l'assemblage du pilus Hrp et donc une incapacité de la bactérie à provoquer la maladie (Jin et al., 2001).

### 5.4 Autres facteurs de virulence

Des études récentes, montrent un rôle important de RpoN, un facteur sigma 54 alternatif qui régule positivement l'expression de HrpL, impliqué dans la régulation de la transcription du cluster *hrp*. Des mutants de ces facteurs sont non-pathogènes sur jeunes poires et sur des pousses de pommiers (Ancona et al., 2013; Ramos et al., 2013).

## 6. L'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* : Un modèle pour étudier le rôle de DspA/E

Nous avons vu précédemment que DspA/E jouerait un rôle indispensable dans la mise en place de la maladie sur plante hôte. Cependant, sa fonction dans la cellule végétale n'a jamais été clairement définie. La compréhension du rôle des effecteurs de type III chez les plantes hôtes d'*E. amylovora* est peu connue et est indispensable pour étudier de nouvelles voies de lutte possible contre la maladie.

L'utilisation d'*A. thaliana* comme modèle d'étude pour comprendre ce type de mécanismes permet de contourner les problèmes techniques liés à l'utilisation de la plante hôte de par les nombreux avantages procurés par cette plante modèle (générations, outils biotechnologiques, génétiques et moléculaires). Les premières analyses ont permis de montrer que la bactérie était capable de se multiplier de manière transitoire chez *A. thaliana* en provoquant une nécrose. Cette multiplication est dépendante d'un système de sécrétion de type III fonctionnel comme sur plante hôte. Ainsi, la plante modèle peut être utilisée pour comprendre les mécanismes liés à la mort cellulaire induite (puisque une nécrose est observée) et étudier les mécanismes de résistance mis en place *a fortiori* (puisque la multiplication est transitoire). Ces points seront développés dans cette partie.

### 6.1 La multiplication transitoire d'*E. amylovora* dépend du SSTT

Une première étude en 2008 est publiée sur l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* (Degrave et al., 2008). Les auteurs, montrent que la bactérie se multiplie de manière transitoire *in planta* et que cette multiplication, dépend d'un système de sécrétion de type III fonctionnel. De plus, d'autres réponses similaires à celles déterminées sur plante hôte ont été également observées. C'est le cas de la mise en place de réactions de défenses requérant l'induction de la voie de l'acide salicylique (SA) et une partie de celle de l'acide jasmonique (JA), ainsi que l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (FAOs). Les auteurs montrent aussi un rôle important de DspA/E dans l'induction de la mort cellulaire, l'activation de voies de défenses, et l'accumulation de FAOs. L'ensemble de ces résultats montrent que la plante modèle *A. thaliana*, est un outil pertinent pour étudier les mécanismes de défenses (Degrave et al., 2008).

### 6.2 Identification de régulateurs de la résistance non-hôte

La multiplication transitoire d'*E. amylovora*, chez *A. thaliana* suggère qu'il manque soit un facteur de susceptibilité chez cette plante soit que la plante elle-même restreint la multiplication de la bactérie. Dans l'étude réalisée par Moreau et al., 2012, il a été effectivement montré que la plante a besoin d'une synthèse protéique active pour limiter la multiplication de la bactérie *in planta*. Ces résultats montrent que la plante est capable de mettre en place des réactions de défenses fortes contre la bactérie.

Des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier des régulateurs de défenses contre la bactérie. La multiplication bactérienne étudiée chez le mutant *eds1-2* est 10 fois plus importante que le contrôle. De plus, l'analyse de facteurs dépendant de EDS1 a permis d'identifier des facteurs de transcriptions de type WRKY comme étant des régulateurs positifs des défenses (WRKY46 et 54) et le facteur de transcription WRKY70 comme étant un régulateur négatif. L'ensemble de ces résultats montrent qu'EDS1 est un régulateur positif des défenses chez *A. thaliana* en présence d'*E. amylovora*, les défenses s'expriment de manière active.

### 6.3 DspA/E est indispensable pour la survie d'*E. amylovora* chez *A. thaliana*

Afin d'étudier le rôle de DspA/E dans la cellule végétale, l'équipe de Mathilde Fagard a construit des plantes transgéniques exprimant DspA/E sous contrôle d'un promoteur inductible à l'estradiol (Degrave, 2009). Grâce à ces constructions, l'équipe a pu montrer que DspA/E est toxique pour les cellules d'*A. thaliana* et ce en très faible quantité. Les auteurs ont aussi montré que l'expression de DspA/E *in planta* permet de restaurer la croissance d'un mutant bactérien *dspA/E*. Des analyses transcriptomiques montrent que DspA/E induit et réprime des sets de gènes de défenses et que la toxicité ne dépend pas d'une voie SA fonctionnelle. La répression de la synthèse protéique observée en présence de la bactérie est due à l'injection de DspA/E dans les cellules par la bactérie puisque DspA/E seul inhibe la synthèse protéique. Cette étude montre que DspA/E est toxique et provoque des modifications importantes dans la cellule permettant à la bactérie de se multiplier *in planta*.

# **Objectifs et présentation générale**



## Objectifs et présentation générale

Le pouvoir pathogène de la bactérie *E. amylovora* dépend d'un système de sécrétion de type 3 fonctionnel. Le système de sécrétion permet aux bactéries d'injecter des effecteurs dans les cellules végétales qui perturbent le métabolisme des cellules. Cette perturbation a pour conséquence de permettre la multiplication des bactéries *in planta*.

Parmi les effecteurs injectés par *E. amylovora* l'effecteur DspA/E est indispensable à la virulence puisque des mutants *dspA/E* ne sont plus pathogènes sur plante hôte (Barny et al., 1990). La fonction de l'effecteur DspA/E dans la cellule reste cependant inconnue. L'expression transitoire du gène *DspA/E* provoque la nécrose chez le pommier et chez le tabac (Boureau et al., 2006). Ceci indique que l'effecteur DspA/E est capable à lui seul de provoquer la mort des cellules végétales. Ceci suggère que la fonction de DspA/E pourrait être liée à sa toxicité.

En parallèle, il a été montré que DspA/E joue un rôle important lors de l'infection de la plante modèle *A. thaliana* puisqu'un mutant *dspA/E* ne se multiplie pas dans la plante (Degrave et al., 2008). La construction de plantes transgéniques exprimant DspA/E sous contrôle d'un promoteur inductible a permis de montrer que DspA/E est également toxique chez *A. thaliana*. C'est sur cette partie que j'ai commencé mes travaux de thèse. J'ai contribué à la caractérisation phénotypique des plantes transgéniques exprimant DspA/E. L'ensemble de ces travaux a donné lieu à une publication parue en mars 2013 (Degrave et al., 2013). Ces travaux sont présentés dans la première partie des résultats.

Afin de mieux comprendre la fonction de DspA/E dans la cellule végétale et d'identifier des facteurs végétaux impliqués dans la toxicité de DspA/E, un crible de mutants suppresseurs de la toxicité induite par DspA/E a été initié avant mon arrivée. L'objectif de ce crible était d'identifier un ou plusieurs gènes qui sont impliqués dans la toxicité induite par DspA/E. Une lignée portant DspA/E a subi une mutagenèse à l'EMS et des individus résistants à la toxicité de DspA/E ont été sélectionnés avant mon arrivée. La caractérisation de mutants confirmés constitue l'aspect principal de mon travail de thèse. La seconde partie de mon manuscrit décrit la caractérisation des mutants d'*A. thaliana* résistants dont la toxicité à DspA/E a été supprimée. Je terminerai cette partie par une discussion. Dans une troisième partie, je présenterai mes résultats sur le stress oxydant pendant l'interaction et le rôle de DspA/E sur ce stress oxydant.

# Résultats

# Chapitre I : Caractérisation de lignées d'*Arabidopsis thaliana* exprimant l'effecteur de type 3 DspA/E

## I. Introduction

L'étude de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* a permis de montrer que l'effecteur de type 3 DspA/E est nécessaire à la multiplication transitoire d'*E. amylovora* chez *A. thaliana*. De plus, *E. amylovora* induit chez *A. thaliana* une réponse très proche de celle observée chez la plante hôte, le pommier (mêmes réactions de défenses, nécrose...). Dans les deux plantes, l'effecteur DspA/E est nécessaire pour le déclenchement de cette réponse. Cependant, ces résultats ne suffisent pas pour comprendre la fonction de DspA/E dans la cellule. Afin de comprendre la fonction de DspA/E en dehors du contexte bactérien et en sachant que cet effecteur est injecté directement dans les cellules végétales des plantes transgéniques exprimant le gène *DspA/E* sous contrôle d'un promoteur inductible à l'estradiol ont été construites. Ces constructions ont permis de comprendre les premiers mécanismes impliqués dans le rôle de DspA/E.

## II. Démarche expérimentale

Au cours de son doctorat, Alexandre Degrave a effectué tout le travail de construction des lignées transgéniques exprimant le gène *DspA/E*. L'effecteur DspA/E étant toxique pour les cellules eucaryotes, le choix des constructions s'est porté sur un système inductible avec une construction portant le gène *DspA/E* sous contrôle du promoteur *LexA* qui lie la protéine chimère XVE (domaine de liaison à l'ADN de *LexA*, domaine activateur de la transcription VP16 et région régulatrice du récepteur à l'estradiol de l'homme) (Zuo et al., 2000). Ce système inductible a été choisi car il ne provoque pas l'induction de réactions de défenses contrairement à d'autres systèmes inductibles comme le promoteur inductible à la dexaméthasone (Kang et al., 1999). Plusieurs constructions ont été réalisées (avec ou sans fusion GUS ou GFP) et leur fonctionnalité a été testée par expression transitoire dans des feuilles de tabac (Degrave, 2009). Les constructions fonctionnelles ont été utilisées pour transformer *A. thaliana*. Les transformants présentant une expression stable de DspA/E dans la descendance, ont été conservés et sont décrits dans l'article ci-après.

### III. Article: The bacterial effector DspA/E is toxic in *Arabidopsis thaliana* and is required for multiplication and survival of fire blight pathogen

**Auteurs :** Alexandre DEGRAVE, Manon MOREAU, Alban LAUNAY, Marie-Anne BARNY, Marie-Noëlle BRISSET, Oriane PATRIT, Ludivine TACONNAT, Régine VEDEL et Mathilde FAGARD

**Revue :** Molecular Plant Pathology

#### Traduction du résumé :

L'effecteur de type 3 DspA/E est un facteur de pathogénicité essentiel pour la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*. Nous avons montré que DspA/E est requis pour la multiplication transitoire dans les feuilles de la plante non-hôte *Arabidopsis thaliana* puisqu'un mutant *dspA/E* d'*E. amylovora* est incapable de se multiplier. Nous avons exprimé DspA/E dans des plantes transgéniques d'*A. thaliana* sous contrôle d'un promoteur inductible à l'estradiol et nous avons observé que lorsque DspA/E est exprimé *in planta* il permet de restaurer la croissance d'un mutant *dspA/E* d'*E. amylovora*. L'expression de DspA/E dans ces plantes transgéniques conduit à la modulation d'au moins un facteur deux de l'expression de 384 gènes, dont la plupart sont induits (324 gènes). Les gènes induits et réprimés comportent une forte proportion de gènes de défense. L'expression de DspA/E conduit à la mort des cellules végétales de manière dépendante de la voie de l'acide salicylique. L'analyse de plantules transgéniques d'*A. thaliana* exprimant une fusion GFP::DspA/E indique que cette protéine de fusion ne pouvait être détectée que dans un faible nombre de cellules par plantule suggérant une dégradation ou une absence de l'accumulation de DspA/E dans les cellules des plantes. Nous avons trouvé que DspA/E réprime la synthèse protéique quand il est injecté par *E. amylovora* et quand il est exprimé dans les plantes transgéniques. Nous concluons donc que l'effecteur DspA/E est toxique chez *A. thaliana* et il provoque des modifications parmi lesquelles la répression de la synthèse protéique serait déterminante pour faciliter la nécrose et la croissance bactérienne.

**The bacterial effector DspA/E is toxic in *A. thaliana* and is required for multiplication and survival of fire blight pathogen**

Alexandre Degrave<sup>1,2,3</sup>, Manon Moreau<sup>1,2,3</sup>, Alban Launay<sup>1,2,3</sup>, Marie-Anne Barny<sup>1,2,3</sup>, Marie-Noëlle Brisset<sup>5</sup>, Oriane Patrit<sup>1,2,3</sup>, Ludivine Taconnat<sup>4</sup>, Régine Vedel<sup>1,2,3</sup>, and Mathilde Fagard<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> : INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Pathogènes, UMR217, France

<sup>2</sup> : UPMC, UMR217, Paris, France

<sup>3</sup> : AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, Paris, France

<sup>4</sup> : Unité de Recherche en Génomique Végétale 91057 Evry cedex France

<sup>5</sup> : UMR 1345 IRHS (INRA, Université d'Angers, Agrocampus-Ouest) 42, rue George Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé, France

\* : Corresponding author: Mathilde Fagard. Current address: IJPB UMR 1318 INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St-Cyr (RD10) 78026 Versailles cedex France. Tel: 33-(0)1-30-83-30-47; Fax: 33-(0)1-30-83-30-99. E-mail: mathilde.fagard@versailles.inra.fr

Running title: DspA/E is toxic in *A. thaliana* and required for *E. amylovora* growth

---

## Abstract

The type three effector DspA/E is an essential pathogenicity factor of the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. We show that DspA/E is required for transient bacterial growth in non-host *A. thaliana* leaves, since an *E. amylovora dspA/E* mutant is unable to grow. We expressed DspA/E in *A. thaliana* transgenic plants under the control of an estradiol-inducible promoter and found that DspA/E expressed *in planta* restored the growth of a *dspA/E* mutant. DspA/E expression in these transgenic plants led to at least a 2-fold modulation of the expression of 384 genes, mostly induced (324 genes). Both induced and repressed genes contained high proportions of defense genes. DspA/E expression ultimately resulted in plant cell death without requiring a functional SA signaling pathway. Analysis of *A. thaliana* transgenic seedlings expressing a *GFP::DspA/E* fusion indicated that the fusion protein could only be detected in a few cells per seedling, suggesting degradation or absence of accumulation of DspA/E in the plant cells. Consistently, we found that DspA/E repressed plant protein synthesis when injected by *E. amylovora* or when expressed in transgenic plants. Thus, we conclude that DspA/E is toxic to *A. thaliana*: it promotes thorough modifications among which repression of protein synthesis could be determinant in facilitating necrosis and bacterial growth.

## Introduction

The type three secretion system (T3SS) is a major determinant required for virulence of many gram-negative bacterial pathogens on both animal and plant hosts. Bacteria use the T3SS to inject type three effectors (T3Es) inside eukaryotic cells. For example, different strains of phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* produce from 15 to 35 effectors targeting a variety of cellular compartments (Block and Alfano, 2011). Several of these T3Es have been characterized and many suppress eukaryotic cell defenses using different strategies such as interfering with immune receptor signaling, blocking RNA pathways and vesicle trafficking, or altering organelle function (Block and Alfano, 2011). T3Es can also interfere directly with plant gene expression: this is the case of *Xanthomonas* TAL effectors which target different plant genes (Boch and Bonas, 2010) including genes encoding glucose export proteins thereby inducing high glucose levels in the apoplast (Chen et al., 2010). Although the cellular targets and/or protein activities of a number of T3Es of plant pathogenic bacteria have been identified (Grant et al., 2006; Alfano, 2009; Block and Alfano, 2011) the majority of them remain unknown (Alfano, 2009). While the primary function of T3Es is to promote disease, some effectors may be recognized by the corresponding plant disease resistance proteins in resistant plant cultivars and trigger defense responses, including the hypersensitive response (HR), a very fast response of plant cells involving defense gene expression and cell death (Block *et al.*, 2008).

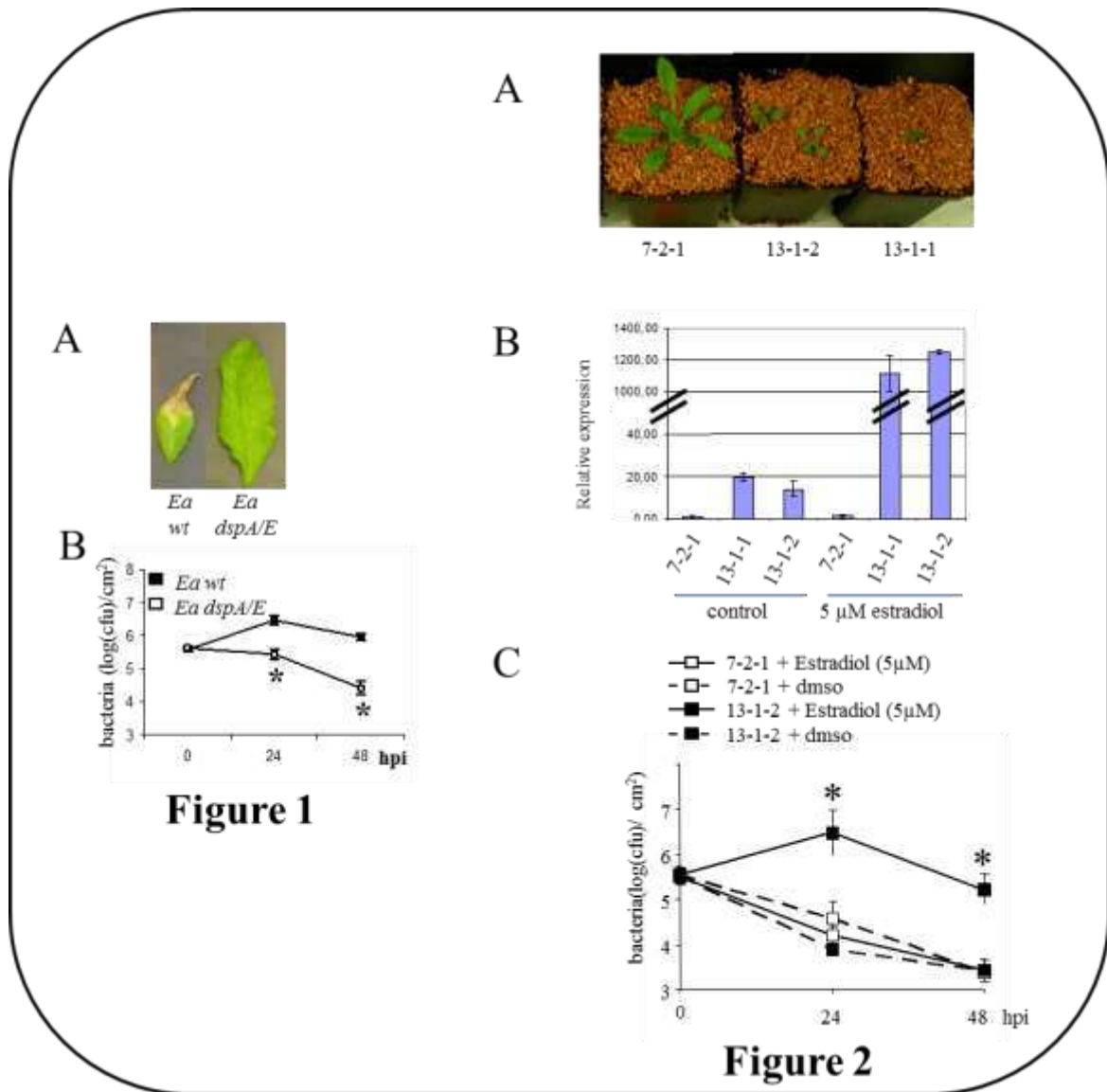
*E. amylovora* is a gram-negative bacterium responsible for fire blight disease affecting plants of the *Pyreae* tribe of *Rosaceae* such as apple or pear. The main symptom of this disease is a progressive necrosis of actively growing aerial parts of susceptible hosts (Billing, 1983). The T3SS of *E. amylovora* is absolutely required for pathogenicity as T3SS-deficient mutants are non pathogenic and do not multiply in host leaves (Barny et al., 1990). During disease, the T3SS of *E. amylovora* represses the flavonoid biosynthesis pathway but induces the expression of three genes encoding PR proteins (*PR-5*, *CHT* and *GLU*) and a gene encoding an enzyme of the phenylpropanoid pathway (*PAL*) (Venisse et al., 2002). The T3SS of *E. amylovora* was shown to secrete at least 12 effectors (Nissinen et al., 2007). Among them, DspA/E is primordial since *E. amylovora* mutants defective for DspA/E are non pathogenic and unable to grow in host plants (Barny et al., 1990; Gaudriault et al., 1997) and in non-host tobacco (Oh et al., 2007).

DspA/E belongs to a conserved family of effectors, present in most gram-negative phytopathogenic bacteria (Kvitko et al., 2009). Two of these related effectors have been demonstrated to be functional homologs of DspA/E: the AvrE effector of *P. syringae* pv. tomato (Bogdanove et al., 1998) and the WtsE effector of *Pantoea stewartii* (Ham et al., 2006a). The virulence-promoting activity of this family of effectors is thought to depend on their ability to suppress the deployment of plant defenses such as callose deposition (DebRoy et al., 2004; Kvitko et al., 2009). However, to date it is not clear what specific cellular processes these effectors target. These effectors have the particularity of triggering cell death in host plants (Badel *et al.*, 2006; Kvitko *et al.*, 2009) and a strong link seems to exist between their virulence-promoting activity and their ability to trigger cell death. For example deletion derivatives of the WtsE protein of *P. stewartii* are affected in both bacterial growth promotion on host plant and



necrosis triggering in non-host plants (Ham *et al.*, 2008). Hence, several authors have suggested that the virulence-promoting activity of this family of effectors could be due to their ability to cause plant cell death (Boureau *et al.*, 2006; Ham *et al.*, 2008). This hypothesis is supported by a recent report indicating that DspE from *Pectobacterium carotovorum* is not required to suppress callose deposition but is required for the triggering of cell death and disease (Kim *et al.*, 2011).

We demonstrated previously that DspA/E is required for induction of necrosis by *E. amylovora* in non-host *A. thaliana* (PubMed entry). In this paper, we use *A. thaliana* to unravel the early events involving DspA/E which enable *E. amylovora* to induce cell death and survive in plant tissues during the first 48 hours of the infection. We show that DspA/E is required for growth and survival of *E. amylovora* in *A. thaliana*. We describe *A. thaliana* lines expressing the *dspA/E* gene under the control of an estradiol-inducible promoter which is able to rescue the *in planta* growth of a *dspA/E* mutant but is toxic for *A. thaliana* plants. The expression of DspA/E leads to the induction of a large defense response at the transcriptional level including activation of the salicylic acid (SA) signaling pathway. Finally, we found that the toxicity of DspA/E is associated with an early repression of *de novo* protein synthesis. DspA/E also represses protein synthesis when injected by the bacteria in the plant cell and biochemically suppressing protein synthesis restores the *in planta* multiplication of a *dspA/E* mutant.



**Figure 1: *DspA/E* is required for *E. amylovora* multiplication and survival in non-host *A. thaliana***

A, B: Leaves of *A. thaliana* Col-0 5 week-old plants were inoculated with wild-type *E. amylovora* (*Ea*) or a *dspA/E* mutant (*dspA/E*) at  $10^7$  CFU/ml. A: representative pictures of symptoms 6 dpi. B: Bacteria were extracted and counted at the indicated time points. Stars indicate values significantly different from *Ea* at the corresponding time point according to Mann and Whitney's test (P value < 0.05).

**Figure 2: Phenotype of *DspA/E* transgenic plants**

A: 4 week-old plants grown in 16h day/8h night. B: expression of the *dspA/E* gene in transgenic lines 24 hours following treatment or not with estradiol. C: Bacterial counts of a *dspA/E* mutant of *E. amylovora* in lines 7-2-1 and 13-1-2 (similar results were obtained with the 13-1-1 line). Bacteria were inoculated with or without 5 μM estradiol. Stars indicate values significantly different from the untreated 7-2-1 control line at the corresponding time point according to Mann and Whitney's test (P value < 0.05).

## Results

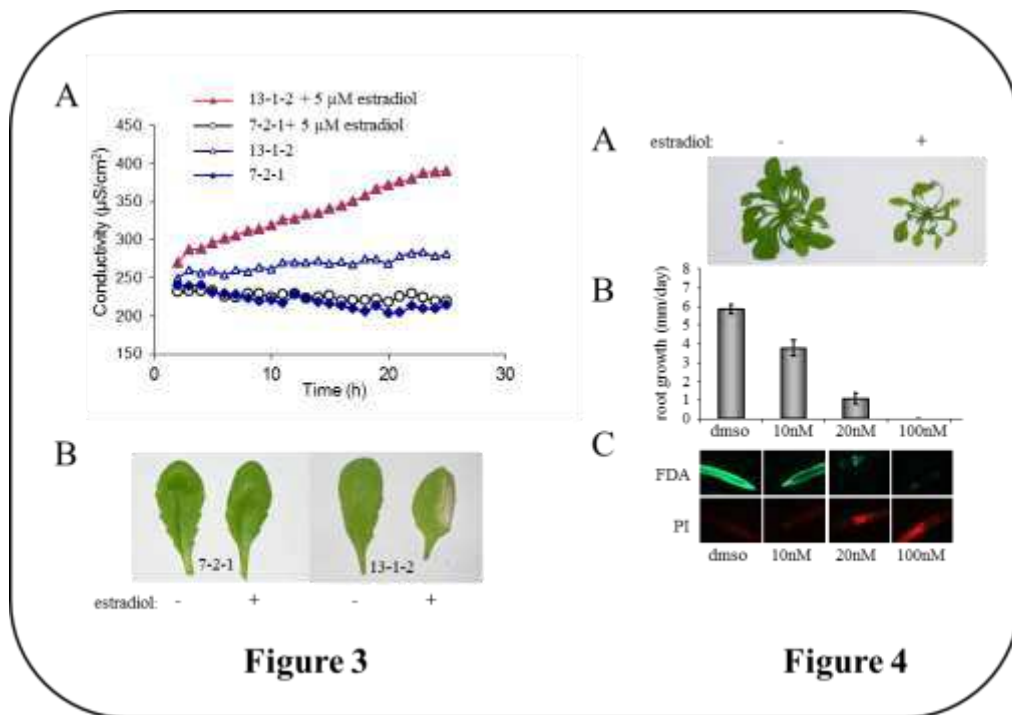
### DspA/E is required for multiplication and survival of *E. amylovora* in *A. thaliana*

To determine whether DspA/E is required for the transient growth of *E. amylovora* in *A. thaliana*, we inoculated wild-type *A. thaliana* plants of the Col-0 ecotype with a *dspA/E* mutant of *E. amylovora*. The *dspA/E* mutant showed an important reduction in bacterial population size both 24 and 48 hpi compared to wild-type *E. amylovora*, indicating that DspA/E is required for *E. amylovora* transient multiplication in *A. thaliana* (Figure 1B). Furthermore, bacterial populations of the *dspA/E* mutant decreased immediately following inoculation, indicating that DspA/E is also required for bacterial survival *in planta*. Thus, DspA/E is required for transient multiplication and survival of *E. amylovora* as well as for the production of associated necrotic symptoms in non-host *A. thaliana* plants.

### DspA/E expressed in transgenic plants restores the multiplication of an *E. amylovora dspA/E* mutant.

To identify the cellular modifications that could be attributed to the action of DspA/E alone, we wished to express the *dspA/E* gene in plant cells in the absence of bacteria. We generated, by Agrobacterium-mediated transformation, *A. thaliana* transgenic plants expressing a *GFP::dspA/E* fusion under the estradiol-inducible *lexA* promoter (Zuo *et al.*, 2000). We chose to construct an N-terminal GFP fusion since the functional homolog of DspA/E in *P. stewartii*, WtsE, requires an intact C-terminus to be functional (Ham *et al.*, 2006b). After transformation of Col-0 plants, selection of primary transformants led to the isolation of two independent lines carrying the *GFP::dspA/E* fusion (hereafter referred to as lines 13-1-1 and 13-1-2). As a control, we isolated a line carrying the *GFP* gene alone under the estradiol-inducible *lexA* promoter (hereafter referred to as line 7-2-1). Homozygous individuals for the T-DNA were selected in the progeny of each primary transformant and further experiments were conducted on homozygous individuals. The overall results obtained with lines 13-1-1 and 13-1-2 were similar and the results are therefore sometimes presented for one line only to simplify the presentation. Lines 13-1-1 and 13-1-2 showed a reduction in plant size in the absence of estradiol treatment compared to control plants (Figure 2A), however they were able to bolt and were fertile. This phenotype is consistent with the fact that weak expression of the *dspA/E* gene could be detected by real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in the 13-1-1 and 13-1-2 lines in the absence of estradiol treatment (Figure 2B). Treatment of seedlings with estradiol led to a 50-fold increase in expression of DspA/E in lines 13-1-1 and 13-1-2 (Figure 2B).

To determine whether DspA/E expressed in the transgenic plants was able to rescue the growth of a *dspA/E* mutant of *E. amylovora*, we co-inoculated leaves of transgenic plants with a *dspA/E* mutant and with estradiol (Figure 2C). Transient growth of the *dspA/E* mutant was observed in the transgenic plants expressing DspA/E (Figure 2C). No bacterial growth-promoting effect of estradiol treatment was obtained in the 7-2-1 control line inoculated with a *dspA/E* mutant (Figure 2C). This result indicates that DspA/E produced in *A. thaliana* transgenic plants promotes growth of *E. amylovora* as it does when it is injected directly by the bacteria through the T3SS. DspA/E produced *in planta* was also able to increase the growth of wild-type *E. amylovora* (Supp. Figure 1A).



### Figure 3: DspA/E triggers electrolyte leakage and cell death

**A:** electrolyte measurement in seedlings treated or not with estradiol. Experiments were repeated twice with similar results. **B:** The right half of DspA/E-transgenic leaves were infiltrated with DMSO or 20  $\mu\text{M}$  estradiol and pictures taken 5 days after infiltration. **A, B:** Similar results were obtained with the 13-1-1 line.

### Figure 4: DspA/E inhibits plant growth

**A:** 5-week-old 13-1-2 transgenic plants were sprayed each day with 5  $\mu\text{M}$  estradiol or DMSO during three weeks. Picture shows representative plants for each treatment. The control 7-2-1 plants were unaffected by estradiol treatment (data not shown). **B:** 13-1-2 seedlings were immersed during 10 minutes in estradiol-containing solutions and cleared. Each bar represents the mean growth in mm per day for 15 seedlings  $\pm$  SE. Results are shown for the 13-1-2 line. Root length in the 7-2-1 control line was unaffected (Supp. Figure 1B). **C:** Two days after treatment, the root tips of 13-1-2 transgenic seedlings were colored for 5 minutes in an FDA-PI staining solution, rinsed and observed under fluorescence microscope using the appropriate filter. Living tissues are stained green by FDA; dead tissues are stained red by PI. Pictures show one representative root tip for each treatment. No significant PI staining was found in 7-2-1 control seedlings (Supp. Figure 3).

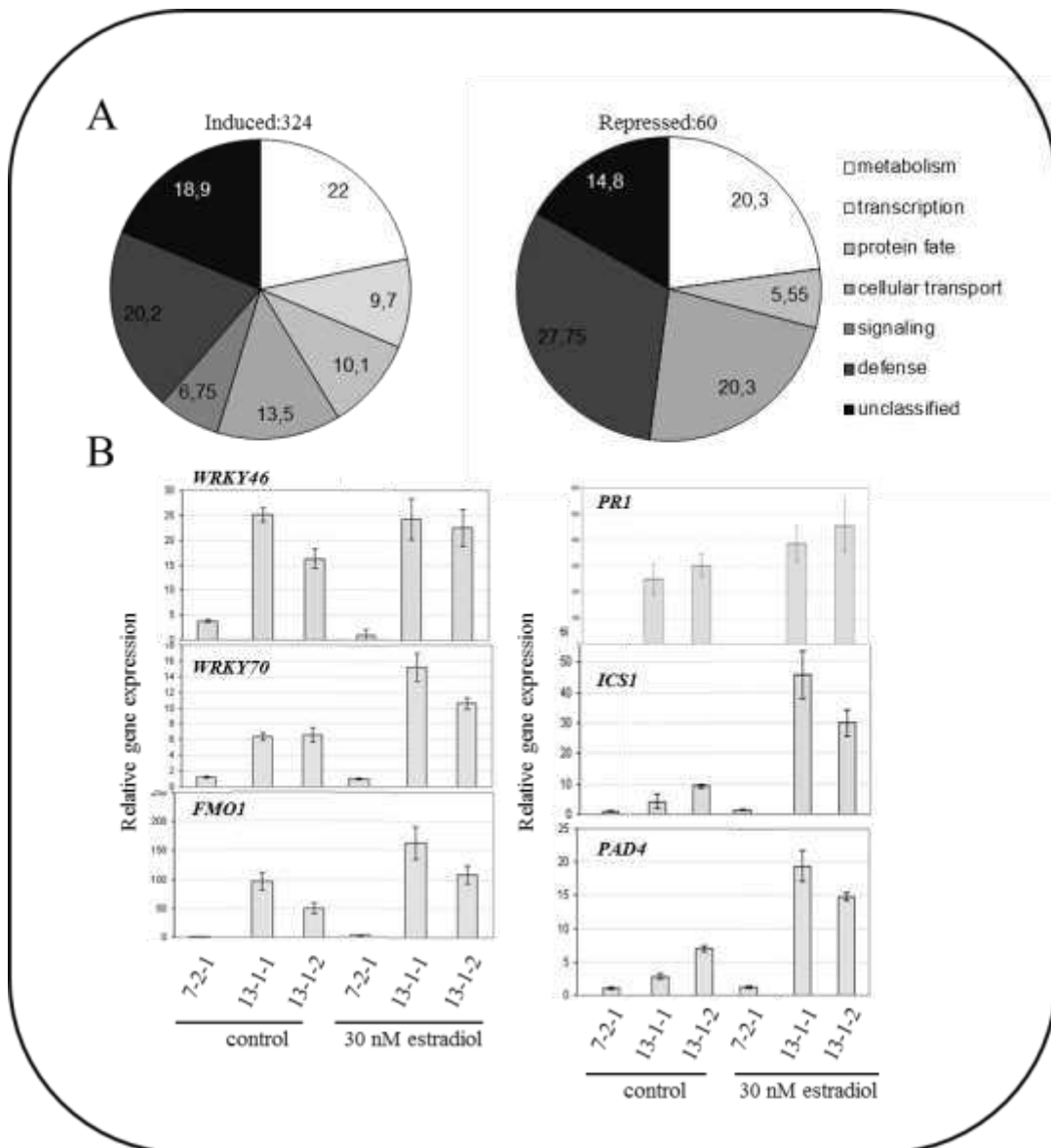
### DspA/E triggers electrolyte leakage and cell death in *A. thaliana*

DspA/E was previously shown to induce electrolyte leakage and cell death when expressed transiently in tobacco and apple leaves (Boureau et al., 2006). Electrolyte leakage from the cells is commonly used to evaluate membrane damage caused by biotic or abiotic stresses. Electrolyte leakage was detected 1 h following estradiol treatment of whole 13-1-2 seedlings and increased continuously thereafter (Figure 3A). Interestingly, untreated 13-1-2 seedlings showed weak electrolyte leakage that 7-2-1 control seedlings did not show (Figure 3A), which is likely a consequence of the weak expression of DspA/E observed in untreated 13-1-2 seedlings. Expression of DspA/E in the transgenic lines ultimately led to the necrosis of treated leaf tissue: leaves started showing wilting 24 hours following inoculation with estradiol and were completely necrotic 5 days post induction; the 7-2-1 control line showed no sign of necrosis whether treated with estradiol or not (Figure 3B). In order to determine the kinetics of induction of cell death, we stained the 13-1-2 transgenic seedlings with Evans blue and found that cell death could be detected 16 hpt (hours post treatment; Supp. Figure 2).

### DspA/E inhibits growth of leaf and root in *A. thaliana*

When estradiol treatment of transgenic plants was performed by spraying instead of infiltrating, we found that the youngest leaves of the rosette did not undergo necrosis but were severely reduced in size (Figure 4A). This sub-lethal effect of DspA/E could be due to an inefficient penetration of estradiol in the leaves using this method and suggested that low concentrations of estradiol induce a reduction of plant growth, which would be consistent with the dwarfed phenotype of the 13-1-1 and 13-1-2 transgenic plants. In order to test this hypothesis, we analyzed primary root growth of two-week-old transgenic plants treated with a range of estradiol concentrations. As shown in Figure 4B, treatment of transgenic seedlings with the lowest concentrations (10 and 20 nM) reduced root growth compared to mock-treated seedlings while treatment with the highest concentration of estradiol (100 nM) completely inhibited root growth. Estradiol treatment had no effect on primary root growth of the 7-2-1 control line (Supp. Figure 1B). Staining of root cells with fluoresceine diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) indicated that at the lowest concentrations used (10 nM) we could not detect cell death and that root cells were still alive (Figure 4C) while treatment with higher concentration (100 nM) induced cell death. At the intermediate concentration (20 nM), both PI- and FDA-stained patches could be found, indicating the presence of both dead and live cells. The 7-2-1 control line did not show significant staining with PI following estradiol treatment (Supp. Figure 3). Collectively, these data show that DspA/E has a progressive inhibitory effect on primary root growth and that low expression of DspA/E is sufficient to repress root growth without causing apparent cell death.

To determine if DspA/E could also reduce plant growth when injected by the bacteria, we infected *in-vitro* grown *A. thaliana* seedlings with wild-type *E. amylovora* or a *dspAE* mutant. Six days after infection, we found no apparent necrosis but the seedlings infected with wild-type *E. amylovora* showed a reduction of growth compared to *dspA/E* mutant- or mock-treated seedlings (Supp. Figure 4).



**Figure 5: Identification of gene expression modifications induced by DspA/E in *A. thaliana***

**A:** Functional distribution of genes modulated in the 13-1-2 line 6 h following estradiol treatment according to the MIPS Functional Catalogue (Ruepp et al., 2004). **B:** Gene expression levels in seedlings 6 h following mock or estradiol treatment by qRT-PCR.

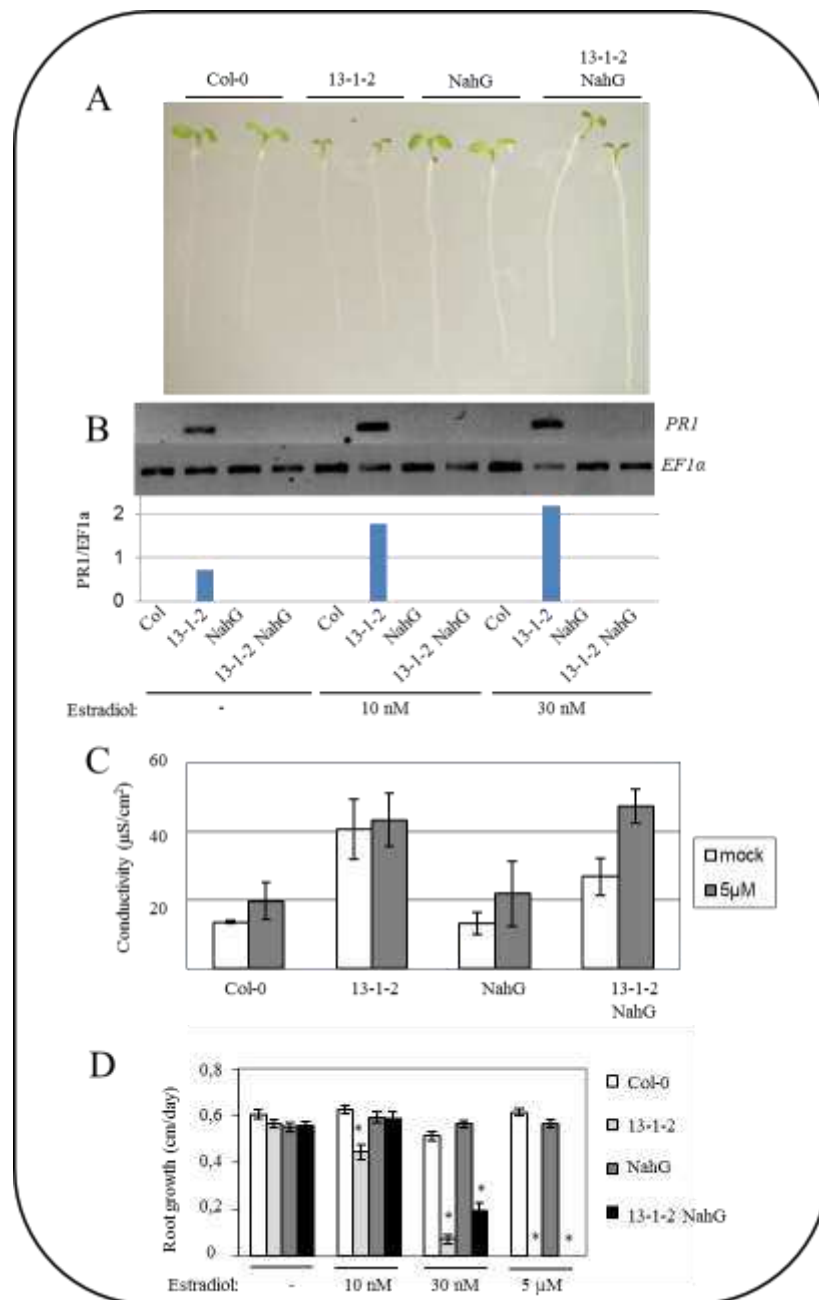


## DspA/E induces the expression of an array of *A. thaliana* defense genes

To determine the impact of DspA/E alone on gene expression in *A. thaliana* we analyzed the transcriptome of 13-1-2 transgenic plants using complete *A. thaliana* microarray (CATMA) chips (Crowe et al., 2003; Hilson et al., 2004). We used a low concentration of estradiol (30 nM) that does not completely suppress plant growth (Figure 4B) and chose the 6h time point (before cell death could be detected using Evans blue; Supp. Figure 2) in order to identify early gene expression changes associated with DspA/E expression: two-week-old seedlings of the 13-1-2 line were treated with 30 nM estradiol or mock-treated and RNA was extracted 6 h following treatment. The 7-2-1 transgenic line expressing GFP was used as a control. Two biological replicates and a dye-swap were performed for each set of pairwise comparisons.

Statistical analysis (see methods) showed that estradiol treatment of the control line (7-2-1) led to the modulation of 22 genes all of which were affected less than 2-fold in their expression. These 22 genes were removed from our analysis (data not shown). 81 genes were expressed more than two fold in the untreated 13-1-2 line compared to the untreated control line (Supp. Table 1). Several EDS1- and/or SA-dependent genes such as *PAD4*, *PR1*, and *WRKY70* were significantly induced in untreated 13-1-2 line. This suggested that the low expression of DspA/E in line 13-1-2 was sufficient to induce, at least partly, these signaling pathways. Estradiol-induced DspA/E expression in the 13-1-2 line led to the induction of 321 genes and repression of 60 genes by at least 2-fold (Supp. Table 2). Figure 5A shows the functional distribution of these genes. Most functional categories were affected by DspA/E; however, the defense category was very highly represented in both induced and repressed genes. Among the induced genes, we found genes modulated by the SA pathway and many WRKY transcription factors (Supp. Figure 5). Genes encoding JA biosynthesis or signaling were for the most part not induced (Supp. Figure 5). We analyzed by qRT-PCR a subset of the most strongly induced genes with a focus on SA-signaling and WRKY transcription factors in the two transgenic lines bearing the *dspA/E* gene (Figure 5B). These genes showed higher levels of expression in untreated 13-1-1 and 13-1-2 lines compared to the control line (7-2-1). However, most of these genes were induced following estradiol-induced expression of DspA/E in 13-1-1 and 13-1-2 lines but not in the 7-2-1 control line. Only *WRKY46* was not induced by estradiol treatment in the 13-1-1 line suggesting that the high level of expression of *WRKY46* in untreated plants of this line was the maximum. We compared the list of genes modulated by DspA/E alone to the genes we had previously identified as modulated by *E. amylovora* infection (Moreau et al., 2012). Among the 1121 genes induced by *E. amylovora* infection, 366 were significantly induced (among which 174 were induced at least 2-fold) in the 13-1-2 transgenic plants following estradiol treatment. Among the 1035 genes repressed by *E. amylovora*, 97 were significantly repressed (among which 12 were repressed at least 2-fold) in the 13-1-2 transgenic plants following estradiol treatment (Supp. Table 3). In addition, only 12 genes showed opposite modulation by *E. amylovora* and DspA/E (Supp. Table 3). Most defense genes and WRKY genes were modulated in a similar manner by *E. amylovora* and DspA/E (Supp. Figure 5). Furthermore, we confirmed the involvement in DspA/E in the induction of the SA pathway and WRKY transcription factors since these genes were less induced 6 or 24 hpi by a *dspA/E* mutant than by the wild-type strain of *E. amylovora* (Supp. Figure 6).





**Figure 6: Role of the SA pathway in the toxicity of DspA/E**

**A:** Two-week old *in vitro*-grown seedlings. Both 13-1-2 and 13-1-2 NahG plants show a reduction of plant size compared to wild-type and NahG seedlings. **B:** Top two panels: *PR1* and  $\alpha$  expression detected by end-point RT-PCR. The *EF1 $\alpha$*  gene is used as a constitutive control. Bottom panel: intensity of *PR1* signal relative to the *EF1 $\alpha$*  signal measured using the ImageJ software. No expression was found in 13-1-2 NahG plants whether they were treated with estradiol or not. **C:** Electrolyte leakage of mock or estradiol-treated leaves measured 24 hpt. Control plants did not display significant electrolyte leakage. **D:** Root growth 24 h following treatment with different concentrations of estradiol. Stars indicate a significant difference from the control line at the same estradiol concentration (Mann and Whitney's test; P value < 0.05). We also found a significant difference between electrolyte leakage of 13-1-2 NahG in estradiol- and mock-treated seedlings.

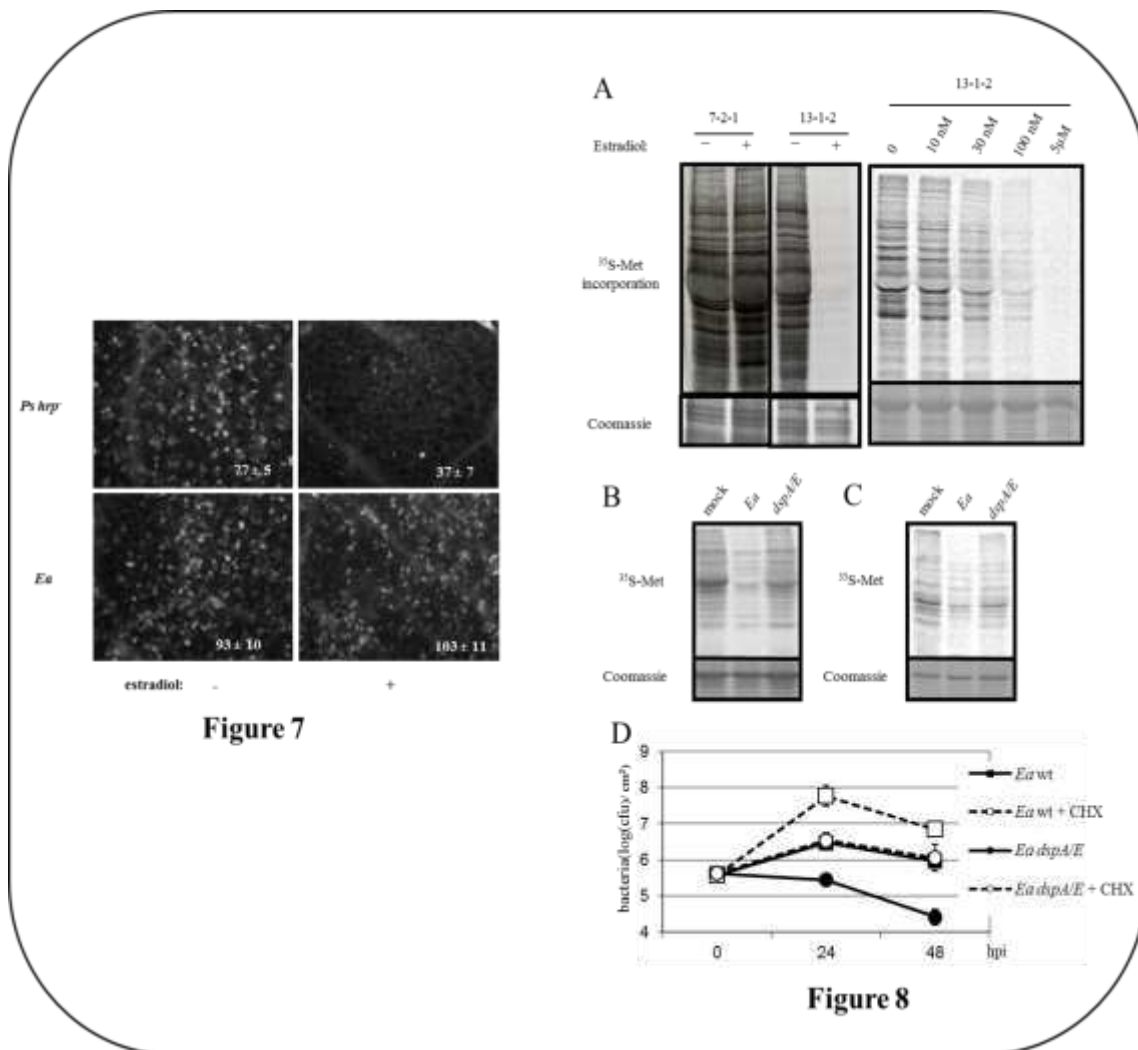
## The SA pathway is involved in the toxicity of DspA/E in *A. thaliana* only at low levels of DspA/E expression

The salicylic acid (SA) signaling pathway has been shown previously to be involved in the induction of cell death in plants. Indeed, several lesion mimic mutants have been shown to require the SA pathway for the triggering of necrotic lesions (Lorrain et al., 2003; Meng et al., 2009). We therefore crossed the 13-1-2 transgenic line to the NahG transgenic plants in which SA cannot accumulate (Lawton et al., 1995). In the F2 progeny, we selected plants homozygous for the *GFP::dspA/E* transgene and for the NahG transgene. As observed for the 13-1-2 plants, the 13-1-2 NahG plants showed a reduction in plant size compared to wild-type plants (Figure 6A). As expected, the SA-dependent marker gene *PR1* was not activated in these double homozygous plants (Figure 6B). We analyzed the induction of membrane damage provoked by DspA/E in these plants by measuring electrolyte leakage: electrolyte leakage was weaker in untreated 13-1-2 NahG plants than in 13-1-2 untreated plants. However, when seedlings were treated with 5  $\mu$ M estradiol, DspA/E was still able to induce electrolyte leakage in the presence of the NahG transgene (Figure 6C). We also checked whether inhibition of root growth was affected in the double homozygous plants. We found that DspA/E was still able to inhibit root growth at the strong concentration of estradiol used (5  $\mu$ M) but that root growth was slightly less inhibited by DspA/E in the presence of the NahG transgene at lower concentrations (10 and 30 nM; Figure 6D).

Altogether these data indicated that the SA signaling pathway contributes to the toxicity of DspA/E when DspA/E is not highly expressed (in mock- or 10 and 30 nM estradiol-treated seedlings) but that the SA pathway is not required for DspA/E toxicity in *A. thaliana* when it is highly expressed (in 5  $\mu$ M estradiol-treated seedlings).

## DspA/E represses PAMP-induced callose deposition in *A. thaliana* in response to *P. syringae*

During infection of host plants such as apple by *E. amylovora* no callose deposition occurs (DebRoy et al., 2004). On the other hand, callose deposition occurs in *A. thaliana* infected by *E. amylovora* (Degraeve et al., 2008). It was shown that in host plants, DspA/E is required to repress callose deposition triggered by HrpN since a *dspA/E* mutant triggers callose deposition (DebRoy et al., 2004; Boureau et al., 2011). We wondered whether the accumulation of callose in *A. thaliana* following *E. amylovora* infection was due to the inability of DspA/E to suppress callose deposition in this species. We therefore analyzed callose deposition in leaves of 13-1-2 and control 7-2-1 plants following inoculation with a *t3ss* mutant of *P. syringae* pv. *tomato* and wild-type *E. amylovora* which both induce callose deposition in *A. thaliana*. Both bacterial strains induced accumulation of callose deposits in leaves of the 7-2-1 control line, whether treated with estradiol or not (data not shown). We found that when DspA/E expression was induced by estradiol treatment in the 13-1-2 line, leaves infected with the *t3ss* mutant of *P. syringae* accumulated significantly less callose than untreated leaves, indicating that DspA/E was able to repress PAMP-induced callose deposition in *A. thaliana* (Figure 7). However, leaves of 13-1-2 plants infected with *E. amylovora* accumulated as much callose whether DspA/E expression was induced or not (Figure 7). This indicates that DspA/E did not suppress callose deposition induced by *E. amylovora* in *A. thaliana* leaves.



**Figure 7: DspA/E represses PAMP-induced callose but not *E. amylovora*-induced callose in *A. thaliana***

Epifluorescence micrographs of leaf discs 8 h after infiltration with *P. syringae* pv *tomato* hrp- mutant with (+) or without (-) 5 μM estradiol. Callose deposits appear as fluorescent dots.

**Figure 8: DspA/E inhibits *de novo* protein synthesis**

**A:** 10-days-old transgenic seedlings were DMSO- or estradiol (5 μM) treated for 3 hours and labeled with <sup>35</sup>S methionine. **B:** Leaves of 5-week-old Col-0 plants were syringe-infiltrated with water (mock) or with bacterial suspensions as indicated. **C:** Leaf discs of apple seedlings were vacuum-infiltrated with water (mock) or with different strains of *E. amylovora* as indicated. **A-C:** Total protein extracts were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie blue; <sup>35</sup>S methionine incorporation was detected by autoradiography. Similar results were obtained for two biological replicates. **D:** Bacterial counts of *E. amylovora* in *A. thaliana* leaves inoculated with wild-type *E. amylovora* (*Ea wt*) or a *dspA/E* mutant (*Ea dspA/E*) alone or together with 4 μg/ml of CHX. Bars represent standard errors.

### The *GFP::DspA/E* fusion protein is transiently detected in the cytoplasm and the nucleolus

To determine the intracellular localization of DspA/E, we analyzed the fluorescence of roots in 13-1-2 transgenic seedlings following estradiol treatment. In transgenic 7-2-1 control seedlings, the fluorescent signal was detected in the cytoplasm and in the nucleus 2 hpt (Supp. Figure 7A) and was still visible 24 hpt. In 13-1-2 transgenic seedlings, a transient fluorescent signal appeared 2 hpt in isolated cells of the root (Supp. Fig 7A) but could not be detected in any cell 3 hpt or 24 hpt.

In 13-1-2 seedlings, the fluorescence signal 2 hpt was not similar to that of control seedlings: it was weak in the cytoplasm and the nucleoplasm but strong in a circular structure that resembled the nucleolus. DAPI staining of nuclei confirmed that the fluorescence signal in 13-1-2 transgenic line is mainly detected in a region of the nucleus that excludes DAPI stain and is reminiscent of the nucleolus (Supp. Figure 7B). In order to confirm that this specific sub-cellular localization was due to an intact *GFP::DspA/E* fusion protein, we tried to detect it by western blotting using both an anti-DspA/E antibody and an anti-GFP antibody. We could not detect any signal in the 13-1-2 seedlings at any of the time points we tested while GFP alone was detected in control seedlings (data not shown), suggesting that the fusion protein is present either transiently or that the quantity of protein does not reach the sensitivity threshold for detection by western blot. The absence of detection of DspA/E in transgenic plants by western blot is in agreement with the transient nature of the fluorescent signal we detected in *GFP::DspA/E* seedlings (Supp. Figure 7A).

### DspA/E represses protein synthesis

Since the *GFP::DspA/E* fusion could only transiently be observed and since it was detected in the nucleolus which is the site of ribosomal RNA (rRNA) transcription, pre-rRNA processing and ribosome subunit assembly (Lam et al., 2005) we wondered whether DspA/E expression *in planta* was correlated with impaired *de novo* protein synthesis. We analyzed incorporation of <sup>35</sup>S-labelled methionine in newly synthesized proteins of *A. thaliana* seedlings expressing DspA/E. In *A. thaliana* seedlings expressing DspA/E almost no <sup>35</sup>S-labeled methionine was incorporated in the newly synthesized proteins (Figure 8A), indicating a rapid decrease in protein synthesis when DspA/E is expressed in the plant cell. We then analyzed the incorporation of <sup>35</sup>S-labeled methionine in proteins of 13-1-2 seedlings treated with a range of estradiol concentrations and found that *de novo* protein synthesis inhibition was dependent on the estradiol concentration (Figure 8A). No obvious modification of total protein content was visible at this stage in DspA/E-expressing seedlings.

To determine whether DspA/E also reduced *de novo* protein synthesis during infection, we analyzed incorporation of <sup>35</sup>S-labelled methionine in *A. thaliana* and apple leaves infected with wild-type *E. amylovora* or a *dspA/E* mutant. When *A. thaliana* and apple leaves were infected with *E. amylovora*, *de novo* protein synthesis was reduced in a DspA/E-dependent manner (Figure 8B-C). Finally, we determined that repression of protein synthesis using cycloheximide could partially rescue the growth of a *dspA/E* mutant in *A. thaliana* plants (Figure 8D).

## Discussion

DspA/E is a T3E that is essential for virulence of the phytopathogenic bacterium *E. amylovora* on host plants. DspA/E belongs to a family of effectors conserved in most plant pathogenic bacteria corresponding to large proteins with no homology to any protein of known biochemical function. Depending on the bacterial species, DspA/E homologs are either required for virulence or for fitness (Boureau et al., 2006). However, the precise role of these effectors during infection has not clearly been established. Two DspA/E homologs, *P. syringae* AvrE and *P. stewartii* WtsE, have been shown to suppress SA-dependent callose deposition and/or expression of the *PR1* defense gene, and the virulence-promoting activity of this family of effectors is thus generally thought to be linked to their ability to suppress deployment of plant defense (DebRoy et al., 2004; Ham et al., 2008). On the other hand, several authors have suggested that the virulence promoting activity of this family of effectors could be due to their ability to cause plant cell death (Boureau et al., 2006; Ham et al., 2008; Kim et al., 2011).

We showed previously that *E. amylovora* multiplies transiently in non-host *A. thaliana* (Degrave et al., 2008). We show in this paper that DspA/E promotes bacterial multiplication and bacterial survival of *E. amylovora* in *A. thaliana* as a *dspA/E* mutant was unable to multiply in *A. thaliana* leaves and bacterial numbers dropped rapidly after inoculation. The fact that DspA/E can promote bacterial growth in non-host plants has been observed previously: indeed DspA/E is required for early growth of *E. amylovora* in leaves of non-host *N. benthamiana* (Oh et al., 2007). In order to analyze the modifications in the plant cell due to DspA/E alone, we transformed *A. thaliana* with constructs allowing inducible expression of DspA/E in a translational fusion with GFP. When DspA/E was expressed directly inside the plant cell in the transgenic plants, it was able to restore the growth of a *dspA/E* mutant of *E. amylovora*. This is consistent with the fact that DspA/E is known to be injected inside plant cells by *E. amylovora* and is thought to function inside plant cells (Bocsanczy et al., 2008). DspA/E has been previously shown to repress callose deposition, a cell wall based plant defense, and it has been suggested that the bacterial promoting activity of DspA/E is linked to its ability to repress plant defense (DebRoy et al., 2004). In this paper, we show that DspA/E can indeed repress callose deposition induced by *P. syringae* PAMPs in *A. thaliana* but that it does not repress callose-induced by *E. amylovora*, which is in agreement with the fact that *A. thaliana* leaves accumulate callose deposits following *E. amylovora* infection (Degrave et al., 2008). Furthermore, this suggests that *P. syringae*- and *E. amylovora*-induced callose deposition require independent pathways, consistent with previous reports indicating that callose deposition in *A. thaliana* involves more than one pathway (Luna et al., 2011). Since DspA/E promotes bacterial multiplication in *A. thaliana* but does not repress callose deposition, this suggests that repression of callose deposition by DspA/E is not critical to its bacterial growth-promoting role. Indeed, we previously reported that a *pmr4-1* callose-deficient mutant of *A. thaliana* does not show increased sensitivity to *E. amylovora* (Moreau et al., 2012).

Our results show that the two transgenic lines transformed with the *dspA/E* gene (13-1-1 and 13-1-2) show low levels of electrolyte leakage and a growth delay in the absence of estradiol treatment. This indicates that the estradiol-inducible system is leaky and confirms previous data that suggested that very low levels of DspA/E is toxic for plant cells (Boureau et al., 2006; Oh et



al., 2007). Indeed, *Agrobacteria* bearing a dexamethasone-inducible *dspA/E* gene construct could induce cell death in the absence of dexamethasone, which indicated both that the dexamethasone-inducible system was leaky and that very low expression levels of DspA/E were sufficient to induce cell death in *N. benthamiana* (Oh et al., 2007). This high toxicity of DspA/E could explain the relatively low number of transgenic lines able to express DspA/E after estradiol treatment that we could isolate. When expression of DspA/E was induced by low estradiol concentrations, this led to root and leaf growth reduction. *E. amylovora* infection of seedlings also led to a DspA/E-dependent reduction of growth. Other effectors are known to affect plant growth; for example, the *E. amylovora* harpin HrpN and the *P. syringae* T3E AvrRpt2 both promote root growth in *A. thaliana* (Chen et al., 2007; Ren et al., 2008). Induction of DspA/E expression using high concentrations of estradiol led to growth arrest as well as electrolyte leakage and necrosis as previously described in tobacco and apple (Boureau et al., 2006).

We found that induction of the expression of DspA/E by estradiol treatment modulated the expression of 388 *A. thaliana* genes 6h after treatment. A very high proportion of the modulated genes were induced (326 genes). Approximately 25% of the genes that were induced following expression of DspA/E showed a higher level of expression in untreated 13-1-2 transgenic plants bearing the *dspA/E* transgene than in the 7-2-1 control line, indicating that the low level of DspA/E expression in 13-1-2 plants was sufficient to induce a transcriptional response. The fact that these genes were further induced when DspA/E expression was increased by estradiol treatment indicates that at least part of the transcriptional response is dose-dependent, which is in agreement with the dose-dependence of the repression of root growth by DspA/E expression. Analysis of the functional categories of the modulated genes using the FunCat database (Ruepp et al., 2004) showed that DspA/E triggered a strong defense reaction at the transcriptional level. Indeed, the SA pathway was strongly induced by DspA/E expression, consistent with our previous observations that the SA pathway is induced in a DspA/E-dependent manner following infection by *E. amylovora* (Degraeve et al., 2008). SA is known to be involved in some forms of cell death in plants and many of the mutants in which SA signaling is constitutively active develop necrotic lesions spontaneously (Lorrain et al., 2003; Meng et al., 2009). It was therefore possible that DspA/E induced cell death in *A. thaliana* via the induction of the SA pathway. However, we show in this paper that activation of the SA pathway is not required for the toxicity of DspA/E in *A. thaliana*. It has been recently shown that the DspE homolog of *P. carotovorum* has no effect on plant gene expression although it is able to induce cell death and promote disease (Kim et al., 2011). Thus the action of DspA/E and its functional homologs on the SA pathway seems to be variable from plant to plant (Boureau et al., 2006; Pester et al., 2012) but does not seem to have an impact on the ability of these effectors to promote bacterial growth or plant cell death. We also found that the EDS1 signaling pathway is strongly induced by DspA/E at the transcriptional level. We showed previously that the EDS1 pathway is involved in *A. thaliana* non-host resistance to *E. amylovora* (Moreau et al., 2012). Thus it seems that although DspA/E is required for *E. amylovora* growth in *A. thaliana*, DspA/E also contributes to the detection of *E. amylovora* by *A. thaliana* cells and to the triggering of the resistance response. This situation is similar to what has been observed in non-host tobacco in which DspA/E is both required for bacterial growth and for the resistance response (Oh et al., 2007).

We show in this paper that expression of DspA/E leads to a rapid repression of *de novo* protein synthesis. This could explain why we were unable to detect the DspA/E protein *in planta* by western blot and why the *GFP::DspA/E* fusion protein was only transiently detected. Previous experiments of *Agrobacterium*-mediated transient expression of DspA/E or WtsE in *N. benthamiana* also led to plant cell death but the authors were unable to detect the DspA/E or the WtsE protein in plant tissues (Oh et al., 2007; Ham et al., 2009). However, the lack of accumulation of DspA/E in plant cells could also be due to an inherent instability of the DspA/E protein. In animal bacterial pathogens, it has been shown that effectors can repress host translation and that this repression is required for pathogenesis. The intracellular bacterial pathogen *L. pneumophila* secretes inside the host cell five effectors which are required for bacterial growth and virulence and which repress host cell translation (Fontana et al., 2011). The authors suggest that inhibiting host translation could benefit the pathogen by increasing the availability in amino acids or by dampening the host's response. However they also demonstrate that host cells are able to detect the arrest of translation which triggers a transcriptional response and could counterbalance the positive effects of the effectors (Fontana et al., 2011). To our knowledge, the present work is the first demonstration of the repression of protein synthesis by a plant pathogen T3E. This led us to investigate *de novo* protein synthesis in infected plants and we found that *de novo* protein synthesis was rapidly inhibited in both *A. thaliana* and apple leaves following infection by *E. amylovora* in a DspA/E-dependent manner. Furthermore, we found that repression of host protein synthesis with cycloheximide (CHX) could partially restore the multiplication of a *dspA/E* mutant, in agreement with our previous observations that CHX can promote *E. amylovora* multiplication and associated necrosis (Moreau et al., 2012). The fact that the growth of a *dspA/E* mutant could only partially be restored by CHX indicates that the function of DspA/E in the plant cell cannot be fully complemented by the biochemical repression of protein synthesis.

Altogether, we show that DspA/E is required for early bacterial growth in the non-host plant *A. thaliana*, that DspA/E represses protein synthesis and triggers a strong defense response. At this point, the causal relationships, if they exist, between cell death, defense triggering, repression of protein synthesis and the bacterial promoting effect of DspA/E are not known. However, previous data concerning WtsE deletion mutants suggest that at least the cell death inducing and the bacterial promoting activities of WtsE are strongly linked (Ham et al., 2008). Although this remains to be proven, our data argue in favor of the induction of cell death by DspA/E being responsible for its bacterial promoting activity, possibly linked to its protein synthesis suppressing activity.



## Methods

### Bacterial strains, yeast strains and plant lines

*E. amylovora* strains used in this study are described in (Degrave et al., 2008) except for the *dspA/E* mutant used in this study (M81). To construct the M81 *dspA/E* mutant, plasmid pSL4 containing the mutagenized insert (Supplementary data) was introduced into *E. amylovora* by electroporation. Isolated colonies were screened for Streptomycin resistance and Ampicillin sensitivity. The recombination event was checked by southern blot. A secretion test was performed which confirmed that DspA/E was not secreted by the M81 strain. The *tts* mutant of *P. syringae* pv. *tomato* was obtained from the Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (Angers, France). Apple seedlings (*Malus x domestica*) were generated from seeds obtained from open-pollinated ‘Golden Delicious’, which is susceptible to fire blight disease.

### Generation of DspA/E transformation constructs and plant transformation

The *GFP::dspA/E* construct was obtained by cloning the *eGFP* coding region in frame with the *dspA/E* coding region under the control of the inducible *lexA* promoter in the pER8 transformation vector (Zuo et al., 2000); see supplemental data for details. *A. thaliana* Col-0 plants were transformed by the *Agrobacterium* sp. strain C58C1 using the floral dipping procedure (Clough and Bent, 1998).

### Plant culture, estradiol treatment and inoculation methods

To measure *in planta* bacterial multiplication, *A. thaliana* plants were grown in soil for 5 weeks and leaves were inoculated as described in (Degrave et al., 2008). *In vitro* grown seedlings were sown on solid 1x MS media containing 1% sucrose after surface sterilization and vernalized by incubation at 4°C for 2 days. Seedlings were subjected to a cycle of 16 and 8 hours of light and darkness respectively, at 25°C (day) and 20°C (night). To measure seedling root length, the plates were oriented vertically so the roots grew along the surface of the media. Estradiol treatment was conducted by immersion of 10-days-old seedlings in 17 $\beta$ -estradiol (SIGMA) for ten minutes. For the infection of *in-vitro* grown *A. thaliana*, two-week old seedlings were submerged with a 10<sup>7</sup> CFU/ml bacterial suspension for 10 minutes and the phenotype of the plants was assessed six days after infection. For <sup>35</sup>S-labelled methionine assays, leaf discs of 3 week-old apple seedlings were vacuum-infiltrated with bacterial suspensions at 5.10<sup>8</sup> CFU/ml and kept in a wet Petri dish for 8 h at 22°C; 5 week-old *A. thaliana* Col-0 plants were inoculated with bacterial suspensions at 10<sup>7</sup> CFU/ml and leaf discs were taken 14 hpi.

### <sup>35</sup>S-labelled methionine incorporation

Seedlings treated with DMSO or estradiol for 3 hours and inoculated *A. thaliana* and apple leaf discs were transferred to 1ml liquid 1x MS containing 50  $\mu$ Ci <sup>35</sup>S-labelled methionine (PerkinElmer), and incubated for two hours, except for the seedlings treated with a range of estradiol concentrations (30 min incubation). Seedlings or leaf discs were rinsed twice for 5 minute in 1x MS. Total proteins were extracted in Na-EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tris-HCl 25 mM (pH7.6)  $\beta$ -mercaptoethanol 13.3  $\mu$ M antiprotease cocktail (Roche) 1  $\mu$ g/ml, subjected to SDS-PAGE and the methionine incorporation rate was revealed by autoradiography.

## Microscopy, DCFH-DA, callose, DAPI and FDA-PI staining

Callose detection is described in (Degrave et al., 2008). For DAPI staining, seedlings were immersed in DAPI 5 µg/ml (SIGMA) PBS 10 mM and rinsed twice in PBS 10 mM. For FDA-PI analysis, seedlings were immersed in FDA 5 µg/ml (SIGMA), PI 5 µg/ml (BD Pharmingen) and rinsed twice with sterile water. Seedlings were mounted in 50% glycerol or water (for FDA-PI) and observed with a Zeiss Axiophot light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) using excitation filter 470 nm and band pass filter 525 nm (eGFP and FDA), excitation filter 546 nm and barrier filter 590 nm for PI or excitation filter 365 nm and barrier filter 420 nm for DAPI. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection using 300-µM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was done as described in (Degrave et al., 2008).

## RNA extraction and qRT-PCR

RNA extraction and cDNA synthesis is described in (Degrave *et al.*, 2008). cDNAs were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to manufacturer's license in an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System. Results were analysed with Applied Biosystems Sequence Detection Software v1.3.1. Gene expression was normalized using the constitutive *EF1a* gene. Primers are described in (Fagard *et al.*, 2007) or in the supplemental data.

## Funding

This work was supported by the French National Research Agency [ANR-07-JCJC-0132] and by the French Ministry for Higher Education and Research to AD and AL.

## Acknowledgements

We thank B. Szurek for *A. tumefaciens* C58C1 and C. Manceau for the *P.syringae* *tts* mutant. We thank JP. Renou, L. Deslandes, Y. Marco, L. Rajjou and V. Gaudin for fruitful discussions and D. Expert for critical reading of the manuscript. We thank A. Christ, J. Fromentin and Q. Clément for technical help.

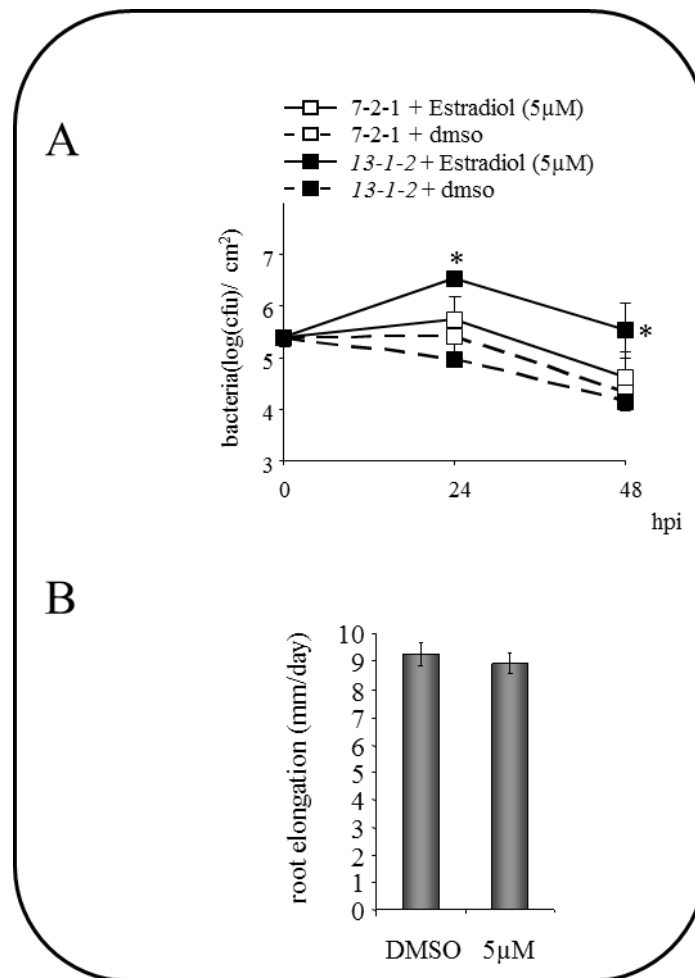
## References

- Alfano, J.R.** (2009). Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Molecular Plant Pathology* **10**, 805-813.
- Barny, M.A., Guinebretiere, M.H., Marcais, B., Coissac, E., Paulin, J.P., and Laurent, J.** (1990). Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Molecular microbiology* **4**, 777-786.
- Billing.** (1983). Fire blight. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 206–210.
- Block, A., and Alfano, J.R.** (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opinion in Microbiology* **14**, 39-46.
- Boch, J., and Bonas, U.** (2010). *Xanthomonas AvrBs3* Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, Vol 48 **48**, 419-436.
- Bocsanczy, A., Nissinen, R., Oh, C., and Beer, S.** (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* **9**, 425-434.
- Bogdanove, A., Bauer, D., and Beer, S.** (1998). *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the hrp (type III secretion) pathway. *Journal of Bacteriology* **180**, 2244-2247.
- Boureau, T., ElMaarouf-Bouteau, H., Garnier, A., Brisset, M., Perino, C., Pucheu, I., and Barny, M.** (2006). DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 16-24.
- Boureau, T., Siamer, S., Perino, C., Gaubert, S., Patrit, O., Degrave, A., Fagard, M., Chevreau, E., and Barny, M.A.** (2011). The HrpN Effector of *Erwinia amylovora*, Which Is Involved in Type III Translocation, Contributes Directly or Indirectly to Callose Elicitation on Apple Leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 577-584.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., and Frommer, W.B.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527-532.
- Chen, Z., Agnew, J., Cohen, J., He, P., Shan, L., Sheen, J., and Kunkel, B.** (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20131-20136.
- Crowe, M., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S., Rouzé, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W., and Trick, M.** (2003). CATMA: a complete *Arabidopsis* GST database. *Nucleic Acids Res* **31**, 156-158.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y., Nomura, K., and He, S.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9927-9932.
- Degrave, A., Fagard, M., Perino, C., Brisset, M.N., Gaubert, S., Laroche, S., Patrit, O., and Barny, M.A.** (2008). *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1076-1086.
- Fontana, M.F., Banga, S., Barry, K.C., Shen, X., Tan, Y., Luo, Z.Q., and Vance, R.E.** (2011). Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* **7**, e1001289.
- Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J.P., and Barny, M.A.** (1997). DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Molecular microbiology* **26**, 1057-1069.

- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L.** (2006). Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* **60**, 425-449.
- Ham, J., Majerczak, D.R., Mackey, D., and Coplin, D.L.** (2006a). Characterization and functional analysis of WtsE, an AvrE-family type III effector protein. *Phytopathology* **96**, S45-S45.
- Ham, J., Majerczak, D., Ewert, S., Sreerekha, M., Mackey, D., and Coplin, D.** (2008). WtsE, an AvrE-family type III effector protein of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes cell death in non-host plants. *Mol Plant Pathol* **9**, 633-643.
- Ham, J., Majerczak, D., Nomura, K., Mecey, C., Uribe, F., He, S., Mackey, D., and Coplin, D.** (2009). Multiple Activities of the Plant Pathogen Type III Effector Proteins WtsE and AvrE Require WxxxE Motifs. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 703-712.
- Ham, J.H., Majerczak, D.R., Arroyo-Rodriguez, A.S., Mackey, D.M., and Coplin, D.L.** (2006b). WtsE, an AvrE-family effector protein from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes disease-associated cell death in corn and requires a chaperone protein for stability. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1092-1102.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., de Longevialle, A., Farmer, E., Grant, M., Kuiper, M., Lehrach, H., Léon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouzé, P., Sandberg, G., Segura, M., Serizet, C., Tabrett, A., Taconnat, L., Thareau, V., Van Hummelen, P., Vercruysse, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P., Wirta, V., Wittink, F., Zabeau, M., and Small, I.** (2004). Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* **14**, 2176-2189.
- Kim, H.S., Thammarat, P., Lommel, S.A., Hogan, C.S., and Charkowski, A.O.** (2011). *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 773-786.
- Kvitko, B.H., Park, D.H., Velasquez, A.C., Wei, C.F., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J., and Collmer, A.** (2009). Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. *Plos Pathogens* **5**.
- Lam, Y.W., Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I.** (2005). The nucleolus. *Journal of cell science* **118**, 1335-1337.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., and Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 863-870.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balaque, C., and Roby, D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* **8**, 263-271.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J.** (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 183-193.
- Meng, P., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J., and Bergounioux, C.** (2009). Crosstalks between Myo-Inositol Metabolism, Programmed Cell Death and Basal Immunity in *Arabidopsis*. *Plos One* **4**, -.
- Moreau, M., Degrave, A., Vedel, R., Bitton, F., Patrit, O., Renou, J.P., Barny, M.A., and Fagard, M.** (2012). EDS1 contributes to nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* against *erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 421-430.

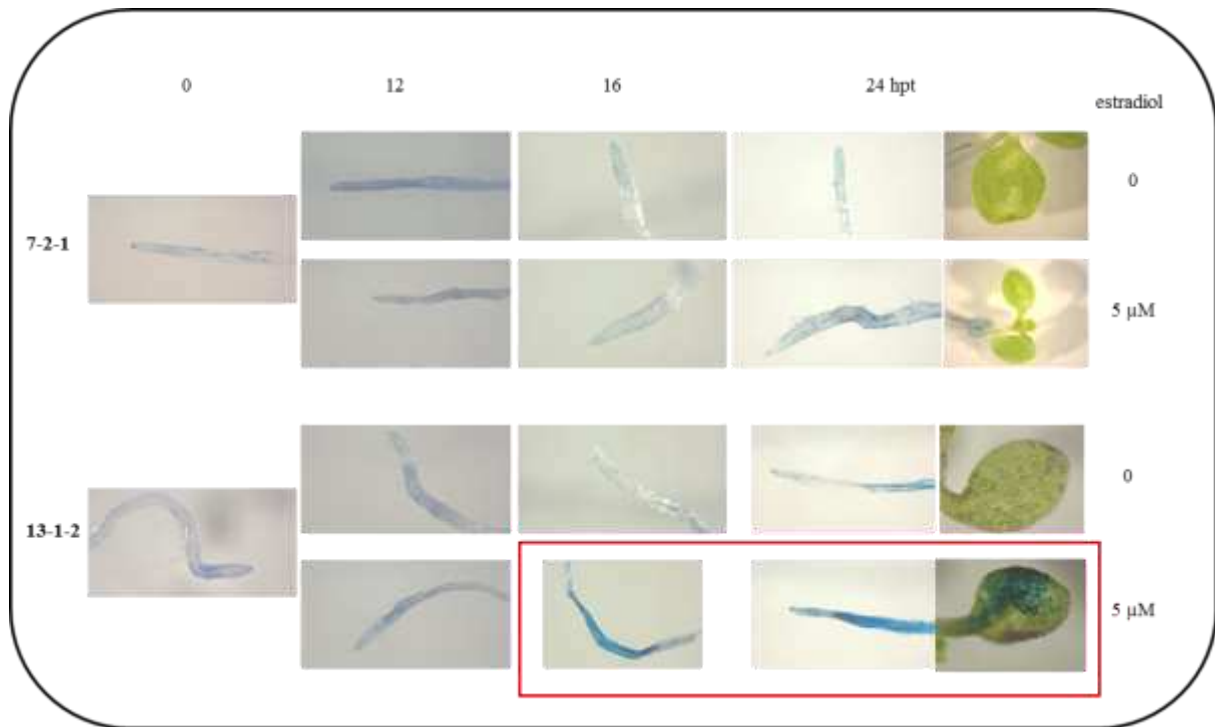
- Nissinen, R.M., Ytterberg, A.J., Bogdanove, A.J., Van Wijk, K.J., and Beer, S.V.** (2007). Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Molecular Plant Pathology* **8**, 55-67.
- Oh, C.S., Martin, G.B., and Beer, S.V.** (2007). DspA/E, a type III effector of *Erwinia amylovora*, is required for early rapid growth in *Nicotiana benthamiana* and causes NbSGT1-dependent cell death. *Molecular Plant Pathology* **8**, 255-265.
- Pester, D., Milčevićová, R., Schaffer, J., Wilhelm, E., and Blümel, S.** (2012). *Erwinia amylovora* expresses fast and simultaneously hrp/dsp virulence genes during flower infection on apple trees. *PLoS One* **7**, e32583.
- Ren, X., Liu, F., Bao, Z., Zhang, C., Wu, X., Chen, L., Liu, R., and Dong, H.** (2008). Root Growth of *Arabidopsis thaliana* Is Regulated by Ethylene and Abscisic Acid Signaling Interaction in Response to HrpN(Ea), a Bacterial Protein of Harpin Group. *Plant Molecular Biology Reporter* **26**, 225-240.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Güldener, U., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M., and Mewes, H.** (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**, 5539-5545.
- Venisse, J., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J., and Brisset, M.** (2002). Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1204-1212.

## Supplementary data



**Supp. Figure 1: DspA/E expressed *in planta* increases the growth and survival of wild-type *E. amylovora* in *A. thaliana*. Root growth of the 7-2-1 control line is not affected by estradiol treatment.**

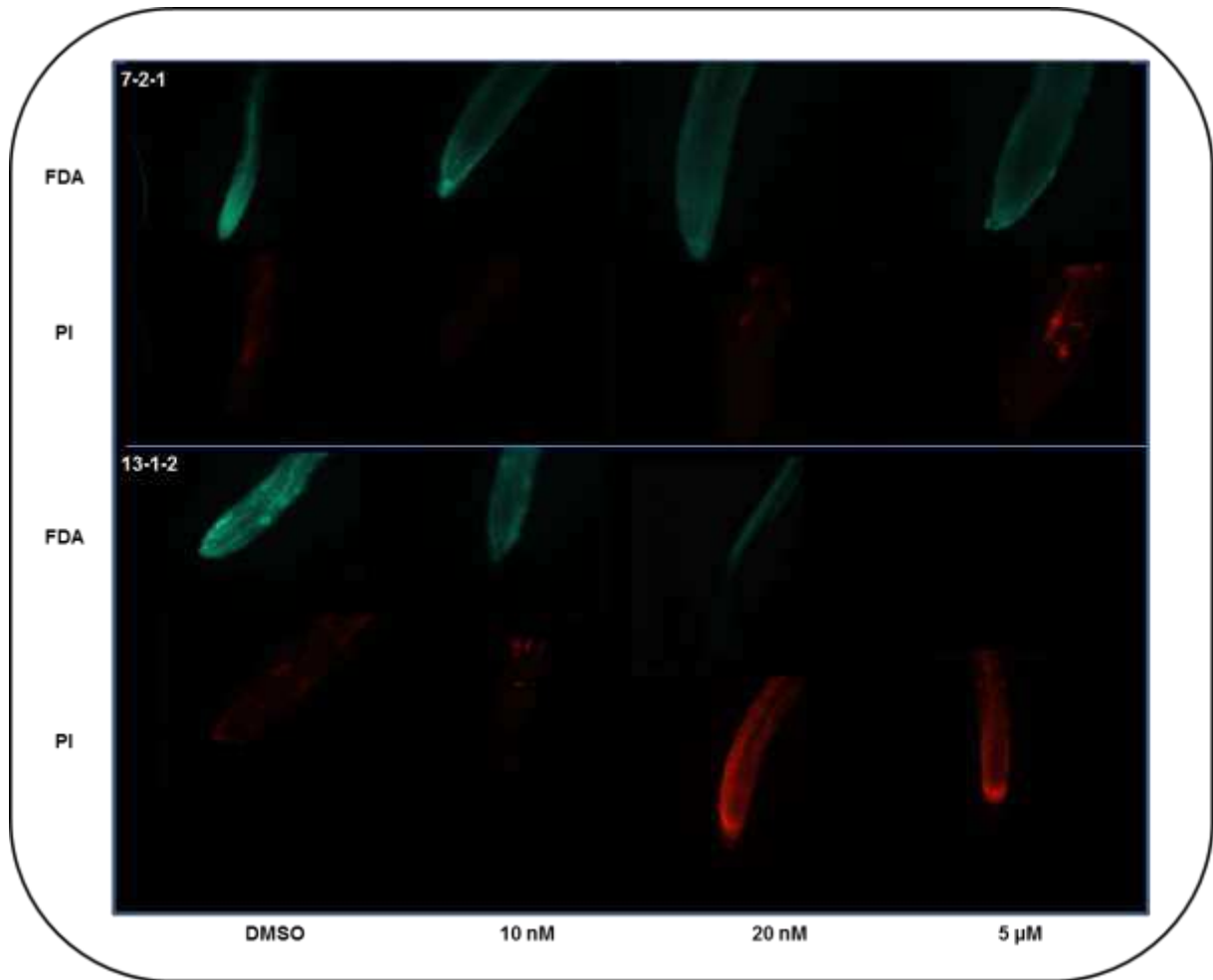
**A:** Bacterial counts of the wild-type strain of *E. amylovora* in the GFP expressing control line (7-2-1) and in the *GFP:dspA/E* expressing line 13-1-2. Bacteria were inoculated with or without 5  $\mu$ M estradiol to induce the expression of DspA/E. Stars indicate values significantly different from *Ea* in the untreated control line at the corresponding time point according to Mann and Whitney's test ( $P$  value < 0.05). **B:** 7-2-1 control seedlings were immersed during 10 minutes in estradiol-containing solutions and cleared. Each bar represents the mean growth in mm per day for 15 seedlings  $\pm$  SE.



**Supp. Figure 2: Kinetics of DspA/E-induced cell death in *A. thaliana* transgenic plants.**

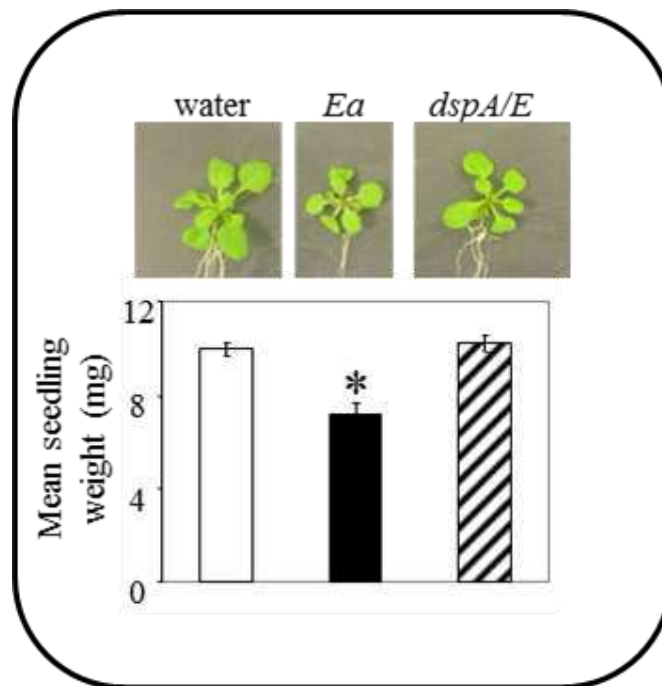
1-week-old *GFP* (7-2-1) and *dspA/E::GFP* (13-1-2) transgenic seedlings were immersed in 5 μM estradiol or water. Cell death was detected by monitoring the uptake of Evans blue. The seedlings were stained with 0.25 % Evans blue for 20 min and washed with water at the indicated time points as described in (Vaillau et al, 2002, PNAS 99: 10179-10184).





**Supp. Figure 3: Detection of cell death in transgenic seedlings using PI staining.**

10-days-old transgenic seedlings vertically-grown on MS medium + 1% sucrose were immersed during 10 minutes in estradiol-containing solutions and cleared. Two days after treatment, the root tips of *dspA/E* transgenic seedlings were colored for 5 minutes in an FDA-PI staining solution, rinsed and observed under fluorescence microscope using the appropriate filter. Living tissues are green; dead tissues are red. Pictures show a representative root tip for each treatment.



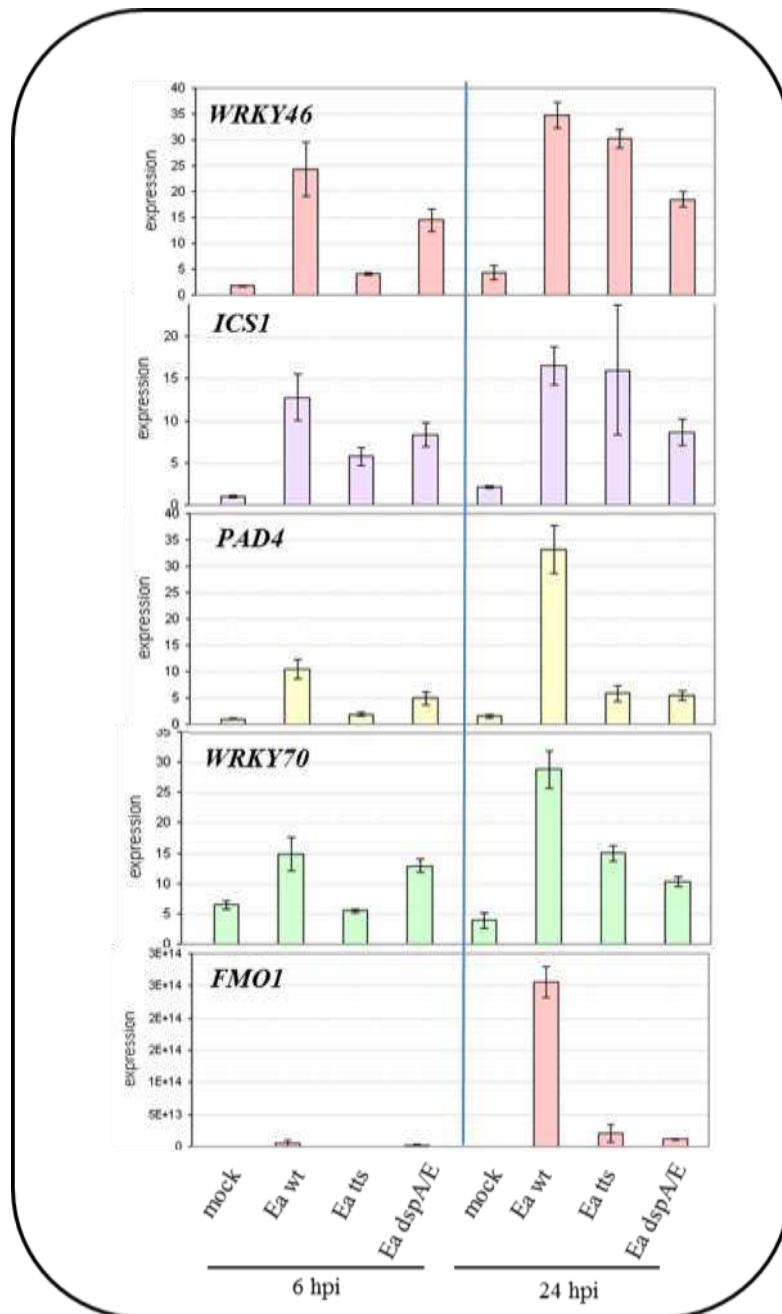
**Supp. Figure 4: *E. amylovora* reduces plant growth in a DspA/E-dependent manner.**

Col-0 seedlings were immersed in bacterial suspensions of wild-type *E. amylovora* (*Ea*) or a *dspA/E* mutant ( $10^7$  CFU/ml) or water for 10 min and replaced in the growth chamber for 6 days. Top: picture of representative seedlings. Bottom: mean seedling weight. The star indicates a significant difference from mock-treated seedlings (Mann and Whitney's test; P value < 0.05).

AGI number	Gene description	13-1-2 vs 7-2-1 30 nM 6hpt	<i>Ea</i> vs mock 6 hpi
<b>Response to SA</b>			
AT2G14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1)	3,2	#N/A
AT3G52430	PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4)	2,1	3,3
AT1G75040	PR5 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 5)	2,1	1,2
AT1G74710	JCS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE1)	1,9	3,5
AT1G64280	NPR1 (NONEXRESSER OF PR GENES 1)	0,8	1,0
AT1G21270	WAK2 (wall-associated kinase 2)	0,7	1,5
AT4G39030	EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5)	0,6	1,2
<b>EDS1 pathway</b>			
AT3G56400	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor	2,5	1,8
AT2G46400	WRKY46 (WRKY DNA-binding protein 46); transcription factor	2,1	3,7
AT4G12720	AINUDT7	1,8	3,1
AT1G19250	FMO1 (FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1)	1,6	1,4
AT3G48090	EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1)	1,4	1,9
<b>WRKY TF</b>			
AT5G64810	WRKY51 (WRKY DNA-binding protein 51); transcription factor	1,5	2,5
AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75); transcription factor	1,5	3,7
AT5G22570	WRKY38 (WRKY DNA-binding protein 38); transcription factor	1,4	3,2
AT2G38470	WRKY33 (WRKY DNA-binding protein 33); transcription factor	1,3	2,3
AT1G18860	WRKY61 (WRKY DNA-binding protein 61); transcription factor	1,2	
AT4G31800	WRKY18 (WRKY DNA-binding protein 18); transcription factor	1,1	2,4
AT2G25000	WRKY60 (WRKY DNA-binding protein 60); transcription factor	1,1	1,1
<b>Response to JA and ET</b>			
AT1G75830	LCR67/PDF1.1 (Low-molecular-weight cysteine-rich 67)	1,7	-1,2
AT4G17500	ATERF-1 (Ethylene Responsive Element Binding Factor 1)	1,1	
AT3G12500	ATHCHIB (BASIC CHITINASE)		
AT1G66340	ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1)		
AT1G19640	JMT (Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase)		
AT2G39940	COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1)		-1,9
AT2G43710	SSI2 (fatty acid biosynthesis 2)		
AT3G16470	JR1 (Jacalin lectin family protein)		-0,9
<b>JA biosynthesis</b>			
AT3G45140	LOX2 (LIPOXYGENASE 2)	0,9	
AT1G17420	LOX3 (Lipoxygenase 3)		0,9
AT2G06050	OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3)		
AT1G55020	LOX1 (Lipoxygenase 1); lipoxygenase		
AT1G13280	AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4)		-0,9
AT5G42650	AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE)	-0,7	-1,3
<b>Response to oxidative stress</b>			
AT4G11230	respiratory burst oxidase, putative	1,0	
AT3G22370	AOX1A (alternative oxidase 1A)	1,0	2,0
AT1G64060	ATRBOH F (RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN F)		1,7
<b>Flavonoid biosynthesis</b>			
AT5G13930	CHS (CHALCONE SYNTHASE)		
AT5G08640	FLS (FLAVONOL SYNTHASE)		-1,3

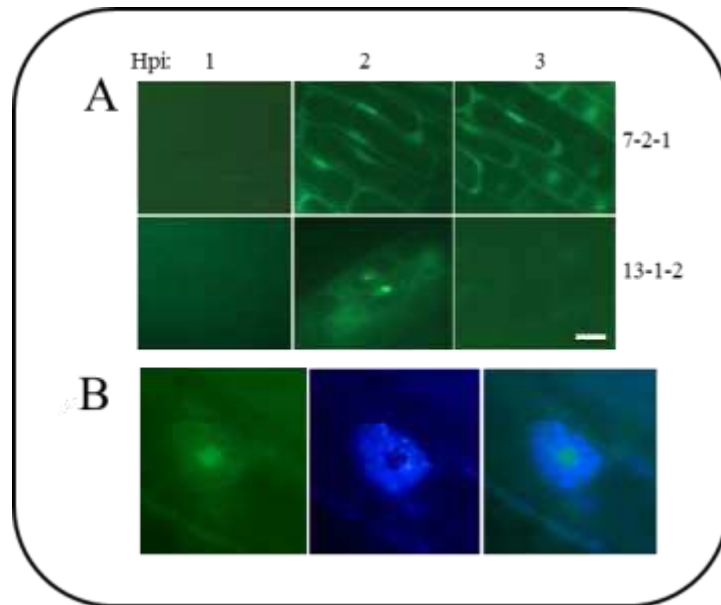
### Supp. Figure 5: Modulation of selected *A.thaliana* genes by *E. amylovora* and DspA/E.

Log2 ratio of selected genes in response to *E. amylovora* 6 hpi (Moreau et al.,2012, MPMI 25: 421-430) and in the 13-1-2 transgenic plants 6h following estradiol treatment. Black boxes indicate that gene expression was not significantly changed.



**Supp. Figure 6: DspA/E is required for full induction of defense genes in *A. thaliana* by *E. amylovora*.**

Leaves of *A. thaliana* Col-0 5 week-old plants were inoculated with wild-type *E. amylovora* (*Ea*) or a *dspA/E* mutant (*dspA/E*) at  $10^7$  CFU/ml. Leaves were collected 6 or 24 hpi. Gene expression levels were measured by quantitative real-time RT-PCR. Arbitrary units are calculated relative to the EF1 $\alpha$  gene expression level.



**Supp. Figure 7: DspA/E does not accumulate in transgenic plants.**

**A:** Fluorescence observation of root cells of *GFP* transgenic seedlings (top) and *GFP::dspA/E* (bottom) 1, 2 and 3 hpt with 5  $\mu$ M estradiol. Similar results were obtained with two independent transgenic lines. The bar represents 10  $\mu$ m. **B:** 10-days-old *GFP::dspA/E* (13-1-2) transgenic seedlings were treated with 5  $\mu$ M estradiol and stained with DAPI 2 hpt. Left: GFP fluorescence, middle: DAPI staining, right: merge. The bar represents 5  $\mu$ m.

### Construction of the *E. amylovora* M81 *dspA/E* mutant

Construction of pSL4: A BamH1-HindIII DspB PCR product [template pMAB79 (Gaudriault et al, 1997), primers: BamH1 DspB for: AAGGATCCTGAGCATGTTGTTGCCCTTC and HindIII DspB rev: AAAAGCTTTTATGCCGCGCTACTCT] was cloned into pUC18. This plasmid was then used to clone an EcoR1-BamH1 PCR product containing the DspA/E HrpL-inducible promoter [Template pMAB79, primers EcodeltotDspA: AACGAATTCGTAAAGGATTATCGCCGATC and BamH1deltotDspA rev: AAGGATTCGACCCGTTGCCCCCACCCTC] to give plasmid pSL3 which was sequenced. A BamH1 fragment carrying the streptomycin resistance gene issued from pHP45-omega (Prentki,P. and Krisch,H.M. 1984 In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29 (3), 303-313) was then inserted into the BamH1 site of pSL3 to give plasmid pSL4.

### Generation of DspA/E transformation constructs and plant transformation

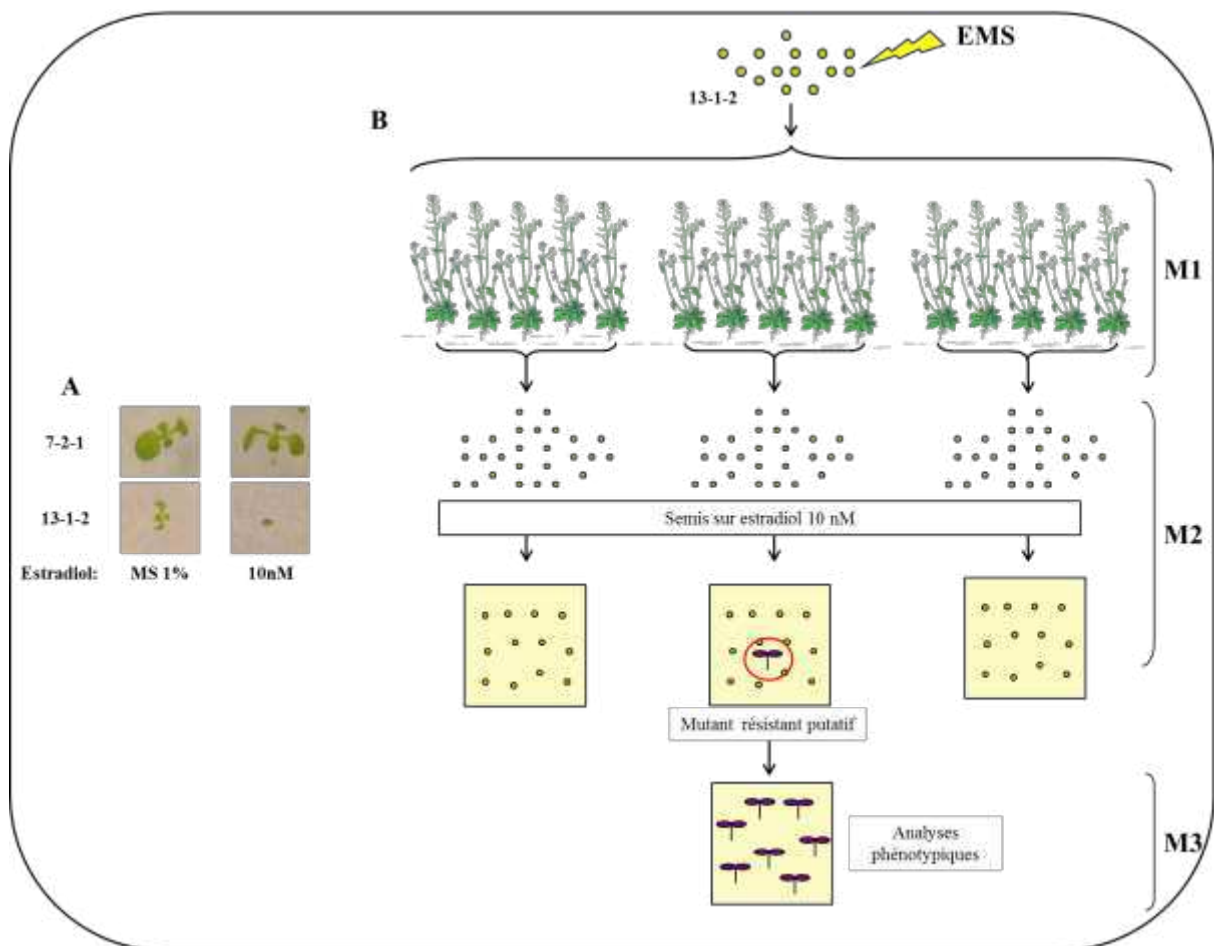
The *GFP* and *dspA/E* constructs were generated by placing the coding regions of *eGFP* and *dspA/E* (clone pADER3) under the control of the inducible *lexA* promoter in the pER8 transformation vector (Zuo et al., 2000). Cloning of *dspA/E* and *eGFP*: the *eGFP* and *dspA/E* coding regions were amplified using primers A-F and B-R for *eGFP* and primers C-F and D-R for *dspA/E* that added XhoI, SacI and ApaI restriction sites. PCR fragments were cloned into pGEMt-easy (Invitrogen) and cloned into pER8 using XhoI and ApaI. The *GFP::dspA/E* construct was obtained by cloning the *eGFP* coding region in frame with the *dspA/E* coding region of clone pADER3.

#### Primers used for cloning:

Primers used for cloning: eGFP : A-F : 5' AAC TCG AGA TGG TAA GCA AGG GCG AGG AGC 3' and B-R : 5' AAG GCC CTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC AT 3' ; dspA/E : C-F : 5' AAC TCG AGA TGG AAT TAA AAT CAC TGG GA 3' and D-R : 5' AAG GGC CCT TAG AGC TCG CTC TTC ATT TCC AGC CC 3'.

#### Primers for RT-PCR and qRT-PCR:

5' CGA CAA CCA CTA CCT GAG CA 3' (eGFP591-F) and 5' CTG GTG AGC AGC GCT GAT AC 3' (DspA-RT-R). 5' CGT CAC CCT AGC CGC TTT AC 3' (Efl-F); 5' CCC ATG GTT AGA GAC TGT CAA ACA 3' (Efl-R); 5' CCT GTG GGG CAT GGT GTT GC 3' (DspA-RT-F) and DspA-RT-R.



**Figure 26: Principe du criblage de mutants résistants à la toxicité induite par DspA/E**

A: Phénotype de la lignée 13-1-2 sur Estradiol. La lignée 13-1-2 germe sur MS 1%. A partir de 10 nM la germination de la lignée est inhibée.

B: Une population de graines de la lignée 13-1-2 a été mutagénisée avec de l'EMS. Ces graines ont ensuite été semées en chambre de culture afin d'obtenir une génération M1 qui a été amplifiée afin de récupérer une génération M2 qui est par la suite semée sur de l'estradiol concentré à 10 nM pour vérifier le phénotype des plantes suite à la mutagénèse. Parmi les lots de graines M2, une majorité ne germe pas sur estradiol. Cependant dans certains lots, quelques plantes germent, ces plantes correspondent à des mutants résistants putatifs. La descendance M3 de chaque mutant putatif est de nouveau semée sur estradiol afin de confirmer le phénotype de résistance. Les mutants confirmés en M3 sont ensuite caractérisés plus en détail.



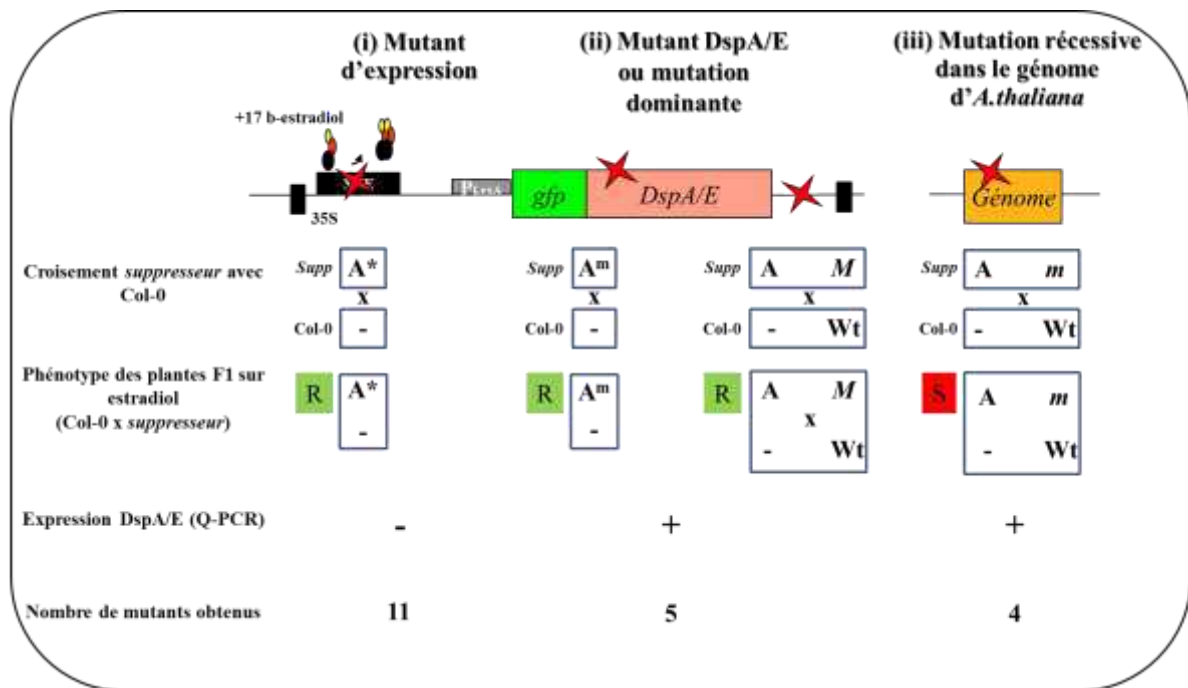
## Chapitre II : Recherche de suppresseurs de la toxicité induite par DspA/E

### I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que DspA/E est essentiel pour la multiplication de la bactérie *E. amylovora* chez *A. thaliana*. De plus, les analyses phénotypiques des plantes transgéniques permettant d'exprimer DspA/E *in planta* ont permis de montrer que DspA/E est hautement toxique pour *A. thaliana* comme pour le pommier, suggérant ainsi que la toxicité de DspA/E jouerait un rôle clé dans sa fonction. Cette hypothèse est renforcée par les travaux réalisés sur l'effecteur WtsE. En effet, l'analyse de mutants de délétion de l'effecteur WtsE a montré que la perte de toxicité était toujours corrélée à la perte de la fonctionnalité de WtsE (Ham et al., 2009). De plus, la caractérisation de la toxicité de DspA/E permettra de tester l'hypothèse selon laquelle elle serait nécessaire à la fonctionnalité de cet effecteur. L'identification de mutants résistants permettrait d'identifier des éléments de la plante nécessaires à la toxicité de DspA/E et à la mise en place des réponses induites par cet effecteur.

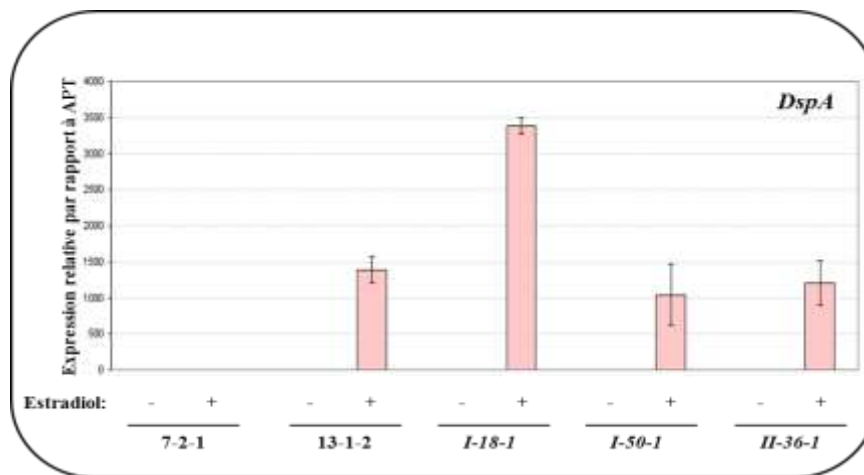
### II. Démarche expérimentale

Avant le début de ma thèse une mutagenèse à l'EMS qui provoque des mutations ponctuelles aléatoirement dans le génome avait été réalisée par Mathilde Fagard sur la lignée 13-1-2 portant DspA/E. Le principe du criblage est présenté en Figure 26. Parmi les mutants résistants putatifs plusieurs cas de figure sont possibles. Les mutations peuvent toucher le système d'expression XVE permettant l'expression de DspA/E (i). Les mutations peuvent potentiellement toucher la séquence de DspA/E et le rendre non-fonctionnel (ii). Enfin, les mutations peuvent toucher le génome d'*A. thaliana* et inactiver par exemple un gène (iii) nécessaire à la toxicité de DspA/E. Les plantes d'intérêt pour notre équipe sont les plantes qui portent potentiellement une mutation soit dans DspA/E, soit dans un gène d'*A. thaliana*.



**Figure 27: Catégories de mutants résistants putatifs**

Les mutations suppressives peuvent affecter la toxicité de DspA/E de plusieurs façons : (i) 11 plantes dont la mutation touche le système d'expression ont été identifiées au cours du crible. (ii) 5 plantes portant une mutation dans la séquence de DspA/E ou une mutation dominante annulant sa toxicité ont été identifiées et (iii) 4 plantes portant une mutation le génome d'*A. thaliana* ont été identifiées puis sélectionnées pour analyse.  $A^*$ : Mutation dans le système d'expression;  $A^m$ : Mutation dans DspA/E;  $M$ : Mutation dominante;  $m$ : Mutation récessive; R: résistant; S: Sensible; Wt: allèle sauvage ; -: Absence de DspA/E.

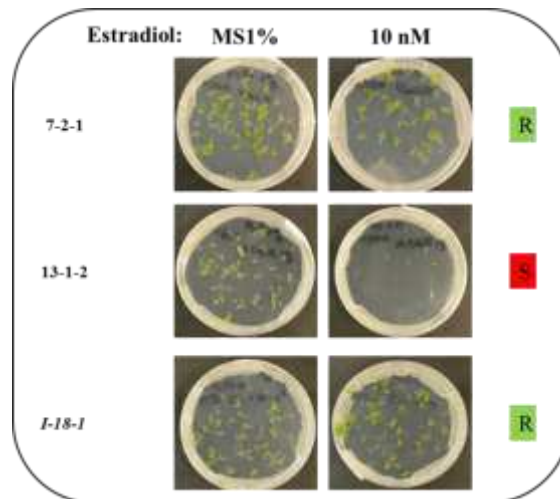


**Figure 28: DspA/E est exprimé dans les mutants suppresseurs**

Exemple de l'expression de DspA/E dans les mutants résistants *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1*. Des plantules de 6 jours ont été induites (+) ou non (-) avec de l'estradiol (5  $\mu$ M). L'estradiol est retiré au bout de 20 minutes et les plantules sont récoltées 24 heures après induction. L'expression relative de DspA/E a été vérifiée en PCR en temps réel (qPCR) par rapport au gène constitutif *APT1* (*Adenosine Phosphoribosyl Transferase 1*).

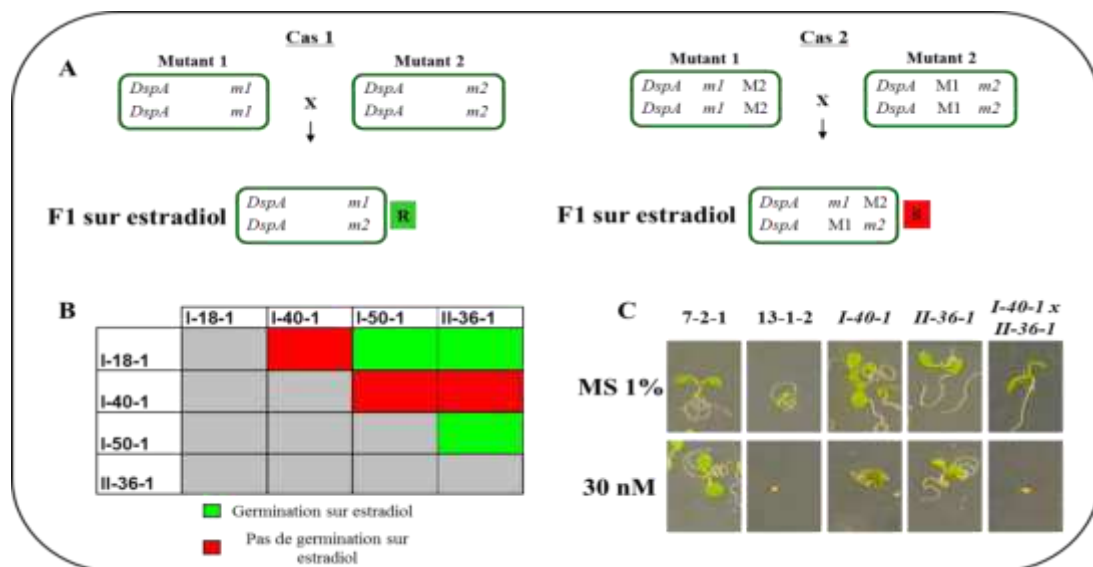
Avant mon arrivée, vingt individus résistants avaient été identifiés et confirmés à la génération M3. Afin de déterminer à quelle catégorie de mutants (i, ii ou iii) appartient chaque individu résistant, différentes analyses sont réalisées. Dans un premier temps, chaque mutant résistant putatif a été traité à l'estradiol et l'expression de DspA/E a été mesurée en qPCR afin de déterminer si l'expression n'est pas affectée. En parallèle, les mutants putatifs ont été croisés avec l'écotype sauvage Col-0 (fond génétique de la lignée 13-1-2) et la sensibilité à l'estradiol de la descendance F1 issue de ce croisement a été analysée. Onze mutants dont la F1 est résistante sur estradiol et dont l'expression de DspA/E est nulle, signifiant qu'ils sont potentiellement affectés dans le système d'expression de DspA/E, ont été identifiés. Ensuite, cinq mutants dont la F1 est résistante sur estradiol et dont l'expression de DspA/E est validée, signifiant qu'ils sont potentiellement mutés dans la séquence de DspA/E ou qu'ils portent une mutation dominante, ont été identifiés. Enfin, quatre mutants dont la F1 est sensible et pour lesquels DspA/E est exprimé, signifiant qu'ils portent potentiellement une mutation récessive dans le génome d'*A. thaliana*, ont été identifiés (Figure 27).

Lors de ma thèse, je me suis concentré sur l'analyse des quatre individus portant potentiellement une mutation récessive du génome d'*A. thaliana* conférant la résistance à la toxicité de DspA/E.



**Figure 29: Confirmation de la résistance à la toxicité de DspA/E du suppresseur *I-18-1***

Les plantes de la génération M3 ont été semées sur MS 1% de sucrose supplémenté ou non avec de l'estradiol 10 nM. Les photos sont prises 1 semaine après semis. La lignée 7-2-1 portant la construction XVE et exprimant la GFP, germe sur estradiol tandis que la lignée 13-1-2 portant DspA/E ne germe pas. La résistance pour le mutant *I-18-1* est confirmée car il germe sur estradiol. R: résistant. S: sensible.



**Figure 30: Les suppresseurs appartiennent à deux groupes de complémentation différents**

(A): Principe du test de complémentation. Cas 1: Les mutations *m1* et *m2* sont au même *locus*. On s'attend à ce que la F1 issue du croisement entre les mutants soit résistante (R) sur estradiol. Cas 2: les mutations *m1* et *m2* affectent des *locis* différents. On s'attend à ce que la F1 issue du croisement entre les mutants soit sensible (S) sur estradiol. *m*: allèle muté; *M*: allèle sauvage. (B): Tableau-résumé des croisements pour les groupes de complémentation et des résultats obtenus en F1. (C): Exemple de test de complémentation entre les mutants *I-40-1* et *II-36-1*. 5 à 6 graines des lignées contrôles, des mutants et des graines F1 issues du croisement entre les mutants *I-40-1* et *II-36-1* ont été semées sur milieu MS 1% de sucrose supplémenté ou non avec de l'estradiol 5  $\mu$ M. Les photos sont prises 6 jours après semis.

### III. Résultats

A l'issue du criblage, quatre supresseurs portant une mutation potentiellement récessive dans le génome d'*A. thaliana* supprimant la toxicité de DspA/E avaient été isolés. Ces mutants avaient été confirmés en M3 sur la base de leur germination sur 10 nM d'estradiol concentration à laquelle la lignée 13-1-2 ne germe pas. Les quatre supresseurs sélectionnés ont été nommés *I-18-1*, *I-40-1*, *I-50-1* et *II-36-1*. (Voir Matériel et Méthodes). La Figure 29 présente un exemple de confirmation de la résistance du supresseur *I-18-1*.

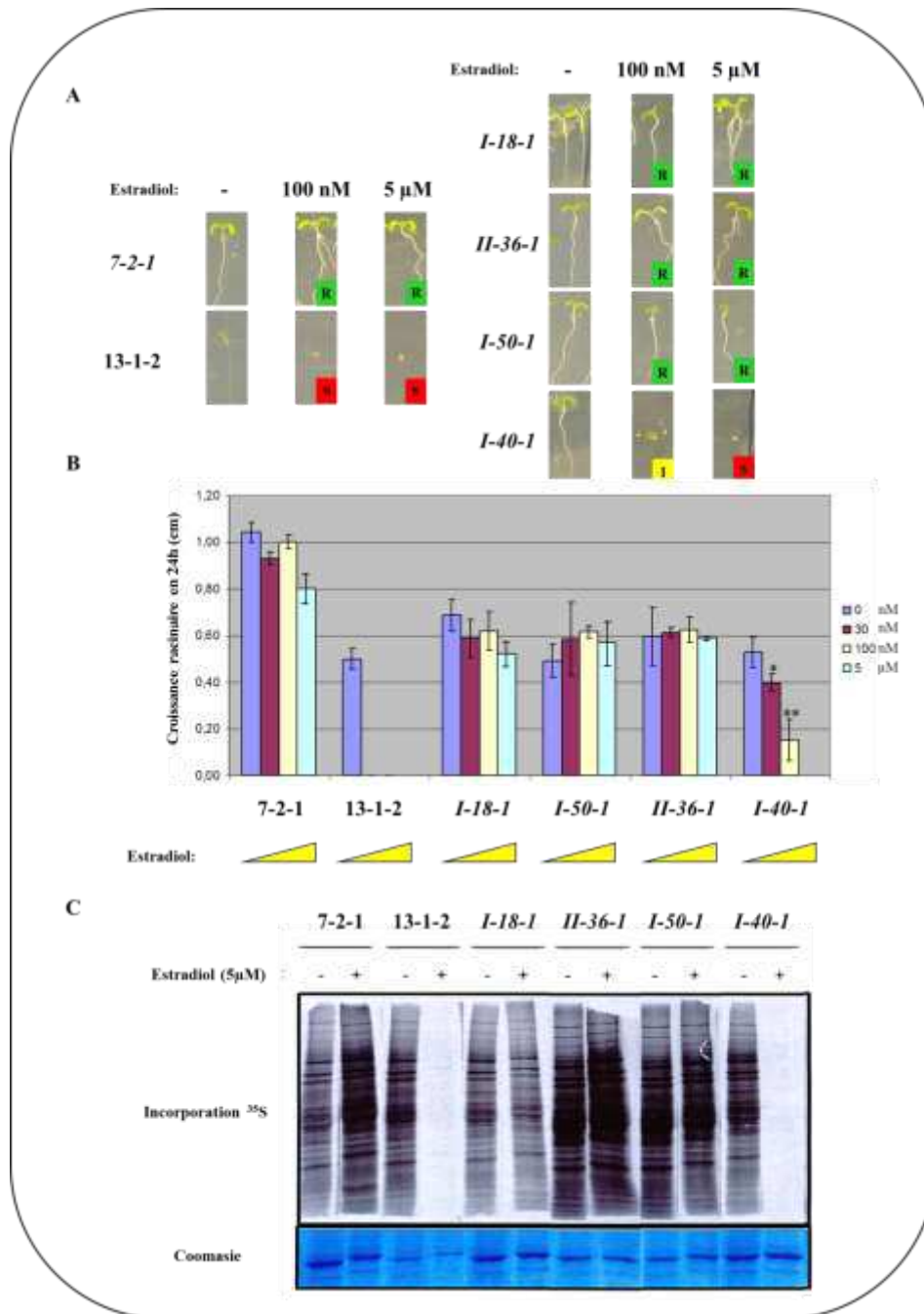
#### 1. Analyse génétique des supresseurs

##### 1.1 Analyse de ségrégation

Afin de confirmer le fait que les 4 supresseurs portent une mutation récessive, nous avons choisi de rétro-croiser une fois les supresseurs avec la lignée parentale 13-1-2. Une fois le rétro-croisement effectué, la F1 est semée sur estradiol afin de vérifier le phénotype. Théoriquement le phénotype attendu est une restauration de la sensibilité puisque la F1 porte une copie sauvage du gène candidat. Le test s'est avéré concluant puisque la F1 issue du croisement entre le supresseur *I-18-1* et la lignée 13-1-2 est sensible sur estradiol (Figure 34). Nous avons par la suite testé le phénotype de la F2 sur estradiol. Théoriquement la ségrégation attendue est de type 3:1 pour une mutation récessive (3/4 de graines non-germées et 1/4 de graines germées). Les résultats du test de semis de la F2 ont été concluants puisque les résultats obtenus sont 73 graines non-germées et 27 germées. Ces résultats indiquent que la mutation dans le supresseur *I-18-1* est une mutation récessive. Des résultats identiques ont été obtenus pour les supresseurs *I-40-1*, *I-50-1* et *II-36-1* (résultats non présentés).

##### 1.2 Complémentation fonctionnelle

Afin de réaliser un test de complémentation fonctionnelle, des croisements entre les mutants supresseurs ont été effectués. Le test de complémentation fonctionnelle a pour but de déterminer le nombre de *loci* de résistance à la toxicité de DspA/E auxquels correspondent les quatre mutants. Le principe du test est de croiser les mutants deux à deux et de vérifier le phénotype de la F1 sur estradiol. Dans le cas où les mutations sont situées au même *locus*, on s'attend à ce que la F1 germe sur estradiol tout comme les mutants résistants et la lignée contrôle 7-2-1 (Figure 30). Dans ce cas les mutants appartiennent au même groupe de complémentation. Dans le cas où les mutations sont situées à des *loci* différents, on s'attend à ce que la F1 ne germe pas sur estradiol. Dans ce cas on pourra conclure que les mutants appartiennent à deux groupes de complémentation différents. La Figure 30 présente un exemple de croisement test pour la complémentation fonctionnelle et le résumé des résultats de croisements entre les mutants supresseurs. En résumé, les supresseurs appartiennent à deux groupes de complémentation. Le premier est constitué des supresseurs *I-18-1*, *I-50-1*, *II-36-1*. Le second groupe est constitué du supresseur *I-40-1*. Ces résultats indiquent que nous avons potentiellement deux *loci* responsables du phénotype de suppression de la toxicité induite par DspA/E.



**Figure 31: Phénotype des quatre supprimeurs**

(A): Suppression de l'inhibition de la germination par DspA/E. Les plantes ont été semées sur MS 1% de sucrose supplémenté ou non avec de l'estradiol 100 nM ou 5 $\mu$ M. Les photos sont prises 1 semaine après semis. (B): Suppression de l'inhibition de la croissance racinaire par DspA/E. 20 graines ont été semées sur MS 1% de sucrose. Au bout d'une semaine, les pointes racinaires ont été traitées pendant 10 minutes avec une solution d'estradiol à la concentration indiquée. La croissance racinaire est mesurée 24 heures post-induction. Les astérisques (\*) représentent une valeur significativement différente par rapport à la lignée contrôle pour la même concentration en estradiol (Mann-Whitney test ; $P < 0.05$ ) (C): Suppression de l'inhibition de la traduction par DspA/E. Des plantules de 10 jours ont été traitées ou non avec de l'estradiol (5  $\mu$ M) pendant 3 heures et marquées avec de la méthionine  $^{35}$ S. Les extraits de protéines totales ont été mis à migrer sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE) et marqués au bleu de Coomassie. L'incorporation de la méthionine marquée a été détectée par autoradiographie.

## 2. Phénotype des mutants supprimeurs

Afin de déterminer si les mutations suppriment les autres effets de la toxicité de DspA/E, la caractérisation des supprimeurs a été effectuée sur la base des réponses observées sur la lignée 13-1-2 en réponse à l'expression de DspA/E suite à l'induction à l'estradiol (Degrave et al., 2013) tels que l'inhibition de la germination, de la croissance racinaire et de la traduction.

### **Inhibition de la germination par DspA/E :**

J'ai effectué des tests de germination sur des concentrations plus élevées d'estradiol car l'inhibition de la germination par DspA/E est dose-dépendante. En effet, sur 10 nM d'estradiol la lignée 13-1-2 germe entre 10 et 20% et sur 5 µM, elle ne germe pas. J'ai donc choisi deux concentrations supérieures à 10 nM d'estradiol, 100 nM et 5 µM sur lesquelles la lignée 13-1-2 ne germe pas (Degrave et al., 2013). Sur 100 nM et 5 µM la lignée contrôle 7-2-1 germe à hauteur de 100%. Comme attendu la lignée 13-1-2 ne germe sur aucune des deux concentrations. Les supprimeurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* germent sur les deux concentrations. Cependant le supprimeur *I-50-1* présente une réduction visible de croissance de la partie aérienne. Quant au supprimeur *I-40-1*, il germe sur une concentration de 100 nM mais pas au-delà. Ces résultats indiquent que les mutations *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* suppriment l'inhibition de la germination à forte concentration en estradiol et que le supprimeur *I-40-1* est toujours affecté mais à moindre mesure (Figure 31).

### **Inhibition de la croissance racinaire par DspA/E:**

Afin d'analyser la capacité de DspA/E à inhiber la croissance racinaire les différents génotypes ont été semés sur MS 1% puis cultivés verticalement. Au bout d'une semaine la pointe racinaire est traitée à l'estradiol et on mesure la croissance de la racine qui a lieu pendant les 24 heures qui suivent le traitement. La lignée contrôle 7-2-1 ne présente pas de différence de croissance racinaire 24 heures après induction à l'estradiol. Comme nous l'avons observé précédemment, la lignée 13-1-2 présente un arrêt total de croissance racinaire dès 30 nM (Degrave et al., 2013). Dans ce test, les supprimeurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* ne présentent pas de différence de croissance racinaire 24 heures après induction contrairement au supprimeur *I-40-1* qui présente une diminution de sa croissance racinaire à partir de 30 nM, qui s'accroît jusqu'à 100 nM et à 5 µM un arrêt total de la croissance est observé. Ceci indique que la croissance racinaire des supprimeurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* n'est pas affectée suite à l'expression de DspA/E. La mutation *I-40-1* réduit l'effet de l'expression de DspA/E sur la croissance racinaire mais ne la supprime pas (Figure 31).

### **Inhibition de la traduction Par DspA/E :**

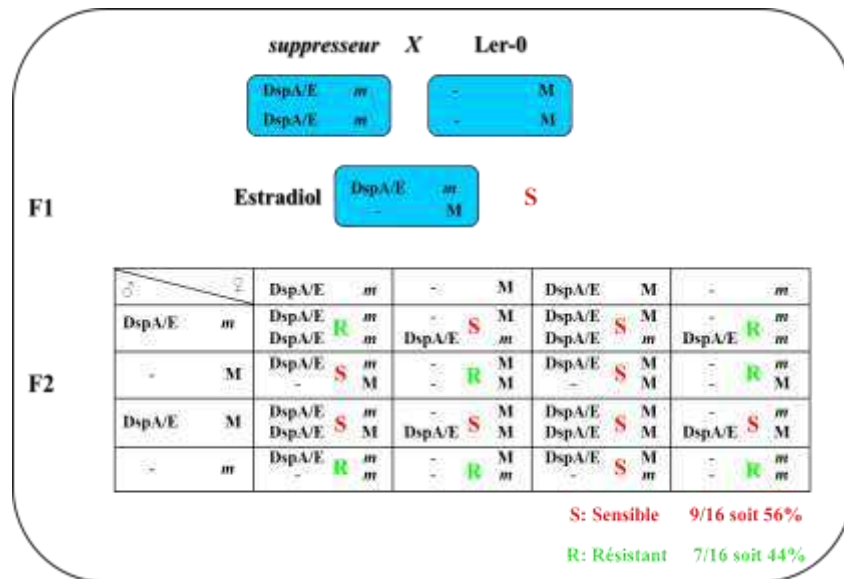
L'induction de l'expression de DspA/E dans la lignée 13-1-2 inhibe la traduction (Degrave et al., 2013). Afin d'analyser la capacité de DspA/E à inhiber la traduction, les différents génotypes ont été traités ou non à l'estradiol puis à la méthionine marquée au soufre 35. Les plantes ont ensuite été broyées et les protéines ont été extraites, soumises à une électrophorèse et révélées par autoradiographie. Aucune inhibition de la traduction n'a été constatée pour la lignée contrôle



7-2-1 tandis que la lignée 13-1-2 présente un arrêt total de la traduction comme attendu (Figure 31). Les supresseurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* ont le même phénotype que la lignée contrôle 7-2-1 et le supresseur *I-40-1* présente quant à lui une inhibition totale de la traduction suite au traitement avec 5  $\mu$ M d'estradiol. Des analyses permettant de vérifier si le supresseur *I-40-1* présente un arrêt de la traduction à des concentrations intermédiaires d'estradiol ont été effectuées (30 et 100 nM). Les résultats montrent que l'inhibition est croissante en fonction de la concentration pour le supresseur *I-40-1*. Ceci montre que DspA/E n'est plus capable d'inhiber la traduction dans les supresseurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* et pour le supresseur *I-40-1* DspA/E conserve ce rôle d'inhibition de la traduction mais de manière réduite.

L'ensemble de ces résultats montre que les supresseurs *I-18-1*, *I-50-1* et *II-36-1* sont des supresseurs présentant une forte résistance à la toxicité de DspA/E tandis que le supresseur *I-40-1* est un supresseur ayant une résistance intermédiaire.





**Figure 32: Tableau théorique des ségrégations des F2 issues du croisement supresseur x Ler-0**

La F1 issue du croisement entre un supresseur et l'écotype Landsberg est théoriquement sensible sur estradiol. La descendance F2 est semée sur estradiol et la ségrégation est étudiée. Dans le cas d'une mutation récessive monolocus la ségrégation attendue est de 9/16 des plantes semées sensibles et 7/16 résistantes. *m*: mutation causale potentielle ; M : allèle sauvage ; - : absence de DspA/E.

Germinations		MS	100 nM	5 µM
Descendant 1	Germées	100 [WT]	107 [WT]	100 [WT]
	Non germées	0	0	0
	Total	100	107	100
Descendant 2	Germées	80 [WT] 21 [Int]	57 [WT] 30 [Int]	53 [WT] 28 [Int]
	Non germées	0 [réduit]	17 [réduit]	15 [réduit]
	Total	4 105	15 119	4 100
Descendant 3	Germées	100 [WT]	100 [WT]	100 [WT]
	Non germées	0	0	0
	Total	100	100	100
Descendant 4	Germées	64 [WT] 21 [Int] 13 [réduit]	61 [WT] 23 [Int] 17 [réduit]	61 [WT] 26 [Int] 15 [réduit]
	Non germées	7	14	8
	Total	105	115	110
Descendant 5	Germées	54 [WT] 25 [Int] 27 [réduit]	58 [WT] 21 [Int] 16 [réduit]	60 [WT] 20 [Int] 19 [réduit]
	Non germées	4	5	5
	Total	110	100	104

**Figure 33: Phénotype de la F2 issue du croisement entre le supresseur *I-40-1* et Ler-0**

100 graines F2 provenant de 5 F1 différentes issues du croisement entre le supresseur *I-40-1* et l'écotype Landsberg ont été semées sur MS 1% de sucrose supplémenté ou non avec de l'estradiol concentré à 100 nM ou 5 µM. 6 jours après semis le nombre de graines germées est compté et le pourcentage de germination est calculé. WT: Wild-type; Int: Phénotype intermédiaire; Réduit: Phénotype réduit.

### 3. Stratégie de séquençage des supresseurs.

Après confirmation de l'appartenance des supresseurs au groupe des mutants portant une mutation dans un gène d'*A. thaliana* et en parallèle du phénotypage et de l'analyse des groupes de complémentation l'objectif a été d'identifier les mutations causales du phénotype de résistance.

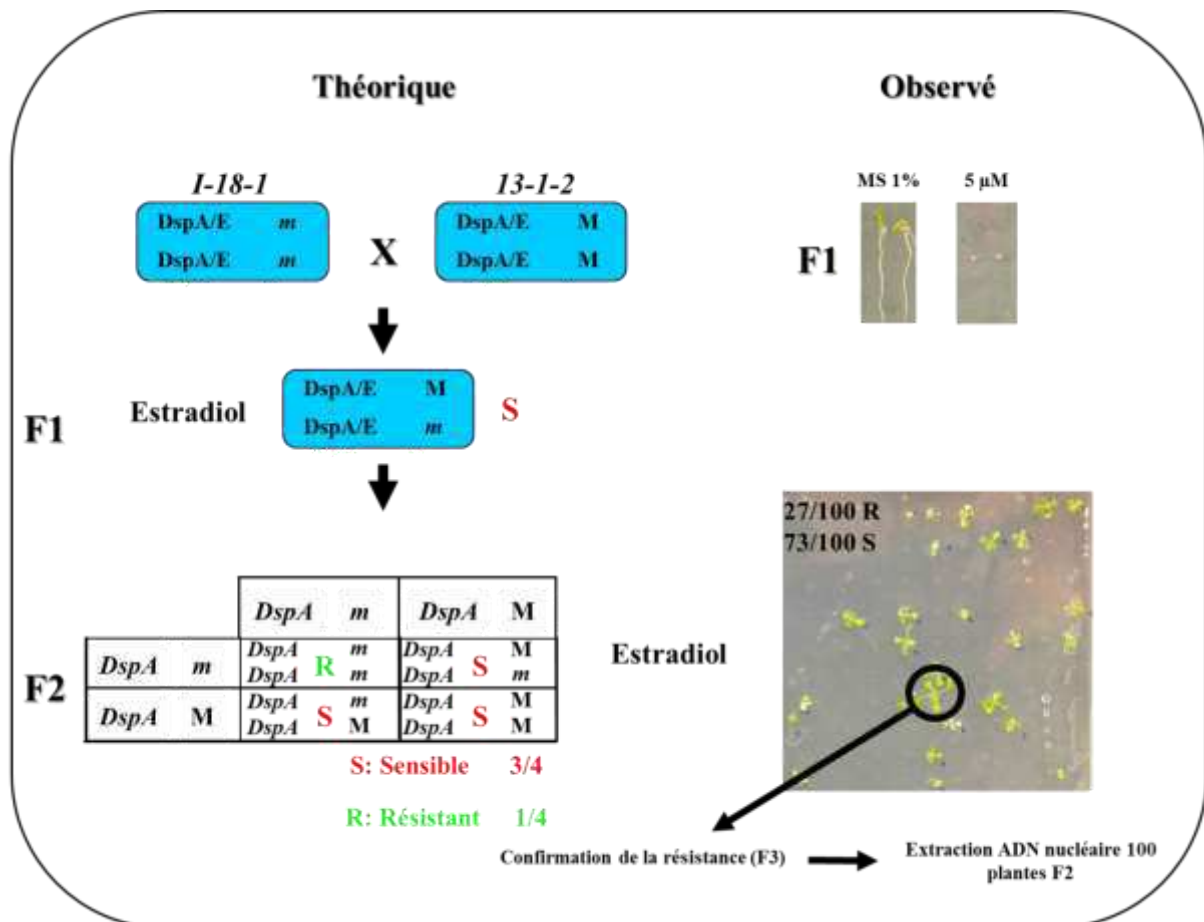
Les avantages d'utiliser l'EMS pour produire des mutations sont que ce composé est hautement efficace pour saturer le génome en mutations (de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  événements par paire de bases par génération) (Kim et al., 2006) ce qui implique que les populations à utiliser pour les cribles ne sont pas nécessairement grandes (125000 M1 sont suffisantes pour atteindre le niveau de saturation) (Schneeberger et al., 2009). La stratégie que nous avons décidé d'employer pour identifier les mutations récessives causales est la stratégie qui a été utilisée par l'équipe de Detlef Weigel (Schneeberger et al., 2009) qui utilise des mutants EMS. Cette stratégie appelée ShoreMap consiste à **croiser les mutants d'écotype Col-0 avec un écototype sauvage polymorphique** dont le polymorphisme est bien connu d'un point de vue densité pour les changements en nucléotides (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP) mais aussi pour des marqueurs génétiques de type RFLP (Polymorphisme de longueur de fragments de restriction) ou d'AFLP (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) par rapport à l'écotype Col-0. Il faut par la suite **identifier en F2 des plantes qui présentent le phénotype de suppression**. Les plantes F2 présentant le phénotype de suppression sont ensuite récupérées pour constituer une population qui sera utilisée pour effectuer **une cartographie de la mutation responsable du phénotype de suppression**. En parallèle, de l'ADN du mutant supresseur rétro-croisé **est envoyé à séquencer afin d'identifier la mutation causale en s'appuyant sur la cartographie de la mutation**.

L'écotype Landsberg (Ler-0) a été choisi pour appliquer cette approche car il possède un grand nombre d'AFLP et de RFLP connus couvrant l'ensemble du génome. Une fois le croisement effectué, il faut récupérer la descendance F1. De cette F1, la F2 est récupérée mais elle ségrège à cause des événements de recombinaison se déroulant au cours de la méiose il faut donc sélectionner des descendant F2 pour lesquels la mutation causale est conservée. La ségrégation attendue au sein de cette population est de 7/16 de plantes qui survivent et 9/16 qui meurent sous l'effet de la toxicité de DspA/E (Figure 32). Parmi les descendants F2 qui peuvent germer sur estradiol, certaines plantes ne portent pas DspA/E (4/16 au total). Ces plantes peuvent être identifiées par PCR et éliminées par la suite. Il ne reste donc que 3/16 de plantes qui portent la mutation et DspA/E à l'état homozygote et/ou hétérozygote.

L'étude des croisements entre les supresseurs et l'écotype Ler-0 a été effectué mais les résultats observés n'ont pas correspondu aux résultats théoriques. Il se trouve que dès le test en F1 la sensibilité attendue pour les plantes portant DspA/E sans la mutation et/ou DspA/E avec la mutation à l'état hétérozygote avait été perdu. Nous avons tout de même analysé la F2 afin de vérifier si le phénotype de sensibilité pouvait être restauré. La Figure 33 montre que 100% des plantes germent sur estradiol à concentration intermédiaire (100 nM) et à forte concentration (5 $\mu$ M). La présence de DspA/E a été vérifiée et son expression également. L'hypothèse

susceptible d'expliquer cette perte de sensibilité serait qu'il existe des régulations épigénétiques qui conduirait à la dégradation des ARNs de DspA/E dans l'écotype Landsberg.





**Figure 34: Phénotype du rétro-croisement en F1 et en F2 entre le suppresseur *I-18-1* et *13-1-2***

La F1 issue du croisement entre le suppresseur *I-18-1* et la lignée *13-1-2* est sensible sur estradiol 5 μM comme attendu. En F2, la recombinaison au sein des gamètes entraîne une ségrégation théorique de type 3:1 (3 plantes sensibles sur 4 et 1 plante résistante sur 4). La F2 semée sur estradiol présente la ségrégation attendue avec 27 plantes résistantes et 73 sensibles confirmée statistiquement avec le test du Chi-2. 100 plantes F2 ont été repiquées et vérifiées en descendance F3 pour leur phénotype de résistance. L'ADN nucléaire des F2 confirmées a été extrait et préparé pour l'envoi au séquençage.

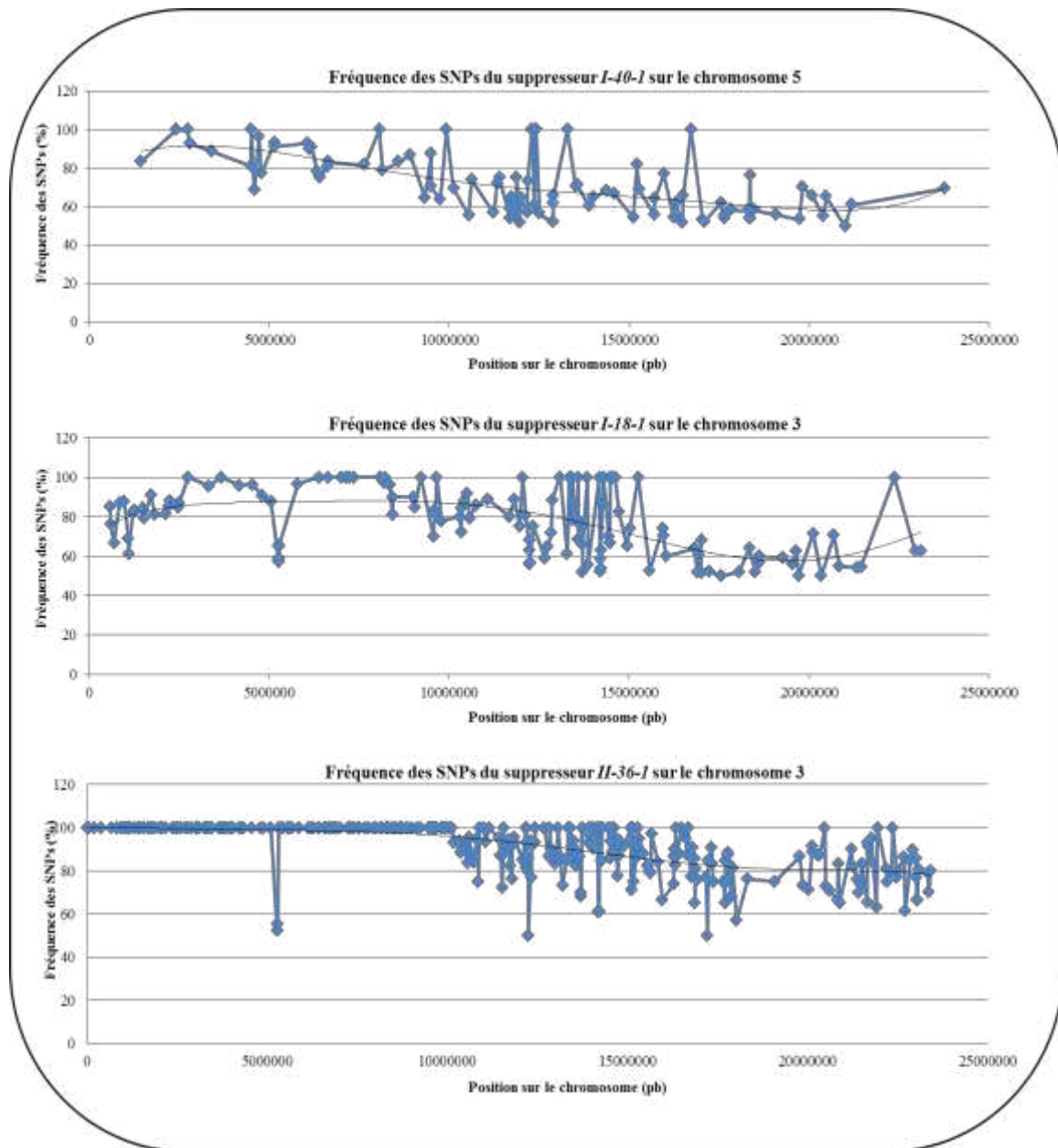


Par la suite et afin de pouvoir localiser la mutation causale, une nouvelle stratégie a été adoptée. Nous avons choisi de récupérer la descendance F2 issue du rétro-croisement entre la lignée 13-1-2 et les supresseurs. Environ 50% de mutations non-liées à la mutation causale sont éliminées par ce rétro-croisement. Après avoir confirmé le phénotype de sensibilité de la F1 et celui de la F2 (cf. §1.1), j'ai prélevé quatre disques foliaires de 100 F2, dont le phénotype de résistance de la descendance F3 a été préalablement vérifié, j'ai extrait l'ADN nucléaire de ces plantes que j'ai par la suite mélangé selon le protocole adapté de Schneeberger et *al.* (Voir matériel et méthode). L'ADN nucléaire de 100 F2 des supresseurs *I-18-1* et *I-40-1* a été séquencé par la société Macrogen<sup>®</sup>. Pour le supresseur *II-36-1* l'ADN de descendants F3 issues de quatre F2 a été envoyé au séquençage chez la même compagnie et pour le supresseur *I-50-1* l'ADN de 100 F2 a été séquencé par la société TGAC<sup>®</sup>.

La technique de séquençage employée est une technologie de nouvelle génération de séquençage développée par la société Illumina<sup>®</sup>. Cette société emploie des séquenceurs de type HiSeq 2000. L'ADN est dans un premier temps segmenté en fragments de courte séquence de 100 pb chacune auxquelles sont greffés des adaptateurs. Une librairie de fragments de courte séquence est ainsi générée. Cette librairie est ensuite hybridée sur puce et les fragments sont amplifiés par PCR. Des clusters des fragments sont ainsi formés sur la puce. Ce sont ces clusters qui sont séquencés. Dans notre cas, la profondeur de séquençage du génome est équivalente à une couverture de 40 fois le génome d'*A. thaliana*. Les résultats de séquençage sont récupérés directement sur les serveurs des compagnies de séquençage au format fastq. J'ai réalisé les alignements de séquences avec le logiciel CLC Genomics Workbench<sup>®</sup>. Le principe est que le logiciel fait s'apparier les courtes séquences de 100 pb sur le génome de référence du TAIR. A partir de cet alignement des paramètres de stringence sont réglés de façon à identifier les SNPs présents dans les courtes séquences. Le but étant d'utiliser une stringence faible (c'est-à-dire identifier des SNPs ayant une fréquence faible d'apparition dans les courtes séquences) pour pouvoir effectuer une cartographie de la mutation afin d'identifier un pic de SNPs et en parallèle d'effectuer une cartographie plus stringente pour identifier la mutation causale. Le descriptif des alignements est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes.

Avant de rechercher les mutations causales dans chaque supresseur, la première analyse de recherche des SNPs non stringente a été effectuée. Cette analyse a permis de faire une cartographie des SNPs pour chaque chromosome. De cette façon, nous avons pu identifier pour les supresseurs *I-18-1*, *I-40-1* et *II-36-1* un regroupement de SNPs dont la fréquence de présence dans les courtes séquences était de 100% ou proche de 100%. La séquence du supresseur *I-50-1* n'a pas donné de résultats lors de la recherche de SNPs car le nombre de courtes séquences de la librairie était insuffisant probablement dû à la qualité de l'ADN génomique envoyé.

Le fait d'envoyer plusieurs supresseurs à séquencer a permis d'éliminer les SNPs présents dans la lignée parentale de référence 13-1-2 répartis sur l'ensemble du génome (environ 600 SNPs sont communs aux supresseurs *I-18-1* et *I-40-1*). Nous avons par la suite comparé les profils de SNPs entre les supresseurs et identifié une zone spécifique présentant un pic de SNPs pour chacun des supresseurs.



**Figure 35: Profils des pics de SNPs obtenus pour les supresseurs *I-18-1*, *I-40-1* et *II-36-1***

Les profils de fréquence de SNPs ont été effectués grâce à l'analyse de SNPs faite avec le logiciel CLC Genomics®. Chaque losange bleu représente un SNP en fonction de sa position en paire de base sur le chromosome. Une courbe de tendance a été tracée afin d'estimer la position du pic de SNPs.

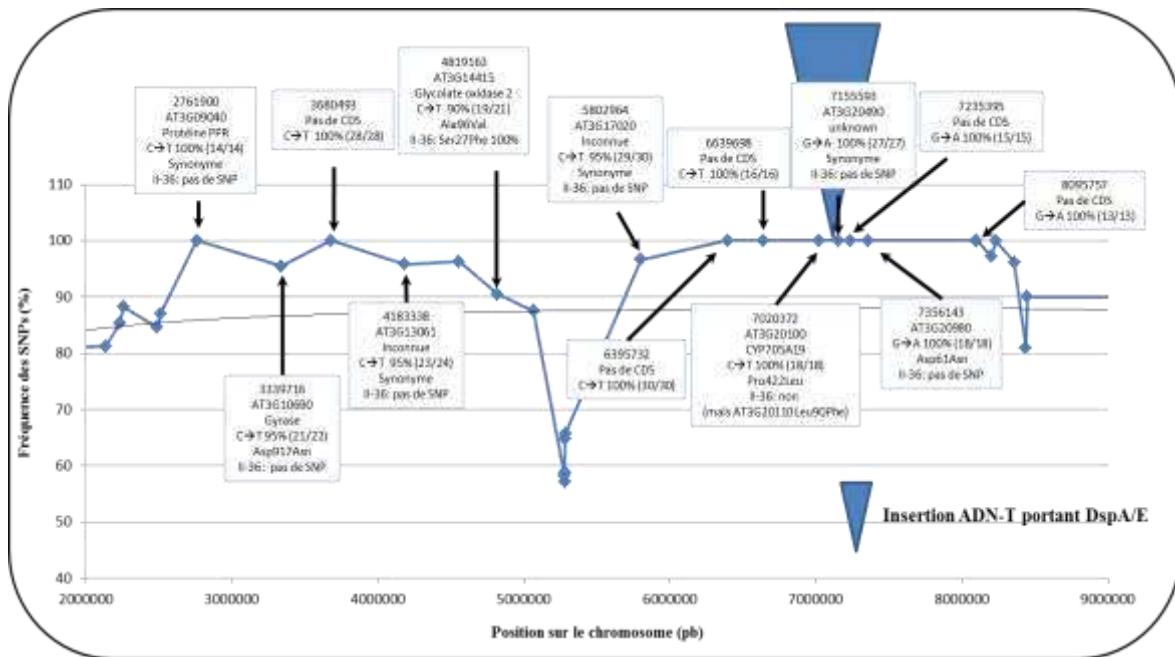
**Suppresseur *I-40-1* :**

Pour ce supprimeur nous avons identifié une zone spécifique présentant un pic de SNPs sur le chromosome 5 (Figure 35). Le pic de SNPs du supprimeur *I-40-1* se situe entre les positions 20 et 70 millions de paires de bases. Contrairement aux pics des supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*, ce pic est moins net. La comparaison avec les profils de pics sur les autres chromosomes est cependant plus nette (Annexe 1). En effet, la majorité des SNPs sur les autres chromosomes n'ont qu'une fréquence d'apparitions sur les courtes séquences comprise entre 50 et 60% tandis que sur le chromosome 5 la fréquence est comprise entre 80 et 100%. Ceci indique que la mutation causale se trouve dans cette région du chromosome 5.

Les SNPs candidats potentiels situés dans la zone entre les positions 20 et 70 millions de paires de bases ont été analysés (Annexe 2). En résumé les candidats dont les SNPs présentent une fréquence d'apparition de 100% dans les courtes séquences sont au nombre de 3. Le premier SNP situé en position 2406802 est un changement d'une base cytosine en thymine, ce changement induit une mutation synonyme dans la séquence protéique du gène AT5G07610 de fonction inconnue. Le second SNP est situé en position 2729652 est un changement d'une base cytosine en thymine dans le gène AT5G08450 codant une histone déacétylase, ce changement provoque l'apparition d'un codon Stop. Le dernier SNP situé en position 4500448 est une modification cytosine en thymine et cela touche le gène AT5G13950 dans la partie intronique du gène. Ces analyses suggèrent que le SNP causal est celui qui touche l'histone déacétylase. Cependant des erreurs de séquençage n'excluent pas des candidats présentant une seule ou deux erreurs dans leurs courtes séquences tels que les gènes AT5G14610 (fonction inconnue), AT5G18590 (fonction inconnue) dont les SNPs provoquent une modification de la séquence protéique. Nous ne pouvons donc pas conclure à l'heure actuelle si tel ou tel gène candidat est responsable du phénotype de résistance. Les mutants ADN-T de ces candidats ont été commandés et il serait intéressant d'effectuer des analyses de croisements avec la lignée 13-1-2 en vérifiant si la descendance est résistante sur estradiol. Cela permettrait d'identifier le gène responsable de la diminution de la toxicité de DspA/E dans le supprimeur *I-40-1*.

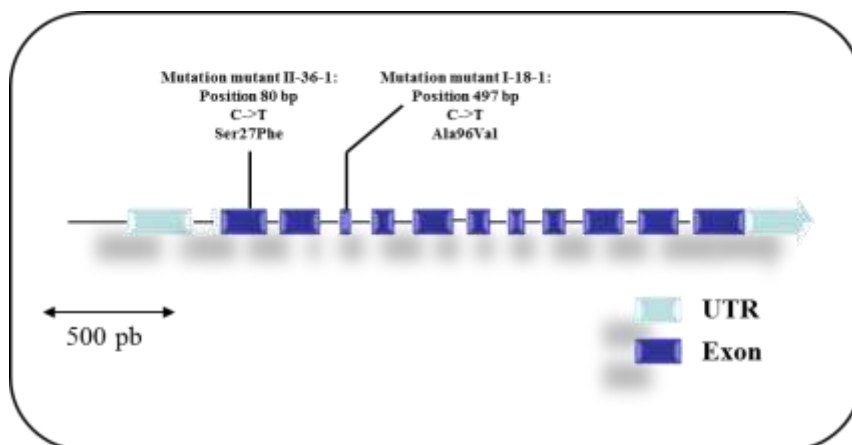
**Supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*:**

Pour les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*, la localisation du pic de SNPs est plus nette (Figure 35). En effet, la fréquence d'apparition des SNPs dans les courtes séquences est comprise entre 80 et 100% sur le chromosome 3 entre les positions 20 et 80 millions de paires de bases avec une proportion plus importante comparée au pic du SNPs du supprimeur *I-40-1* dans le chromosome 5. Cette fréquence d'apparition est d'ailleurs bien plus nette pour le supprimeur *II-36-1*. Les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1* étant alléliques ces analyses suggèrent que la mutation causale responsable du phénotype de résistance est située dans cette zone de pic de SNPs. Nous avons choisi par la suite de nous intéresser plus précisément à l'analyse des gènes candidats dans cette zone.



**Figure 36: Profil des pics de SNPs obtenus pour le suppresseur *I-18-1* et comparaison avec le suppresseur *II-36-1***

Le profil du pic de SNP du chromosome 3 a été zoomé sur la zone comprise entre 20 et 80 millions de paires de bases sur le profil du suppresseur *I-18-1*. Le profil a été comparé avec le profil du *II-36-1* dont les informations ont été ajoutées sur le profil ci-dessus. Dans l'ordre affiché dans les cadres: La première information correspond à la position sur le chromosome, ensuite est affiché le numéro AGI du gène dans lequel le SNP est présent. En troisième position est présentée la fonction putative du gène. En quatrième position est présenté le type de SNP entre parenthèses, le nombre de courtes séquences présentant le SNP par rapport au nombre total. En cinquième position la modification induite par le SNP est présentée et en dernière position si le SNP est présent chez le suppresseur *II-36-1*. Asp: Aspartate, Ala: Alanine, Val: Valine, Leu: Leucine, Pro: Proline, Phe: Phénylalanine Asn: Asparagine.

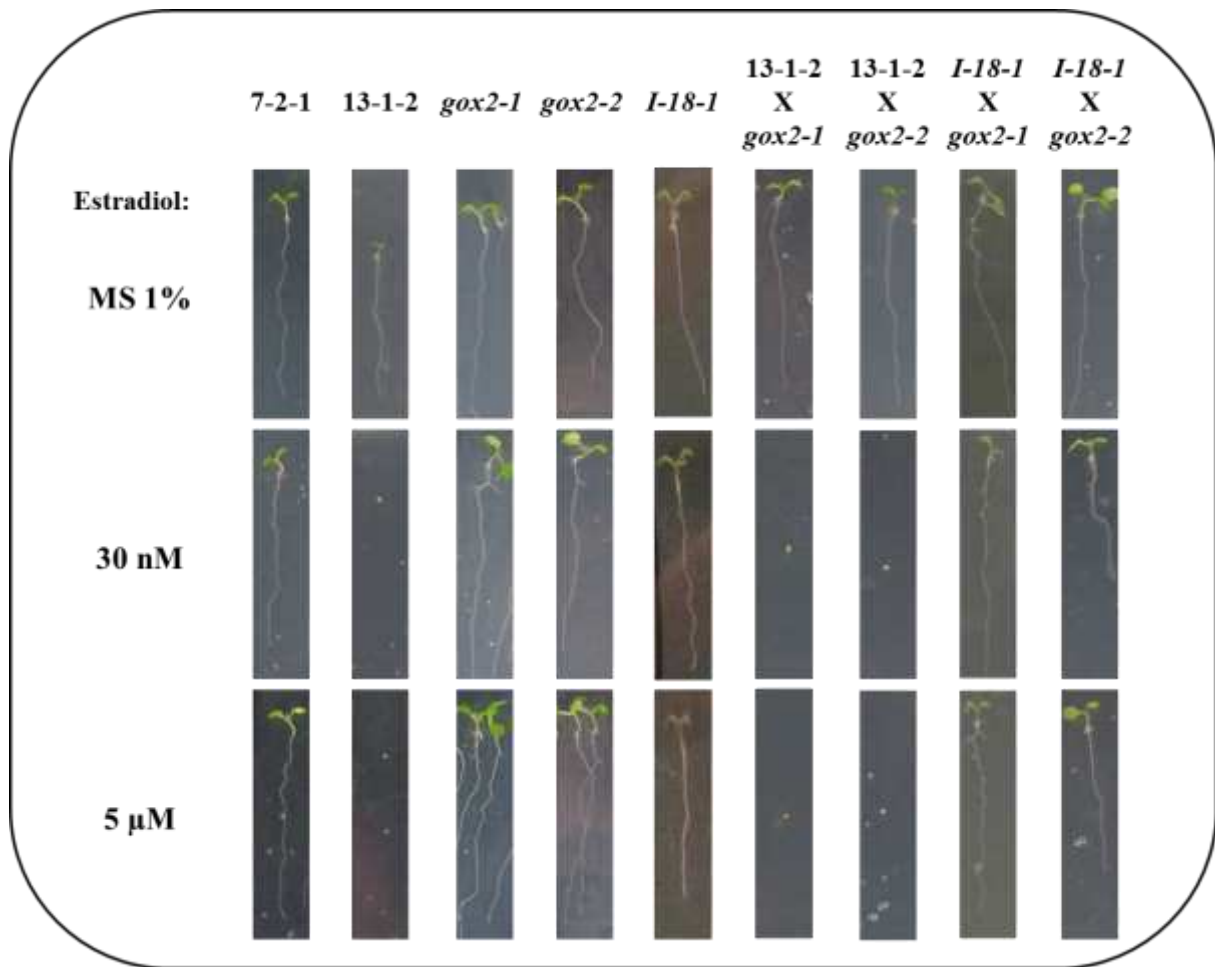


**Figure 37: Gène *GOX2* et position des mutations des suppresseurs *I-18-1* et *II-36-1***

Les analyses des gènes candidats de la zone comprise entre les positions 20 et 80 millions de paires de bases m'ont conduit à identifier plusieurs candidats potentiels chez les supresseurs *I-18-1* et *II-36-1*. La Figure 36 présente le profil des SNPs présents dans la zone de pic pour le supresseur *I-18-1* et si ces SNPs sont présents ou non chez le supresseur *II-36-1*. Nos analyses montrent dans un premier temps que la majorité de SNPs présents dans cette région sont localisés entre les positions 60 et 80 millions de paires de bases. En souhaitant rechercher la localisation de l'ADN-T portant le système d'expression XVE et DspA/E, nous nous sommes rendus compte que l'ADN-T était localisé dans cette région au voisinage de 71 millions de paires de bases (Figure 36). En alignant la séquence de DspA/E avec les courtes séquences des banques obtenues nous avons observé que DspA/E était inséré à cette position.

La comparaison entre les profils de SNPs des supresseurs *I-18-1* et *II-36-1* a conduit à l'identification de deux gènes codant des cytochromes P450. Le gène AT3G20100 codant CYP705A19 pour le supresseur *I-18-1* chez lequel la proline en position 422 est remplacée par une leucine et le gène AT3G20110 codant CYP705A20 pour le supresseur *II-36-1* chez lequel la leucine en position 482 est remplacée par une phénylalanine.

Un seul candidat commun aux deux supresseurs a pu être identifié, il s'agit d'une glycolate oxydase codée par le gène AT3G14415. Ce candidat ne nous a pas paru évident au premier abord. En effet, pour le supresseur *II-36-1*, le SNP (C en T) en position 80 de la séquence du gène et modifiant la sérine en position 27 en phénylalanine est présent à 100% dans les courtes séquences de la banque du *II-36-1*. Chez le supresseur *I-18-1*, le SNP (C en T) en position 497 de la séquence du gène et modifiant l'alanine 96 en valine n'est présent qu'à 90% dans les courtes séquences de la banque du *I-18-1*. La fréquence à 90 % et non à 100% peut être due à une erreur de séquençage. Cette fréquence peut être également due au fait que dans le pool d'ADN des F2 séquencées il y a des F2 qui ne portent pas la mutation. Afin d'éliminer cette dernière hypothèse, une recherche de la mutation chez les 100 F2 séquencées a été effectuée à l'aide de marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). Ces analyses de CAPS ont montré que la mutation dans la glycolate oxydase chez les 100 F2 était bien présente (Annexe 3). Ceci nous indique que les différences sur les courtes séquences sont des erreurs de séquençage. Nous avons donc deux mutations qui affectent la séquence protéique de la glycolate oxydase 2 (Figure 37).



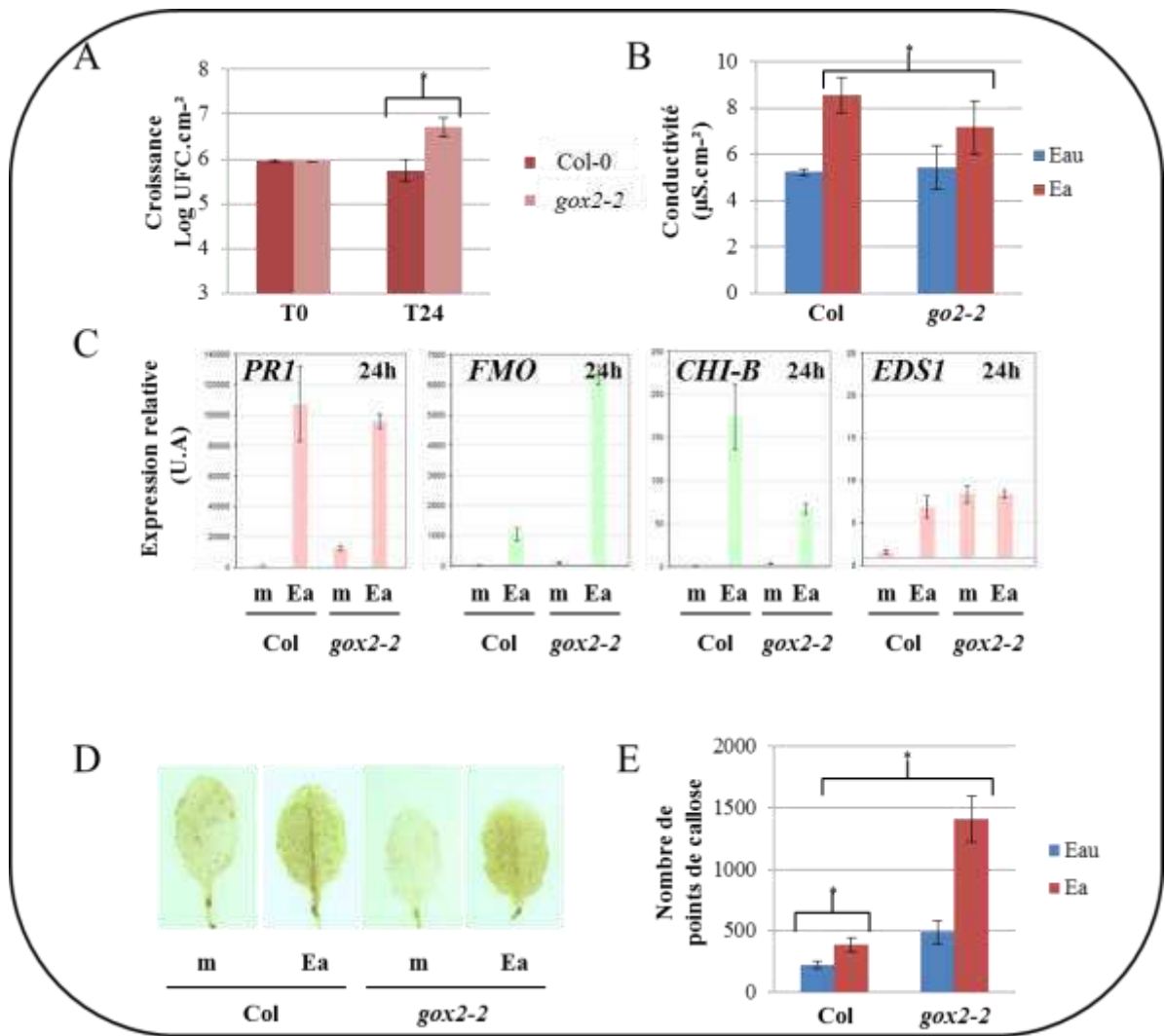
**Figure 38: Le suppresseur *I-18-1* et les mutants *gox2-1* et *gox2-2* sont alléliques et la mutation *gox2* supprime la toxicité de *dspA/E*.**

(A): Test de complémentation entre le suppresseur *I-18-1* et les mutants *gox2*. 5 à 6 graines des lignées contrôles, des mutants et des graines F1 issues du croisement entre la lignée 13-1-2, le suppresseur *I-18-1* et les mutants *gox2* ont été semées sur milieu MS 1% de sucrose supplémenté ou non avec de l'estradiol 30 nM et 5 μM. Les photos sont prises 6 jours après semis.

Afin de confirmer que la mutation de la glycolate oxydase 2 est le candidat responsable de la suppression chez les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*. Nous avons commandé deux lignées d'*A. thaliana* portant une insertion ADN-T dans le gène *GOX2*. Ces lignées ont été croisées avec les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*. La Figure 38 présente un exemple de croisement entre le supprimeur *I-18-1* et les mutants ADN-T *gox2-2* et *gox2-1*. La lignée contrôle 7-2-1 germe sur toutes les concentrations d'estradiol. La lignée 13-1-2 ne germe pas sur 30 nM et 5 µM comme attendu. Les mutants *gox2-2* et *gox2-1* ainsi que le supprimeur *I-18-1* germent également sur toutes les concentrations. En parallèle, des croisements entre la lignée 13-1-2 et les mutants *gox2* ont été effectués. Les croisements entre ces lignées ne germent pas sur estradiol (30 nM et 5 µM), indiquant que la mutation *gox2-2* est récessive. Ceci a permis d'isoler des individus doubles homozygotes pour le transgène DspA/E et pour la mutation *gox2* dont la descendance F2 est en cours d'analyse. Le croisement entre le supprimeur *I-18-1* et les mutants *gox2* germent sur toutes les concentrations d'estradiol. Ce qui indique qu'il n'y a pas de complémentation entre le supprimeur *I-18-1* et les mutants *gox2*. Ces résultats indiquent que le supprimeur *I-18-1* et les mutants *gox2* sont alléliques. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les F1 issues du croisement entre la lignée 13-1-2 et les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1*.

La glycolate oxydase est impliquée dans la résistance non-hôte chez *A. thaliana* et des mutants de la glycolate oxydase ne présentent plus de réponses de défenses telles que la mort cellulaire et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène en réponse au pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci* (Rojas and Mysore, 2012). Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle de la glycolate oxydase vis-à-vis de la toxicité de DspA/E et en réponse à *E. amylovora* (partie suivante).





**Figure 39: Le gène *GOX2* est requis pour les défenses non-hôte contre *E. amylovora***

(A): Croissance bactérienne chez Col-0 et *gox2-2* à T0 et T24 heures.

(B): Conductivité molaire ionique chez Col-0 et *gox2-2* à 24 heures.

(C): Expression en qPCR à 24 heures post-inoculation avec la souche sauvage *E. amylovora* ou infiltration avec de l'eau chez Col-0 et *gox2-2* de gènes marqueurs de la voie SA (*PRI*), de la voie EDS1 (*FMO*), de la voie JA/ET (*CHI-B*) et impliqués dans la résistance non-hôte (*EDS1*). Le niveau d'expression relative a été normalisé avec le gène *APT*.

(D): Marquage au DAB chez Col-0 et *gox2-2*. Les feuilles sont infiltrées au DAB sous vide 2 heures après inoculation et décolorées 16 heures après inoculation. Seul le demi-limbe droit a été inoculé.

(E): Quantification de la déposition de callose chez Col-0 et *gox2-2*. Les feuilles sont détachées et décolorées dans du lactophénol 8 heures après inoculation. Par la suite, elles sont marquées au bleu d'aniline et observées à la loupe.

Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées à l'eau ou inoculées par la souche sauvage d'*E. amylovora* CFBP1430 à une concentration de  $10^8$  UFC/mL pour (A), (B), (C), (D) et (E). L'astérisque indique une valeur significative pour  $p < 0,05$  selon le test de student pour (A), selon le test de Mann et Whitney pour (B) et (E) sur 2 répétitions biologiques. m : Mock, Ea : *E. amylovora*.

#### 4. La glycolate oxydase est requise pour l'activation de certaines défenses chez *A. thaliana* contre *E. amylovora*

Afin de déterminer le rôle de la glycolate oxydase 2 au cours de l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana* nous nous sommes intéressés à la croissance et à la modulation des défenses chez le mutant glycolate oxydase 2 (*gox2-2*) telles que les fuites d'électrolytes traduisant la mort cellulaire, l'activation de gènes de défenses des voies SA ou JA/ET, la formation de FAOs ou encore la déposition de callose. Nous avons donc poursuivi nos études sur le mutant *gox2-2*, le mutant d'insertion ADN-T utilisé dans l'étude de Rojas et al. 2012.

Dans un premier temps, la population bactérienne a été analysée chez Col-0 et le mutant *gox2-2* sur 24h. La Figure 39A montre que chez le mutant *gox2-2*, la population bactérienne est 10 fois plus importante que dans Col-0 où la bactérie n'a pas poussé comme il a été observé précédemment (Moreau et al., 2012). Ceci indique que le gène *GOX2* est requis pour limiter la multiplication de la bactérie *E. amylovora*.

Il a été montré dans (Degrave et al., 2008) que la bactérie *E. amylovora* induit des fuites d'électrolytes chez *A. thaliana* traduisant une augmentation de la porosité membranaire généralement précurseur de la mort cellulaire. La mesure des fuites a donc été effectuée chez le mutant *gox2-2* 24 heures après inoculation. La Figure 39B montre que Col-0 présente plus de fuite d'électrolytes en présence de la bactérie par rapport au contrôle eau comme attendu. Ce niveau de fuites d'électrolytes est moins élevé chez le mutant *gox2-2* par rapport à Col-0 en présence de la bactérie. Ce résultat indique que le gène *GOX2* contribue au développement de la porosité de la membrane induite chez *A. thaliana* par la présence d'*E. amylovora*.

Il a été montré précédemment que la bactérie *E. amylovora* module l'expression de gènes de différentes voies de défenses chez *A. thaliana*. Elle induit notamment les voie SA, JA/ET et des marqueurs de la résistance non-hôte tels que *EDS1* ou *FMO* (Degrave et al., 2008; Moreau et al., 2012; Degrave et al., 2013). Nous avons donc étudié le profil d'expression de certains marqueurs de ces voies de défenses chez le mutant *gox2-2* inoculé avec la bactérie *E. amylovora*. Un gène marqueur de la voie SA (*PR1*) est induit au même niveau chez Col-0 et le mutant *gox2-2* en présence de la bactérie. Ceci indique que la mutation du gène *GOX2* n'affecte pas l'expression du marqueur *PR1* à 24 heures post-inoculation. Un gène marqueur de la voie EDS1 (*FMO*) est quant à lui exprimé 6 fois plus chez le mutant *gox2-2* que chez Col-0 en présence de la bactérie. Ceci indique que la mutation du gène *GOX2* affecte l'expression du gène *FMO*. Un gène marqueur de la voie JA (*CHI-B*) est également modulé différemment chez le mutant *gox2-2* par rapport à Col-0 en présence de la bactérie. Il est en effet exprimé 1.5 fois moins chez *gox2-2*. La mutation du gène *GOX2* affecte également l'expression du marqueur *CHI-B*. Enfin, le gène *EDS1*, marqueur de la résistance non-hôte est induit de manière équivalente dans le mutant *gox2-2* et chez Col-0 en présence de la bactérie. Cependant, ce marqueur est exprimé de manière constitutive chez le mutant *gox2-2* puisque le niveau d'expression de ce marqueur dans le mutant *gox2-2* infiltré à l'eau est 10 fois plus important que dans Col-0 infiltré à l'eau. Ce résultat indique que la mutation du gène *GOX2* est impliquée dans la modulation du marqueur *EDS1*.

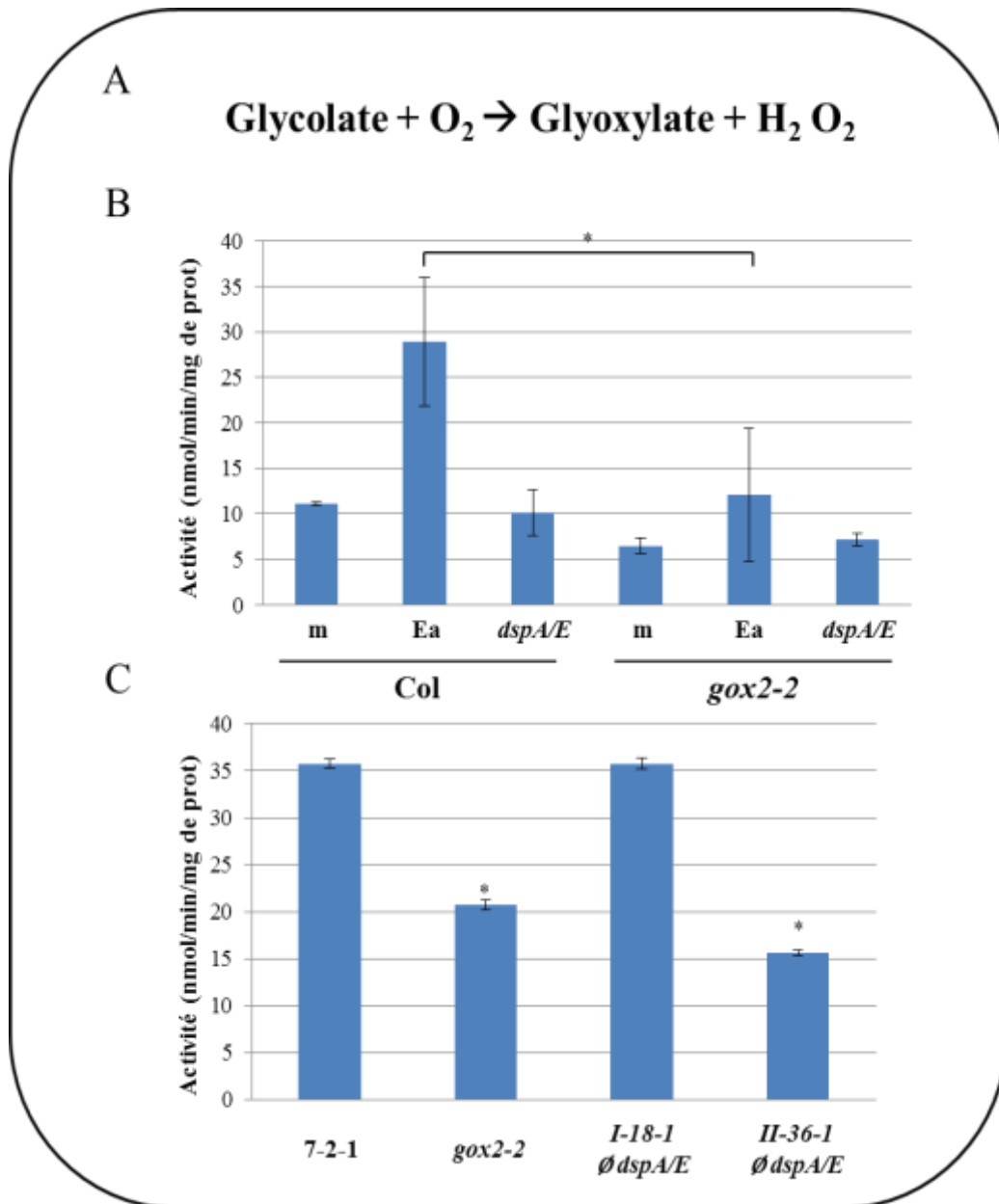
L'ensemble de ces résultats montre que le gène *GOX2* est impliqué dans la modulation de la voie JA mais également dans la voie *EDS1* régulateur de la résistance non-hôte contre *E. amylovora* chez *A. thaliana*. Le gène *GOX2* n'est cependant pas impliqué dans la régulation de la voie SA en réponse à *E. amylovora*. Afin de confirmer ces hypothèses d'autres gènes marqueurs de ces différentes voies de défenses pourront être testés. Les résultats d'expression génique présentés ici, sont différents de ceux observés dans l'étude de Rojas *et al.* En effet, les auteurs montrent dans les mutants *gox3* et *Haox2* (deux autres membres de la famille des glycolate oxydase chez *A. thaliana*) que les voies de défenses sont modulées différemment. Les différences de résultats dans le mutant *gox2-2* chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora* ne sont donc pas surprenantes. Il serait intéressant de voir si dans des mutants des autres glycolate oxydases les résultats sont différents.

Nous avons par la suite vérifié si l'accumulation d' $H_2O_2$  était perturbée dans le mutant *gox2-2* inoculé avec *E. amylovora*. La Figure 39D montre que cette accumulation n'est pas modifiée chez le mutant en réponse à *E. amylovora*. La seule différence observée est le contrôle eau qui présente moins d'accumulation de cette FAO chez *gox2-2* que chez Col-0. Ce résultats indiquent que la mutation *gox2-2* n'est pas impliquée dans l'accumulation d' $H_2O_2$  pendant l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*. La diminution dans le contrôle eau pour le mutant *gox2-2* indique cependant que la glycolate oxydase est bien une source alternative de production de cette FAO chez *A. thaliana*. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le stress oxydant détecté par le DAB généré par la glycolate oxydase 2 ne serait pas responsable de la résistance d'*A. thaliana* à *E. amylovora*, contrairement au cas de la résistance non-hôte démontrée par Rojas *et al.* La mutation *gox2-2* provoque une diminution drastique de FAOs tel que l' $H_2O_2$  chez *A. thaliana* inoculée avec le pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci*.

Nous avons ensuite analysé la formation des points de callose dans l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*. La Figure 39E montre qu'il y a une augmentation d'un facteur 3 du dépôt de callose en présence d'*E. amylovora* chez le mutant *gox2-2*, par rapport à Col-0. Ces résultats indiquent que la mutation du gène *GOX2* ne provoque pas de diminution d'accumulation de callose en réponse à *E. amylovora* contrairement à ce qui est observé en réponse à *P. syringae* pv. *tabaci*. Au contraire, la mutation *gox2-2* semble augmenter la déposition de callose en réponse à *E. amylovora* suggérant ainsi une régulation négative de la synthèse de callose par le gène *GOX2* chez *A. thaliana*.

En conclusion de l'ensemble de ces résultats, le gène glycolate oxydase 2 est nécessaire à la mise en place d'une partie des défenses chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora*. Ce gène est un nouveau candidat impliqué dans la résistance non-hôte au même titre que le gène *EDS1*. Le gène *EDS1* n'est d'ailleurs pas dérégulé dans le mutant *gox2-2* infecté avec *E. amylovora* ce qui suggère que les voies *EDS1* et *GOX2* sont indépendantes. Il serait intéressant de vérifier l'état des défenses dans un double mutant *gox2-2/eds1-2*.





**Figure 40: L'activité glycolate oxydase est requise pour la toxicité de DspA/E**

(A): Réaction catalysée par la glycolate oxydase. La formation d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est prise en charge par des peroxydases ce qui libère 2 électrons qui vont oxyder l'o-dianisidine composé qui vire au rouge. C'est l'oxydation de ce composé qui permet la mesure de l'activité de la glycolate oxydase.

(B): Mesure de l'activité glycolate oxydase chez Col-0 et le mutant *gox2-2* infiltrés à l'eau (m) ou inoculés avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea) ou le mutant bactérien DspA/E (*dspA/E*) à 10<sup>8</sup> UFC par mL. Les plantes âgées de 5 semaines ont été prélevées 24 heures après inoculation.

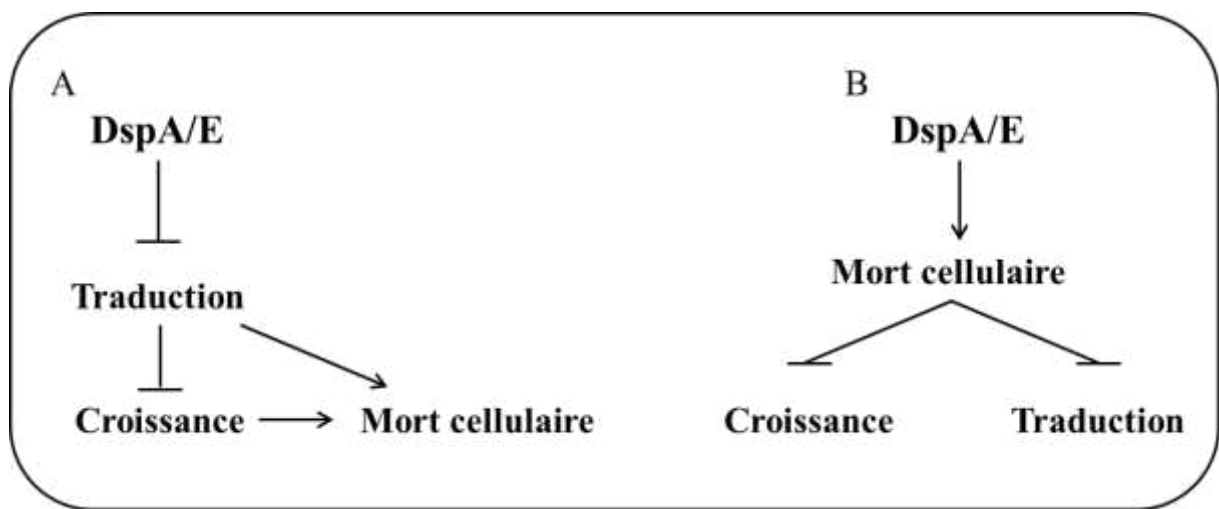
(C): Mesure de l'activité glycolate oxydase chez la lignée contrôle 7-2-1, le mutant *gox2-2* en tant que contrôle négatif et les suppresseurs *I-18-1* et *II-36-1* sans DspA/E (Ø *dspA/E*). Les plantes âgées de 5 semaines ont été prélevées sans induction ou inoculation au préalable. La mesure de l'activité glycolate oxydase est faite sur des extraits protéiques passés sur colonnes afin de récupérer l'enzyme. Les astérisques représentent une valeur significativement différente par rapport au contrôle eau pour (B) et par rapport au contrôle 7-2-1 pour (C). p<0.05 selon le test de Mann et Whitney.

## 5. L'activité de la glycolate oxydase 2 est requise pour la toxicité de DspA/E

La glycolate oxydase est une enzyme peroxisomale qui convertit le glycolate en glyoxylate et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par oxydation (Figure 40A). Deux hypothèses quant à l'effet de la glycolate oxydase au cours de l'interaction sont alors possibles. Soit l'effet peut être dû à la formation d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* ne semble pas être le cas puisque l'accumulation d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble identique dans le mutant *gox2-2* et Col-0. Sinon, l'effet peut-être dû à l'accumulation du glyoxylate. Les résultats précédents ont montré que la mutation du gène *GOX2* provoquait une augmentation de la croissance bactérienne chez le mutant *gox2-2* accompagné d'une diminution des fuites d'électrolytes. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Rojas et al, 2012. Nous nous sommes donc demandé si la résistance passant par la glycolate oxydase pouvait être due directement à son activité d'oxydation du glycolate. Pour cela, nous avons étudié l'activité glycolate oxydase sur plantes infectées mais aussi dans les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1* (Figure 40).

La Figure 40B montre qu'en présence de la bactérie, l'activité glycolate oxydase (GOX) chez Col-0 est environ 3 fois plus élevée que le contrôle eau. En revanche, lorsque les plantes sont inoculées avec un mutant *dspA/E* l'activité GOX reste à son niveau basal. Comme attendu, l'activité GOX chez le mutant *gox2-2* est plus faible que chez Col-0. Chez le mutant *gox2-2*, une faible augmentation est observée en réponse à la souche sauvage de la bactérie. L'activité en présence du mutant *dspA/E* est à son niveau basal. Ces résultats indiquent que GOX2 est activée en présence de la souche sauvage d'*E. amylovora*. Cette activité dépend de plus de l'effecteur bactérien DspA/E.

La Figure 40C montre l'activité de la glycolate oxydase chez la lignée contrôle 7-2-1, le mutant *gox2-2* et les supprimeurs *I-18-1* et *II-36-1* ne portant pas DspA/E (Voir Matériel et Méthodes pour l'isolement des supprimeurs sans DspA/E). Les résultats montrent que l'activité glycolate oxydase est bien diminuée dans le mutant *gox2-2* comme attendu. Concernant les supprimeurs, l'activité glycolate oxydase est diminuée dans le supprimeur *II-36-1* mais pas dans le *I-18-1*. Ces résultats sont surprenants sachant que ces supprimeurs sont alléliques. Une hypothèse possible serait que l'activité GOX soit moins fortement diminuée dans le supprimeur *I-18-1* et que cette diminution ne soit pas détectable *in vitro*. La mutation du supprimeur *II-36-1* conduit à une modification d'un acide aminé très conservé chez les glycolate oxydases et au changement d'une sérine en phénylalanine. Chez le supprimeur *I-18-1* la modification n'est pas un changement structural important. En effet, la mutation provoque un changement d'une alanine en valine. Cependant, cette modification touche un acide aminé très conservé chez les glycolate oxydases. Ainsi, la mutation du supprimeur *I-18-1* n'aurait pas d'impact sur l'activité de la GOX2 en conditions optimales *in vitro* mais diminuerait son activité *in vivo* contrairement au *II-36-1* pour lequel la mutation est un changement structural plus important qui affecterait son activité *in vivo* comme *in vitro*. L'ensemble de ces résultats montrent que l'activité glycolate oxydase est requise pour la virulence de la bactérie et ce, dépendamment de DspA/E. Cependant, afin de confirmer ces résultats, des tests de mesure d'activité sur les lignées contrôles 7-2-1 et 13-1-2 induites avec différentes concentrations d'estradiol permettraient de confirmer l'effet de DspA/E sur



**Figure 41: Hypothèses concernant la toxicité de DspA/E**

(A): Hypothèse selon laquelle DspA/E inhiberait la traduction conduisant à l'arrêt des processus cellulaires comme la croissance résultant au final à la mort cellulaire.

(B): Hypothèse selon laquelle DspA/E induirait directement la mort cellulaire ce qui aurait pour conséquence un arrêt de la croissance et de la traduction.



l'activité de la glycolate oxydase et par la même occasion de vérifier si cette activité est dose-dépendante.

## 6. Discussion

### ***Quel est le lien de corrélation entre l'inhibition de la croissance racinaire, de l'arrêt de la traduction et l'induction de la mort cellulaire par DspA/E ?***

Nos résultats montrent que dans les supprimeurs, DspA/E n'inhibe plus la croissance racinaire et la traduction. Seulement, la toxicité de DspA/E passe-t-elle par un arrêt de la traduction qui conduit à l'arrêt des processus cellulaires et donc à un blocage de la croissance racinaire et conduit à la mort cellulaire ? Ou inversement, est-ce que l'inhibition, de la croissance racinaire et de l'arrêt de la traduction sont-elles des conséquences de la mort cellulaire ? (Figure 41).

Plusieurs éléments nous suggèrent que la mort cellulaire serait plutôt une conséquence de l'arrêt de la traduction. En effet, il a été observé que l'effecteur DspA/E a une localisation nucléaire chez *A. thaliana* (Degrave et al., 2013). Il a également été montré que l'effecteur DspA/E réprime la synthèse protéique dans les plantes transgéniques exprimant DspA/E (Degrave et al., 2013). De plus, les premiers signes de fuites d'électrolytes sont détectés 1 heure post-inoculation, la répression de la traduction est précoce (entre 3 et 6 heures) et les symptômes sont observés 24 heures post-inoculation. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse selon laquelle la mort cellulaire et les défenses associées à la toxicité de DspA/E sont une conséquence de l'inhibition de la traduction (Degrave et al., 2013). Ceci est de plus cohérent avec l'identification d'interacteurs potentiels de DspA/E impliqués dans la traduction chez la levure (Siamer, 2013). Ainsi l'inhibition de la croissance racinaire serait une conséquence de l'inhibition de la traduction.

Afin d'avancer dans notre compréhension, il serait nécessaire d'identifier d'une part les cibles de DspA/E et d'autre part les mécanismes permettant à DspA/E de déclencher la mort cellulaire. Pour identifier les mécanismes permettant à DspA/E d'induire la mort cellulaire, un criblage a été réalisé. Cette première stratégie est celle qui est présentée dans le chapitre 2 de ce manuscrit, qui a permis d'identifier la glycolate oxydase 2 impliquée dans la toxicité de DspA/E. Pour identifier les cibles directes de DspA/E, un crible double hybride a été réalisé. Ce crible double hybride a été effectué à l'aide du domaine double *beta-propeller* de DspA/E sur une banque d'ADNc de plantules d'*A. thaliana* par la société Hybrigenics. Ce domaine pourrait être impliqué dans l'interaction protéine-protéine comme il a été démontré pour le domaine *propeller* de la protéine brat chez la drosophile qui présente de fortes similarités avec le domaine *beta-propeller* de DspA/E (Siamer et al., 2013). Les résultats de ce crible ont conduit à identifier 3 interacteurs potentiels dont les scores d'interactions étaient cependant faibles. Malgré cela, l'interaction *in planta* de DspA/E n'était pas impossible avec ces interacteurs potentiels et les études ont été poursuivies sur deux de ces candidats, aucun mutant d'insertion n'était disponible pour le troisième candidat (un facteur de transcription de type TCP) dans les banques de mutants. Le premier candidat code une sous-unité du signalosome COP9 nommé CSN5a (COP9 Signalosome 5a). L'analyse des symptômes chez le mutant d'insertion de ce gène montre que *E.*

*amylovora* provoque moins de nécrose que les plantes de génotype sauvage. Des analyses parallèles du mutant d'insertion de ce gène, ont montré que certaines réactions de défenses sont pré-induites dans ce mutant comme les formes actives de l'oxygène ( $H_2O_2$ ) et des gènes marqueurs des voies SA et JA. Ce qui ne nous permet pas de conclure quant à la capacité de la bactérie à provoquer une nécrose chez ce mutant. Il est possible que la diminution des symptômes dans ce mutant soit due aux défenses qui agissent sur la bactérie empêchant ainsi une éventuelle multiplication (Fagard, 2010). En 2008, Yahalom et al, ont montré que COP9 s'associe avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3, et qu'un excès d'accumulation d'eIF3 conduit à l'inhibition de la traduction. Les auteurs concluent que l'interaction entre COP9 et eIF3 permet à COP9 de réguler la quantité de eIF3 nécessaire au développement normal d'*A. thaliana* (Yahalom et al., 2007). Par cette étude, on peut se poser la question du rôle de DspA/E sur l'interaction avec COP9. Il est alors possible que l'interaction entre DspA/E et COP9 conduise à une dérégulation de la quantité de eIF3 expliquant ainsi l'inhibition de la traduction par DspA/E. Il serait intéressant de mesurer la quantité d'eIF3 dans des plantes infectées par *E. amylovora* et dans la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E.

Le dernier candidat issu du crible double hybride est une histone déméthylase putative à domaine Jumonji (AtJMJ24). L'étude du mutant d'insertion du gène codant cette histone déméthylase putative a fait l'objet de mon stage de master 2. Cependant, les analyses du mutant d'insertion de ce gène n'ont pas permis de montrer de nettes différences en terme de nécrose et de multiplication bactérienne. De plus, les analyses de la F2 issue du croisement entre le mutant d'insertion d'AtJMJ24 et de la lignée 13-1-2 ont montré que ce gène n'est pas impliqué dans la toxicité induite par DspA/E puisque la ségrégation observée ne correspond pas à la ségrégation attendue dans le cas où la mutation *Atj mj24* aurait un effet sur la toxicité de DspA/E (résultats non présentés) (l'Annexe 4 présente la ségrégation théorique en fonction de l'effet d'une mutation sur la toxicité de DspA/E). L'ensemble de ces résultats nous ont poussés à ne pas poursuivre les études sur ces candidats interacteurs potentiels. Cependant, le crible double hybride n'est pas un système infallible quant à l'identification d'interacteurs. En effet, il est possible que le domaine *beta-propeller* dans la levure n'ait pas pris la bonne conformation et ne peut donc pas interagir avec ses interacteurs potentiels. Il est également possible que ce domaine seul ne suffise pas pour les interactions protéine-protéine. Tristan Boureau a effectué des recherches de structures secondaires dans DspA/E (Boureau, 2006) et il a identifié un domaine NORS (NON-Regular Secondary Structure) impliqué dans les interactions protéine-protéine (Liu and Rost, 2003). Ce domaine est situé dans la partie N-terminale de DspA/E et est accolé au domaine *beta-propeller*. Il est possible que le domaine NORS soit également important pour les interactions entre DspA/E et les protéines d'*A. thaliana*, ce qui expliquerait le faible nombre de candidats trouvés en double hybride.

Au cours de sa thèse Sabrina Siamer a travaillé sur une protéine de fusion GST-DspA/E stable lui permettant de mettre en place des expériences de pull-down. Ainsi, en passant des extraits de levures sur une colonne glutathion fixant la protéine de fusion GST-DspA/E, 6 interacteurs potentiels ont été identifiés. Ces 6 interacteurs potentiels sont impliqués dans la traduction (Siamer, 2013). Ces résultats renforcent l'hypothèse que DspA/E interagirait avec des éléments de la machinerie traductionnelle chez la plante lui permettant ainsi d'être toxique. Il

serait intéressant de vérifier si des orthologues chez *A. thaliana* de ces interacteurs potentiels existent. Ainsi, les mutants d'insertion pourront être récupérés et croisés avec la lignée 13-1-2 afin de voir si les mutations ont un effet sur la toxicité de DspA/E. Il serait également intéressant d'utiliser la protéine fusion GST-DspA/E et de faire passer des extraits de plantes sur colonnes afin d'identifier des candidats potentiels qui seraient présents chez *A. thaliana* mais pas chez la levure. Enfin, il serait intéressant de regarder si des marqueurs de la traduction sont affectés chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora* et dans la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E.

### ***Pourquoi le gène AT5G08450 serait-il un bon candidat pour le suppresseur I-40-1 ?***

Le criblage de la population de mutants suppresseurs issus de la mutagenèse à l'EMS de la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E a permis d'isoler 4 mutants suppresseurs dont trois sont alléliques et un représentant un groupe de complémentation à lui seul (*I-40-1*). Nos analyses de séquences pour le suppresseur *I-40-1* nous ont permis d'identifier un pic de SNPs qui contient plusieurs SNPs présent dans 100% des courtes séquences. Un seul SNP présent à 100% dans les courtes séquences, correspond à un gène exprimé et à une mutation non-synonyme. Ce SNP produit un codon stop prématuré dans le gène AT5G08450 qui code une histone déacétylase appelée HDC1. Selon nos données de transcriptome de feuilles d'*A. thaliana* infectées par *E. amylovora*, ce gène est exprimé. Au contraire, le gène AT5G07610 pour lequel 100% de SNPs ont également été observés, n'est pas exprimé selon nos données de transcriptome et la mutation affectant sa séquence est synonyme (Figure 35). Le gène AT5G08450 est donc le candidat le plus intéressant et ce indépendamment de sa fonction.

L'histone déacétylase codée par AT5G08450 (HDC1) interagit physiquement avec deux autres déacétylases HDA6 et HDA19 qui déacétylent l'histone H3 afin de permettre l'expression de certains gènes (Perrella et al., 2013). HDC1 est impliqué dans la sensibilité des graines à l'ABA. En effet, le mutant *hdc1-1* germe beaucoup moins bien que le sauvage quand il est semé sur ABA. Les auteurs montrent dans leurs étude que la protéine HDC1 interagit avec HDA6 et HDA19 ce qui permet de promouvoir la déacétylation et d'atténuer la répression de gènes permettant la germination. Ceci expliquerait pourquoi la germination est plus inhibée dans le mutant *hdc1-1* sur ABA que dans le contrôle. Ces résultats sont intéressants par rapport au phénotype observé pour le suppresseur *I-40-1*. En effet, ce suppresseur présente un phénotype de germination équivalent à la lignée 13-1-2 sur MS 1% de sucrose. Par contre, lorsqu'il est semé sur estradiol, il est capable de germer jusqu'à une concentration de 100 nM et ne germe plus au-delà de cette concentration. Ceci suggère que l'effet toxique de DspA/E n'est pas complètement supprimé chez ce suppresseur. Une hypothèse possible, est que DspA/E en étant localisé au noyau interagirait avec la protéine HDC1. Cette interaction, fixerait le complexe déacétylases HDC1/HDA6/HDA19 sur l'histone H3 favorisant ainsi la répression des gènes permettant d'activer la germination. Ainsi DspA/E inhiberait la germination de manière indépendante de l'inhibition de la traduction. Afin de confirmer l'hypothèse d'inhibition de la germination par DspA/E *via* la déacétylation de HDC1, il serait intéressant d'étudier la descendance du croisement entre le mutant *hdc1-1* et la lignée 13-1-2. Il serait également intéressant de tester des marqueurs de la germination Afin de confirmer l'interaction entre DspA/E et HDC1 un pull down

pourrait être effectué sur la fusion GST-DspA/E et une protéine de fusion His-HDC1. Une façon de vérifier si DspA/E se fixe sur le complexe HDC1/HDA6/HDA19 serait d'effectuer une expérience de ChIP-qPCR dans la lignée 13-1-2 avec l'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme déacétylée par le complexe HDC1/HDA6/HDA19 de l'histone H3.

***Quel est le lien entre l'augmentation de croissance bactérienne et les différentes réponses de défenses dans le mutant *gox2-2* ?***

Nos analyses des supresseurs *I-18-1* et *II-36-1* nous ont permis d'identifier la glycolate oxydase 2 comme étant un supresseur de la toxicité induite par DspA/E chez *A. thaliana*. Ces résultats ont été confirmés grâce au croisement entre la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E et le mutant *gox2-2*. Afin de comprendre le rôle de la glycolate oxydase 2 au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*, nous avons décidé d'étudier le phénotype du mutant *gox2-2* infecté par *E. amylovora*.

Nos résultats montrent que le mutant *gox2-2* présente moins de fuite d'électrolytes en réponse à l'infection par la bactérie et la bactérie se multiplie mieux dans ce mutant. Ces résultats suggèrent que le gène *GOX2* contribue à la mise en place de la mort cellulaire chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora*. Ces résultats sont en accord avec les résultats présentés dans l'étude de Rojas et al., 2012 où les auteurs montrent que le mutant *gox2-2* présente moins de fuite d'électrolytes et plus de croissance bactérienne en réponse à *P. syringae* pv. *tabaci*. Ceci indique que le mutant *gox2-2* est plus susceptible aux agents pathogènes non-hôtes *E. amylovora* et *P. syringae* pv. *tabaci*. Dans leur étude, les auteurs affirment que le mutant *gox2-2* est affecté dans sa capacité à déclencher une HR lorsqu'il est inoculé avec *P. syringae* pv. *tabaci*. Dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*, il n'est pas possible de dire si la mort correspond à une HR. Ceci est discuté dans la conclusion générale.

Nous avons par la suite étudié différentes défenses dans le mutant *gox2-2* en réponse à *E. amylovora*. Nous avons étudié par exemple plusieurs marqueurs de voies de défenses telle que la voie EDS1 dont le niveau basal d'expression du gène est fort dans le fond mutant *gox2-2*. C'est aussi le cas pour la voie JA dont l'expression du marqueur *CHI-B* est diminuée dans le mutant *gox2-2* inoculé par *E. amylovora*. C'est aussi le cas de la voie de la SAR dont le niveau d'expression du marqueur FMO est augmenté dans le mutant *gox2-2* en réponse à *E. amylovora*. Par contre la voie SA ne semble pas affectée par la mutation *gox2* puisque le niveau d'expression du gène marqueur PR1 n'est pas affectée dans le mutant *gox2-2*. Cependant, d'autres marqueurs sont susceptibles d'être testés afin de confirmer la modulation de ces voies dans le fond mutant. Nos résultats de DAB montrent au niveau macroscopique que le mutant *gox2-2* accumule de l' $H_2O_2$  de façon équivalente à Col-0 (Figure 39). Dans la seconde partie de mes travaux, je me suis intéressé en détail de l'accumulation de l' $H_2O_2$  dans le mutant *gox2-2*. Enfin, nos résultats montrent que le dépôt de callose est plus important dans le mutant *gox2-2* que dans Col-0 inoculés avec *E. amylovora*. L'ensemble de ces résultats indique que le gène *GOX2* est impliqué dans les réponses de défenses au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*.

La glycolate oxydase est une enzyme qui oxyde le glycolate en glyoxylate produisant ainsi de l' $H_2O_2$ . Cette forme active de l'oxygène a été décrite comme étant un messenger secondaire dans la mise en place des défenses (Rojas and Mysore, 2012). Ainsi, une hypothèse pouvant expliquer le rôle de la glycolate oxydase 2 au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* serait que cette enzyme produirait de l' $H_2O_2$  qui servirait de messenger secondaire pour déclencher les défenses empêchant ainsi la bactérie de proliférer.

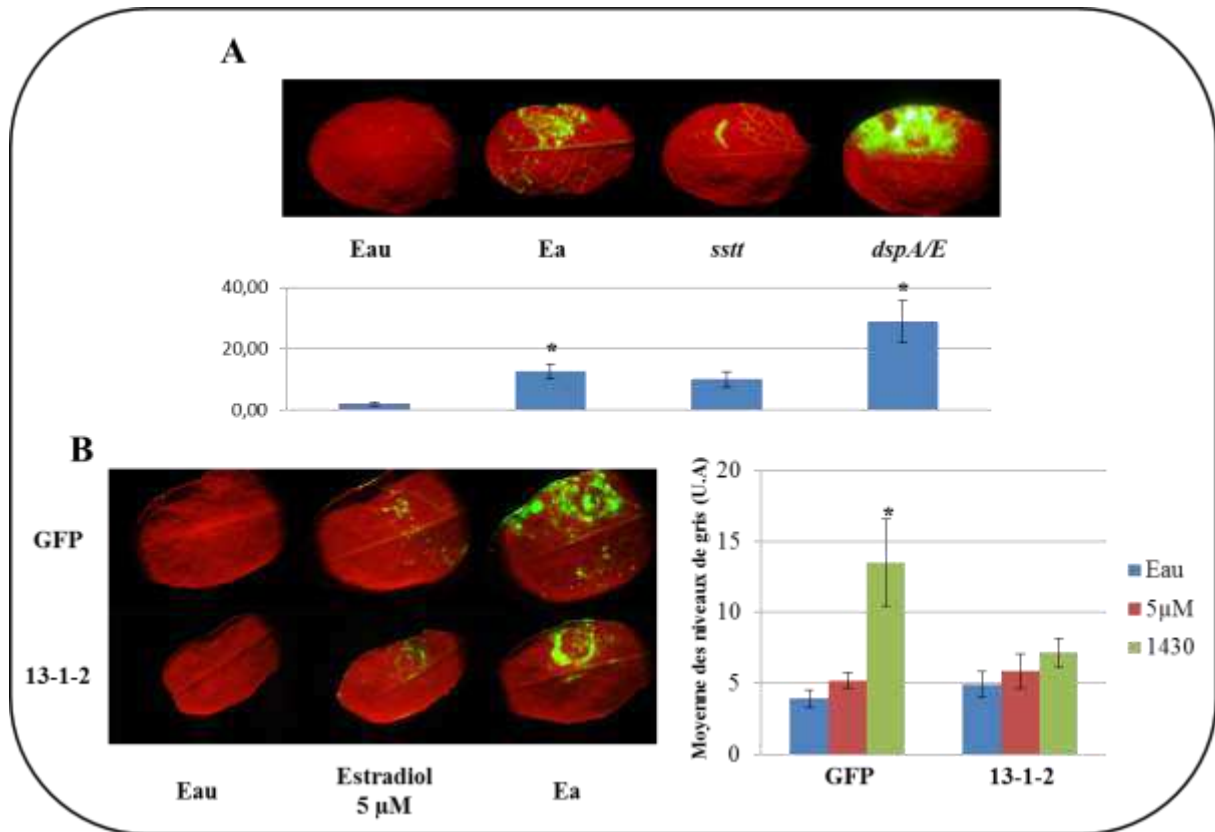
Dans leur étude, Rojas et al., 2012 n'ont pas étudié l'expression de marqueurs de défenses dans le mutant *gox2-2*. Ils ont cependant observé une diminution de l'expression du gène marqueur *PR1* dans les mutants *gox3* et *haox2* en réponse au pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci* mais aucune différence pour le gène marqueur *EDS1*. Ces résultats suggèrent que les voies de défenses mises en place dans le cas de la résistance non-hôte au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* sont différentes de celles mises en place en réponse à *P. syringae* pv. *tabaci*. Il serait intéressant de vérifier l'expression des gènes de défenses chez les autres mutants de glycolate oxydase en réponse à *E. amylovora*. Les auteurs ont ensuite montré que le mutant *gox2-2* inoculé avec le pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci* présente une diminution d' $H_2O_2$  mais une production de cette FAO est toujours constatée. Ces résultats sont cohérents avec le défaut d'accumulation d' $H_2O_2$  observé au niveau de l'apoplaste dans le suppresseur *II-36-1* (cf. chapitre 3-Figure 48) bien que l'accumulation observée au niveau macroscopique dans le mutant *gox2-2* inoculé par *E. amylovora* ne présente pas de différence par rapport au sauvage Col-0. Enfin, Rojas et al., 2012 ont montré que le dépôt de callose dans le mutant *gox2-2* en réponse à *P. syringae* pv. *tabaci* est fortement diminué. Nos résultats montrent au contraire que ce dépôt de callose est plus important dans le mutant *gox2-2*. Précédemment, il a été montré que DspA/E réprime la synthèse de callose sur pommier et lorsqu'elle est induite par les PAMPs de *P. syringae* pv. *tomato* chez *A. thaliana* (DebRoy et al., 2004; Degraeve et al., 2013). Nos résultats montrent que l'activité glycolate oxydase 2 est dépendante de DspA/E. Il est possible que la répression de la synthèse de callose et que la forte accumulation observée dans le mutant *gox2-2* soit due à l'activation de la glycolate oxydase 2 par DspA/E directement pendant l'infection. Il serait intéressant de tester la formation des points de callose dans les suppresseurs induits afin de vérifier si une accumulation plus importante est constatée. Il serait également intéressant de vérifier la déposition de callose dans un double mutant *gox2-2/pmr4* (gène codant une callose synthase) afin de voir si la déposition de callose est dépendante du gène *GOX2*.

Nos résultats sur les réactions de défenses observés chez le mutant *gox2-2* inoculé avec *E. amylovora* sont différents de ceux observés pour le pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci* dans les mutants des gènes codant les glycolate oxydases. Dans les mutants *gox1*, *gox3*, *haox1* et *haox2*, un défaut en termes de production d' $H_2O_2$  est constaté. Il serait intéressant d'étudier la croissance d'*E. amylovora* dans ces mutants ainsi que les différentes réactions de défenses. Une redondance fonctionnelle des gènes *GOX* dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* n'est pas à exclure. Un cas de redondance fonctionnelle a par exemple été constaté chez *A. thaliana* en réponse à *P. syringae* portant le gène d'avirulence *AvrRPT2*. En effet, les défenses au cours de cette interaction impliquent la voie EDS1 et la voie SA. Si les deux voies sont mutées, la bactérie peut se multiplier de nouveau *in planta* (Venugopal et al., 2009). Il est

également possible qu'un effet additif des gènes *GOX* existe chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora* comme il a été constaté par Rojas et al., avec *P. syringae*.







**Figure 42: DspA/E réprime l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire chez *A. thaliana***

(A): Des feuilles de l'écotype Col-0 âgées de 5 semaines ont été infiltrées sur le demi-limbe droit à l'eau ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea), le mutant du système de sécrétion de type 3 (*sstt*) ou le mutant de DspA/E (*dspA/E*).

(B): Des feuilles des lignées GFP et 13-1-2 âgées de 5 semaines ont été infiltrées sur le demi-limbe droit à l'eau ou à l'estradiol 5 μM ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea).

Les feuilles ont été prélevées 16 heures post-inoculation et infiltrées sous-vide avec le DCFH-DA. Les observations sont faites sous une loupe binoculaire avec filtre GFP. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle Eau pour  $p < 0,05$  selon le test de Mann et Whitney sur 9 feuilles par conditions pour trois répétitions biologiques.

## Chapitre III : Rôle du stress oxydant pendant l'infection

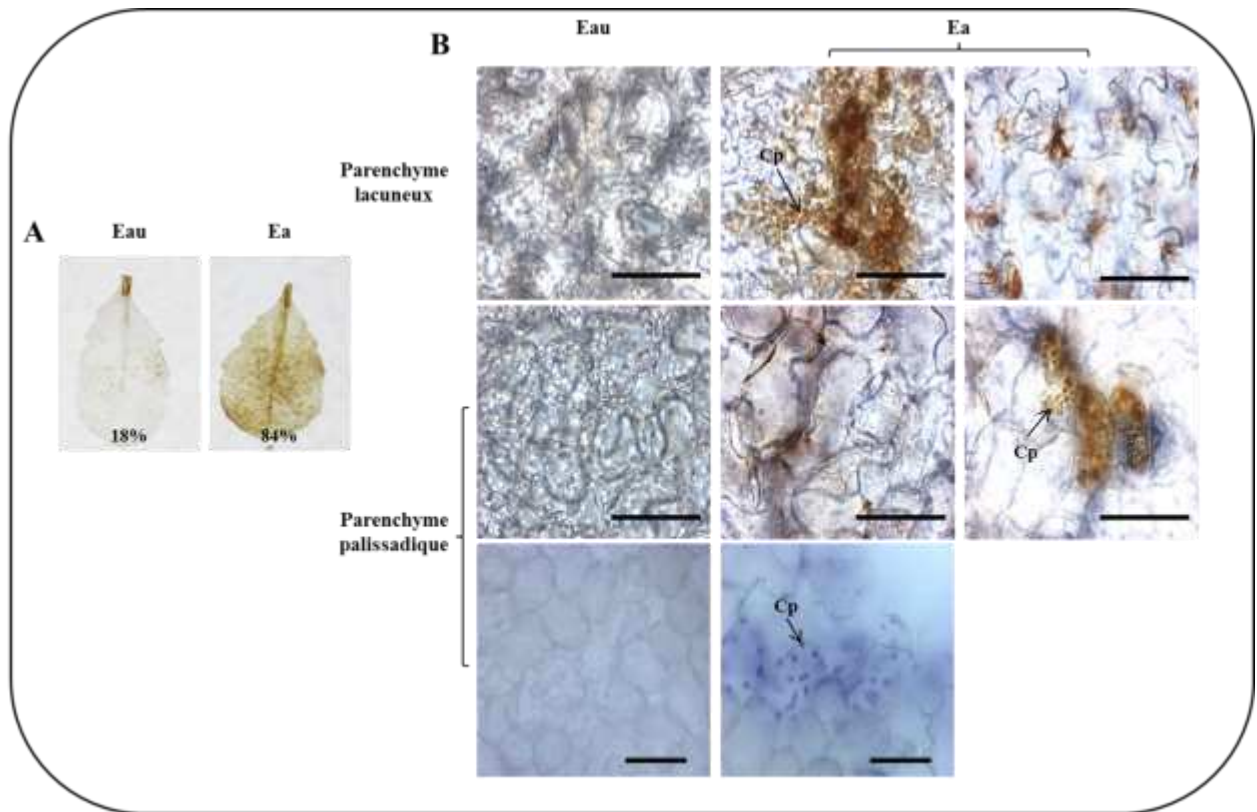
### I. Introduction

L'une des réponses précoces en cas d'attaque des plantes par un agent pathogène est la production de FAOs (Lamb and Dixon, 1997). Dans le cas d'agents pathogènes biotrophes la production de FAOs est souvent associée à de la défense. C'est le cas par exemple de *P. syringae* pv. *tomato*, qui déclenche la production précoce de FAOs permettant de déclencher la HR sur tomate (Torres et al., 2006). Cependant, en réponse à un agent pathogène nécrotrophe, la production de FAOs n'est pas toujours associée à de la défense. Il a été démontré pour l'agent pathogène nécrotrophe *D. dadantii*, qu'un fort burst oxydatif est produit pendant l'interaction avec *A. thaliana* et que ce burst contribue à la défense de la plante (Fagard et al., 2007). En revanche, le pathogène nécrotrophe *B. cinerea* induit la production d' $H_2O_2$  qui est corrélée à la maladie chez *A. thaliana* (VAN Baarlen et al., 2007). De même que la production de cette même FAO chez *N. benthamiana* infecté avec *B. cinerea* contribue au développement de lésions nécrotique (Asai et al., 2010).

La production de FAOs n'est pas uniquement une réponse de défense face à un agent pathogène. En effet, dans le cas d'une symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti* la production de FAOs mesurée à l'aide du DCFH-DA est plus forte et plus longue que pendant une interaction avec des agents pathogènes ou en interaction non-hôte (Peleg-Grossman et al., 2012). Ces résultats indiquent que les FAOs ont un rôle différent selon le type d'interaction avec des microorganismes. Ceci montre le rôle complexe des FAOs au cours d'une interaction.

Sur plante hôte, la bactérie *E. amylovora* induit la formation d'ions superoxyde via son SSTT et est également capable de résister à des concentrations d' $H_2O_2$  10 fois supérieures à la bactérie *P. syringae* pv. *tomato in vitro*. (Venisse et al., 2003). De plus, la bactérie induit l'activité d'enzymes de détoxification des FAOs alors qu'un mutant du SSTT et de DspA/E n'induisent pas cette activité. Les auteurs font l'hypothèse que sur pommier le stress oxydant produit par la bactérie lui permettrait de provoquer la mort des cellules végétales afin de provoquer la maladie pour probablement acquérir des nutriments (Venisse et al., 2003). Etant donné que la bactérie *E. amylovora* est considérée comme une bactérie nécrotrophe et que la production de FAOs en réponse aux agents pathogènes nécrotrophes peut être associée à de la défense ou de la maladie, la question se pose de savoir quel est le rôle de ce stress oxydant dans l'interaction et quel est le rôle de DspA/E sur l'accumulation des FAOs.

Chez *A. thaliana*, *E. amylovora* induit une accumulation de FAOs intracellulaire détectées en DCFH-DA. Cette induction est dépendante d'un système de sécrétion de type 3 fonctionnel (Degraeve et al., 2008). Le rôle de l'effecteur DspA/E vis-à-vis du stress oxydant n'est pas clair sur plante-hôte puisque DspA/E est décrit comme étant un inducteur d'enzymes de détoxification de FAOs sur pommier (Venisse et al., 2003) alors que nos résultats préliminaires indiquent que DspA/E contribue à la réduction de FAOs intracellulaire chez *A. thaliana* (Figure 42A) puisqu'un mutant bactérien *dspA/E* induit plus de stress oxydant par rapport à la souche bactérienne



**Figure 43: Accumulation des FAOs  $H_2O_2$  et  $O_2^-$  pendant l'infection avec *E. amylovora***

(A): Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées à l'eau ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea). Les feuilles ont été prélevées 2 heures post-inoculation et infiltrées sous-vide avec le DAB. Les feuilles ont ensuite été décolorées 16 heures post-inoculation. Les photos sont prises sur une plaque lumineuse. Les pourcentages représentent la part de feuilles marquées.

(B): Des feuilles marquées au DAB et au NBT ont été observées au microscope photonique au niveau de différentes couches de tissus. Barres d'échelle:  $50\mu M$ . (Cp): Chloroplaste. Observations effectuées pour 3 répétitions biologiques.

sauvage. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés avec la lignée transgénique 13-1-2 exprimant DspA/E (Figure 42B). Nous nous sommes intéressés à la nature et au rôle du stress oxydant au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* et au rôle de DspA/E sur la production du stress oxydant.

## II. Résultats

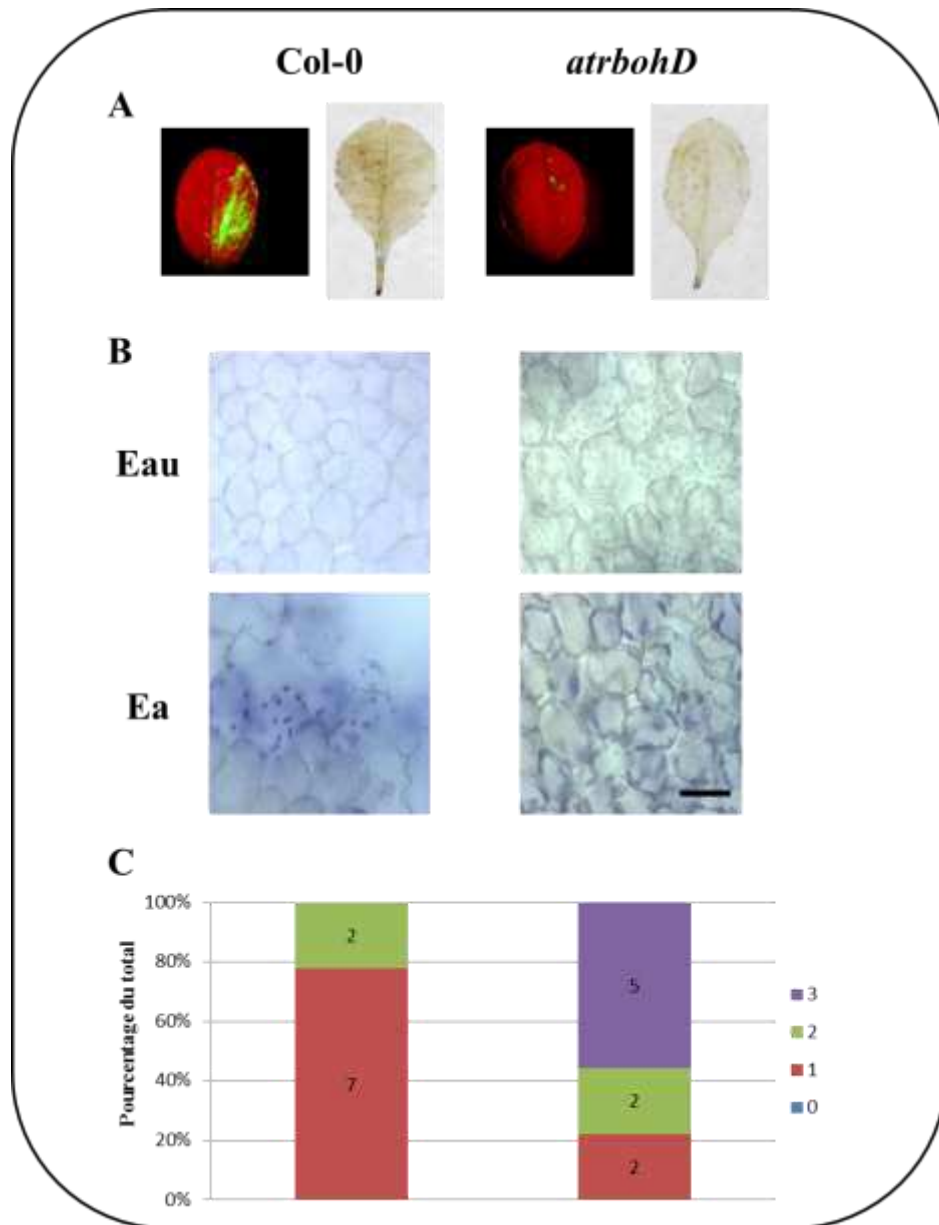
### 1. Phénotype d'accumulation des FAOs chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora*

Nous avons montré précédemment que la bactérie *E. amylovora* induit l'accumulation de FAOs intracellulaires détectées en DCFH-DA chez *A. thaliana* (Degrave et al., 2008) (Figure 42). Cependant, ce composé est internalisé dans la cellule et est désestérifié en DCF qui lui est par la suite oxydé par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et par les espèces nitrosylées comme les ions peroxy-nitrites ( $\text{ONOO}^-$ ) en DCF fluorescent. Certaines enzymes du stress oxydant ne sont pas localisées à l'intérieur de la cellule végétale, c'est le cas de la NADPH oxydase qui est située sur la membrane plasmique du côté de l'apoplaste permet l'oxydation du dioxygène en ions superoxyde (Mahalingam and Fedoroff, 2003). C'est pour ces raisons que nous avons utilisé d'autres composés afin d'étudier la production de FAOs en réponse à *E. amylovora*. Nous avons utilisé le Diaminobenzidine (DAB) et le Nitrobluetetrazolium (NBT) qui détectent respectivement l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  intra et extracellulaire.

Une large proportion (84%) de feuilles infectées par *E. amylovora* présente une accumulation de précipité brun qui révèle la présence de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  alors que seules 18% des feuilles infiltrées à l'eau montrent une très légère accumulation de précipité brun qui n'atteint jamais l'intensité des feuilles infectées avec la bactérie (Figure 43A). L'observation au microscope de ces feuilles montre que le précipité brun s'accumule dans les parenchymes palissadique et lacuneux, dans des groupes de cellules et à la périphérie des cellules au niveau de l'apoplaste. Dans les cellules, certaines structures rondes sont marquées. La taille et le nombre de ces structures suggère que le DAB s'accumule dans les chloroplastes (Cp). Ces résultats indiquent que la FAO  $\text{H}_2\text{O}_2$  s'accumule au cours de l'infection et ce dans plusieurs couches et compartiments cellulaires.

Concernant le marquage au NBT, nous n'avons pas pu observer de marquage au niveau macroscopique. De ce fait, nous avons observé à l'échelle microscopique que dans les feuilles infectées par *E. amylovora*, le marquage était présent. Ce marquage apparaît dans les cellules du parenchyme palissadique et de façon équivalente au DAB, le NBT s'accumule dans le même type de structures rondes suggérant ainsi que le NBT s'accumule dans les chloroplastes. Ces résultats indiquent que les ions superoxyde s'accumulent au cours de l'infection entre *A. thaliana* et *E. amylovora* et ce probablement uniquement dans les chloroplastes.

Suite à nos observations, nous avons analysé dans nos données de transcriptome de plantes inoculées avec *E. amylovora* sauvage, la modulation de gènes qui ont été décrits



**Figure 44: Le gène *AtrbohD* est requis pour la production de la FAO  $H_2O_2$  mais pas  $O_2^-$  et il limite l'intensité des symptômes**

(A, B et C): Des feuilles de l'écotype Col-0 âgées de 5 semaines ont été inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora*. Résultats effectués sur 9 feuilles pour 3 répétitions biologiques.

(A): Les feuilles ont été prélevées 2 heures post-inoculation pour être infiltrées au DAB, 16 heures pour le DCFH-DA. Les observations sont faites sous une loupe binoculaire avec filtre GFP pour le DCFH-DA.

(B): Les feuilles ont été infiltrées au NBT 16 heures post-inoculation. Les observations sont faites au microscope photonique. Barre d'échelle: 50 $\mu$ M.

(C): Les symptômes ont été relevés 5 jours post-inoculation. L'échelle des symptômes est comprise entre 0 et 3, 0 étant aucun symptôme et 3 étant une nécrose complète de la feuille (cf. Degraeve et al., 2008).

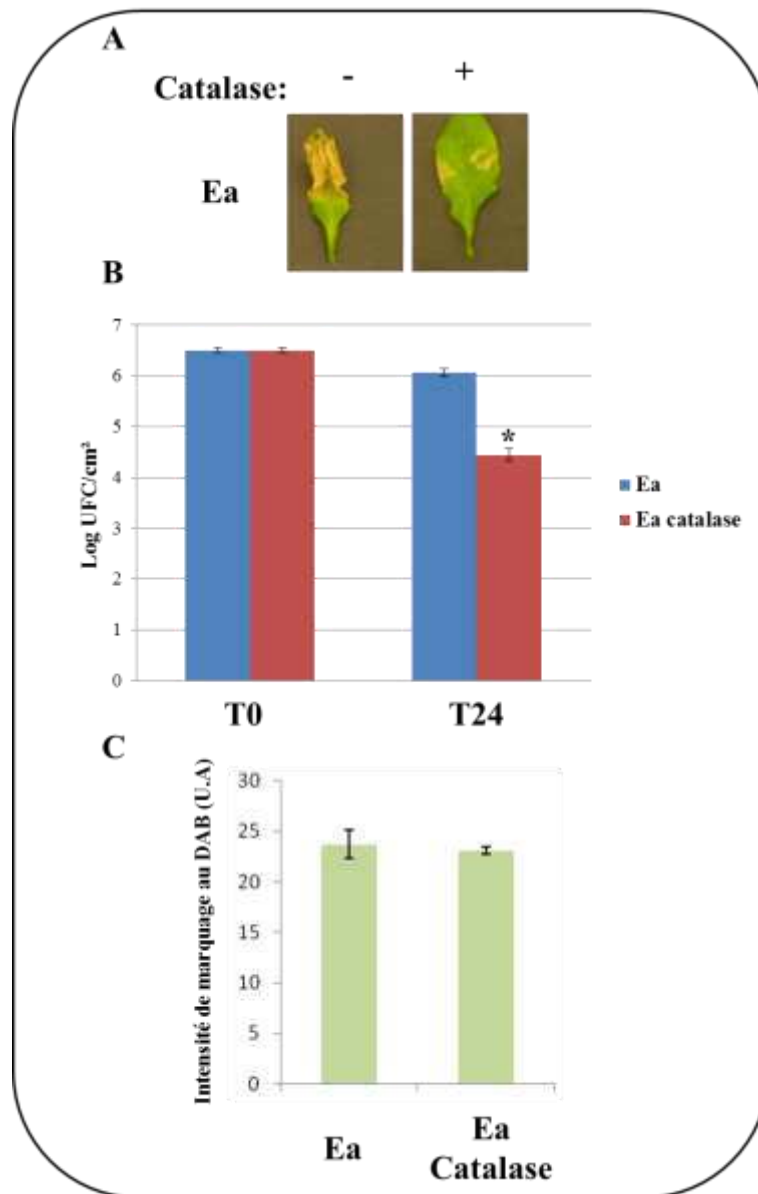
précédemment comme modulés par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^-$  (Tosti et al., 2006). Parmi les 44 gènes modulés, 31 sont induits par *E. amylovora*. 5 des 11 gènes réprimés par l' $\text{O}_2^-$  et/ou l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sont réprimés par la bactérie. Les gènes AT5G53120 et AT2G25000 qui codent respectivement la spermidine synthase et le facteur de transcription WRKY60 sont induits suite à l'infection par la bactérie mais réprimés suite au traitement par les FAOs (Annexe 5). L'ensemble de ces résultats montre que différentes FAOs s'accumulent au cours de l'infection et que le stress oxydant est largement impliqué au cours de l'interaction. Ces résultats suggèrent que la réponse transcriptionnelle d'*A. thaliana* à *E. amylovora* correspond à une réponse d'induction du stress oxydant.

## 2. Rôle du gène *AtrbohD* au cours de l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*

Le gène *AtrbohD* d'*A. thaliana* code une NADPH oxydase qui est impliquée dans la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène. Ce gène est nécessaire pour l'accumulation de FAOs pendant l'infection avec des pathogènes virulents comme *B. cinerea*. (Galletti et al., 2008) ou *D. dadantii* (Fagard et al., 2007). Ce gène est également nécessaire pour l'accumulation de FAOs pendant l'interaction entre *A. thaliana* et un agent pathogène avirulent (Torres et al., 2005; Marino et al., 2012). En 2012, Rojas et al, ont montré que la NADPH oxydase *AtrbohD* et la glycolate oxydase fonctionnent indépendamment au cours de l'interaction entre le pathogène non-adapté *P. syringae* pv. *tabaci* et *A. thaliana* et contribueraient tous les deux à la production de FAOs. La bactérie *E. amylovora* étant un pathogène non-adapté d'*A. thaliana* induisant des FAOs au cours de l'interaction et la glycolate oxydase étant impliquée au cours de l'interaction, nous nous sommes interrogés sur le rôle de la NADPH oxydase *AtrbohD* au cours de l'interaction.

Nous avons inoculé des plantes d'*A. thaliana* de l'écotype Col-0 sauvage ou mutées dans le gène *AtrbohD*. Nous avons étudié les différentes FAOs accumulées chez ce mutant. Enfin, nous avons étudié les symptômes chez ce mutant infecté. Les premiers tests de mise en évidence des FAOs ont été effectués avec du DCFH-DA (Fagard, Patrit, non-publié). La Figure 44A montre que le mutant *atrbohD* n'accumule plus d' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire lorsqu'il est infecté par la souche sauvage d'*E. amylovora* contrairement à Col-0. Ces résultats sont confirmés par les tests effectués avec le DAB (Figure 44A). En effet, le mutant *atrbohD* ne présente pas de formation de précipité brun traduisant une accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire lorsqu'il est infecté avec la souche bactérienne sauvage contrairement à Col-0. Ces résultats montrent que le gène *AtrbohD* est impliqué dans l'accumulation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  au cours de l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*. Nous avons également analysé l'accumulation des ions superoxyde chez le mutant *atrbohD* (Figure 44B). Le mutant *atrbohD*, lorsqu'il est infecté avec la souche sauvage d'*E. amylovora*, accumule les ions superoxyde au même titre que Col-0 infecté. Ce résultat montre que le gène *AtrbohD* n'est pas requis pour l'accumulation des ions superoxyde en réponse à *E. amylovora*. Les analyses de symptômes présentées en Figure 44C montrent que le mutant *atrbohD* présente plus de symptômes que le contrôle Col-0. Ces observations ont été confirmées en utilisant un inhibiteur des NADPH oxydases, le Diphénylène iodonium c'est-à-dire que plus de symptômes sont observés en présence de cet inhibiteur (Résultats non présentés).





**Figure 45: La catalase limite la croissance d'*E. amylovora* in planta**

(A, B, C): Des feuilles de l'écotype Col-0 âgées de 5 semaines ont été inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea) avec ou sans catalase. Résultats effectués sur 9 feuilles pour 2 répétitions biologiques. (A): Les feuilles ont été prélevées 5 jours post-inoculation pour être photographiées.

(B): Les feuilles ont été prélevées 24 heures post-inoculation et le nombre d'unité formant colonie ont été comptées (UFC). L'astérisque indique une différence significative pour  $p < 0.05$  selon le test de Mann et Whitney.

(C): Les feuilles ont été infiltrées sous-vide avec le DAB 2 heures post-inoculation et décolorées 16 heures post-inoculation



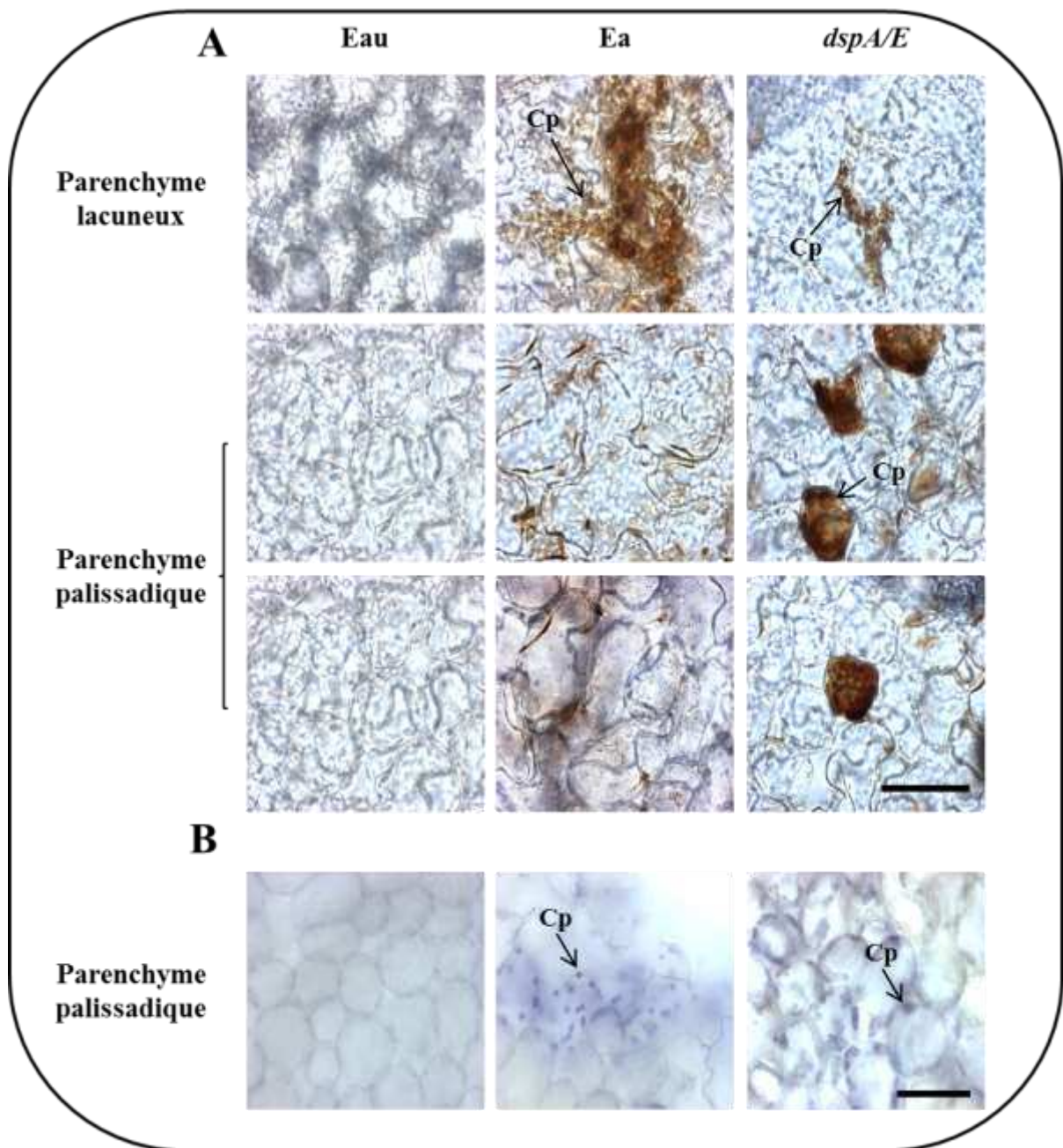
Ces résultats indiquent que le gène *AtrbohD* contribue à la réduction des symptômes en réponse à *E. amylovora* chez *A. thaliana*. L'ensemble de ces résultats montrent que le gène *AtrbohD* est nécessaire à l'accumulation d' $H_2O_2$  et à la réduction de symptômes nécrotiques.

### 3. Le traitement à la catalase limite la croissance d'*E. amylovora in planta*

La souche sauvage d'*E. amylovora* induit l'accumulation d' $H_2O_2$  (Figure 42 et Figure 43), cependant, le rôle de cette FAO au cours de l'interaction demeure inconnu. La question est de savoir si la bactérie *E. amylovora* utilise le stress oxydant à son avantage comme il a été proposé sur plante hôte (Venisse et al., 2003). Ou alors à l'inverse, si la bactérie provoque l'accumulation de FAOs qui vont empêcher sa multiplication et sa propagation. La catalase est une enzyme qui clive l' $H_2O_2$  en molécules de dioxygène et d'eau. Cette enzyme se retrouve chez un grand nombre de bactéries Gram négatives, la catalase leur permettant d'éliminer l' $H_2O_2$  environnant. En effet, il a été montré que la production de catalases par *P. syringae* pv. *tomato* est nécessaire à son pouvoir pathogène (Jia et al., 2010; Guo et al., 2012) et le traitement à la catalase de cellules de laitue par l'agent pathogène incompatible *P. syringae* pv. *phaseolicola* supprime l' $H_2O_2$  produit de manière locale au niveau des cellules adjacentes à la bactérie empêchant ainsi à l' $H_2O_2$  de jouer son rôle antimicrobien (Bestwick et al., 1997). Ces résultats montrent que la catalase a un rôle bénéfique pour ces bactéries.

Nous nous sommes interrogés sur l'effet de l'utilisation de la catalase au cours de l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*. Pour cela, nous avons effectué des expériences d'inoculation de suspensions de la bactérie sauvage contenant de la catalase. Nous avons dans un premier temps vérifié si la catalase mélangée avec la suspension bactérienne avait un effet sur la croissance d'*E. amylovora*. Pour cela, plusieurs suspensions bactériennes supplémentées avec différentes concentrations en catalase ont été cultivées en milieu LB liquide pendant 24 heures. Des dilutions sériées ont été effectuées et déposées sur milieu LB. Les résultats montrent qu'aux temps 16 heures et 24 heures la catalase n'a pas d'effet sur la bactérie (Annexe 6).

Dans un second temps, nous avons déterminé l'effet de la catalase *in planta*. Pour cela, nous avons co-inoculé *E. amylovora* avec de la catalase puis nous avons mesuré la croissance bactérienne à 24 heures post-inoculation et observé les symptômes 5 jours post-inoculation. Lorsque la plante est co-inoculée par *E. amylovora* et la catalase, il y a une nette diminution des symptômes par rapport aux feuilles inoculées avec la bactérie seule (Figure 45A). Ce résultat indique que la catalase limite la nécrose provoquée par *E. amylovora* sur *A. thaliana*. La Figure 45B indique que dans cette expérience la population bactérienne s'est maintenue dans la plante au bout de 24 heures. Par contre lorsque la bactérie est co-inoculée avec de la catalase une diminution de 1.5 log est observée. Ceci indique que la catalase limite la survie de la bactérie *in planta*. Nous avons vérifié si la quantité d' $H_2O_2$  était diminuée lorsque la plante est infectée avec la bactérie et la catalase. La Figure 45C montre qu'il n'y a pas de différences entre les plantes infectées avec la souche bactérienne sauvage et les plantes co-infectées avec la bactérie sauvage et de la catalase. L'ensemble de ces résultats indique que la catalase limite la multiplication et la propagation d'*E. amylovora in planta*. Le contenu en  $H_2O_2$  n'est pas diminué globalement, il est toutefois possible qu'une diminution apoplastique se fasse en présence de la catalase.



**Figure 46: Analyse de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^-$  en réponse à un mutant *dspA/E*.**

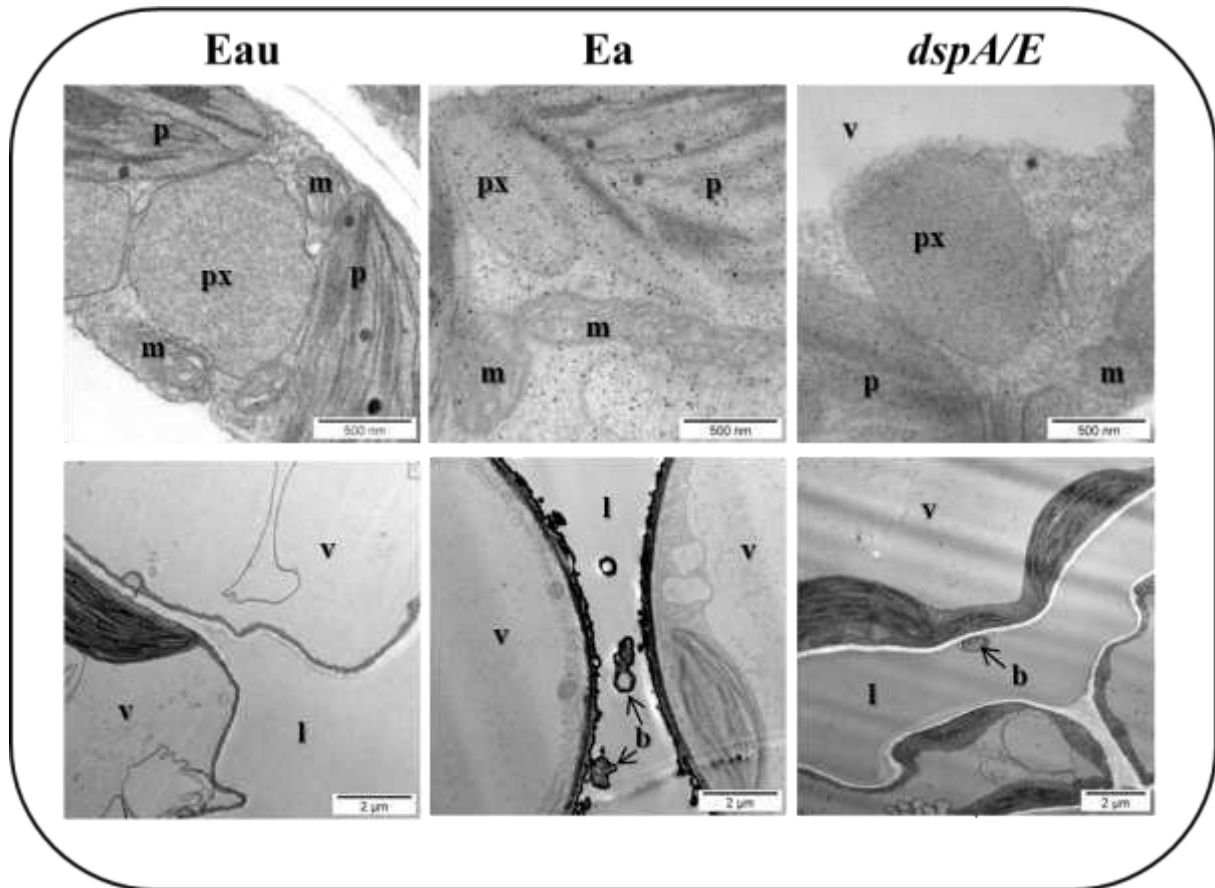
(A,B): Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées sur le demi-limbe droit à l'eau ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea) ou la souche du mutant de DspA/E (*dspA/E*). Les feuilles ont été observées par la suite au microscope photonique au niveau de différentes couches de tissus. Barres d'échelle: 50 $\mu\text{M}$ . (Cp): Chloroplaste. Observations effectuées pour 3 répétitions biologiques (A): Les feuilles ont été prélevées 16 heures post-inoculation et infiltrées sous-vide avec le DAB 2 heures post-inoculation.

(B): Les feuilles ont été infiltrées au NBT.

#### 4. Accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$ et d' $\text{O}_2^-$ en réponse au mutant *dspA/E*

La souche sauvage d'*E. amylovora* induit l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^-$  au cours de l'infection (Degrave et al., 2008). Afin de savoir si cette accumulation est dépendante de l'effecteur DspA/E, des feuilles d'*A. thaliana* ont été inoculées avec la souche mutante de *dspA/E*. La Figure 46A montre que la souche mutante de *dspA/E* provoque l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans des cellules isolées du parenchyme lacuneux et dans le parenchyme palissadique. Cette accumulation est observée dans le même type de structures rondes que la souche sauvage. Cependant, l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans l'apoplaste n'a pas été constatée contrairement à la souche sauvage. Ces résultats montrent que la souche mutante de *dspA/E* induit l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les mêmes compartiments que la souche sauvage excepté pour l'apoplaste.

Les observations concernant le marquage au NBT conduisent à la même conclusion. En effet, le précipité bleu indiquant la présence d'ions superoxyde s'accumule dans les structures rondes apparentées aux chloroplastes dans les cellules du parenchyme palissadique (Figure 46B). Ces résultats montrent que la souche mutante de *dspA/E* accumule l' $\text{O}_2^-$  de la même façon que la souche sauvage.



**Figure 47: l'  $H_2O_2$  s'accumule dans différents compartiments cellulaires**

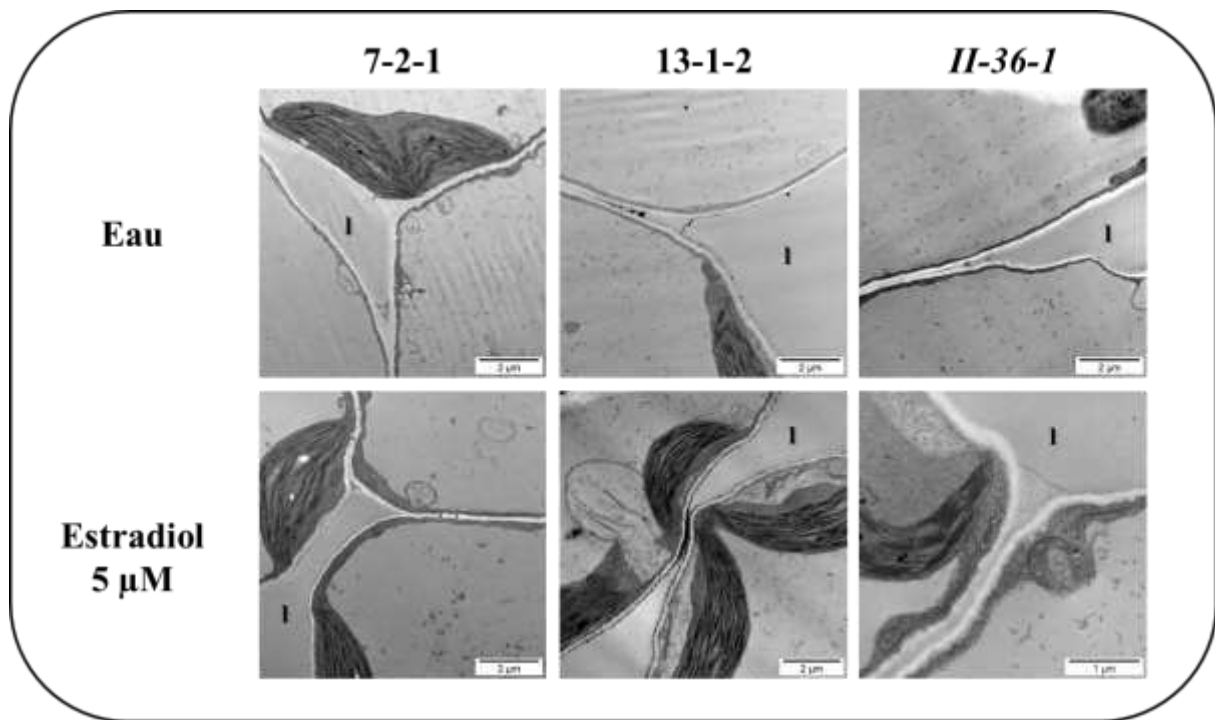
Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées à l'eau ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* (Ea) ou la souche mutante de DspA/E (*dspA/E*). Des fragments de tissus ont été prélevés 24 heures post-inoculation et infiltrés sous-vide avec le chlorure de cérium. Les fragments de tissus sont ensuite fixés au tétraoxyde d'osmium, inclus en résine et coupés à l'ultramicrotome pour être observé au microscope électronique à transmission. (p): plaste; (m): mitochondrie; (px): peroxyosome; (v) : vacuole; (l): lacuneux; (b): bactérie.

Les observations en microscopie photonique présentent une limite technique quant à l'observation de la localisation précise des polymères brun ou bleu traduisant l'accumulation des FAOs  $H_2O_2$  et  $O_2$ . Afin de passer ces limites techniques, nous avons décidé de réaliser un marquage au chlorure de cérium qui permet de mettre en évidence l'accumulation d'  $H_2O_2$  par formation d'un précipité noir observable en microscopie électronique à transmission. Ce marquage a permis d'observer la compartimentation de l'  $H_2O_2$  dans des feuilles d'*A. thaliana* infectées avec *E. amylovora* ou un mutant de *dspA/E*.

Les feuilles infiltrées à l'eau, ne présentent aucun marquage (Figure 47). Pour la souche sauvage d'*E. amylovora*, un marquage au chlorure de cérium est observé et il se présente de manière diffuse dans les peroxysomes, les chloroplastes, le cytosol et très légèrement dans les mitochondries. Des compartiments comme la vacuole et le noyau ne sont pas marqués au même titre que les tissus infiltrés à l'eau. Les espaces intercellulaires sont fortement marqués au chlorure de cérium. Des bactéries ont été de plus observées au sein du parenchyme lacuneux et le plus souvent plaquées contre les parois des cellules. Ces bactéries sont d'ailleurs entourées d'une épaisse couche de chlorure de cérium.

Comme attendu, une formation de précipités noirs traduisant l'accumulation d'  $H_2O_2$  est observée pour la souche mutante de *DspA/E*. Cette accumulation se retrouve dans les chloroplastes, le cytosol, les peroxysomes et légèrement dans les mitochondries mais à moindre mesure comparé à la souche sauvage. De plus, les bactéries présentes dans le parenchyme lacuneux ne sont pas entourées de précipités noirs et la paroi des cellules du parenchyme lacuneux ne présente pas de marquage à l'instar de la souche sauvage. Ceci indique que le mutant *dspA/E*, n'est plus capable d'induire l'accumulation d'  $H_2O_2$  apoplastique contrairement à la souche sauvage. L'ensemble de ces résultats suggère que *DspA/E* serait un inducteur de l'accumulation d'  $H_2O_2$  apoplastique (Figure 47).



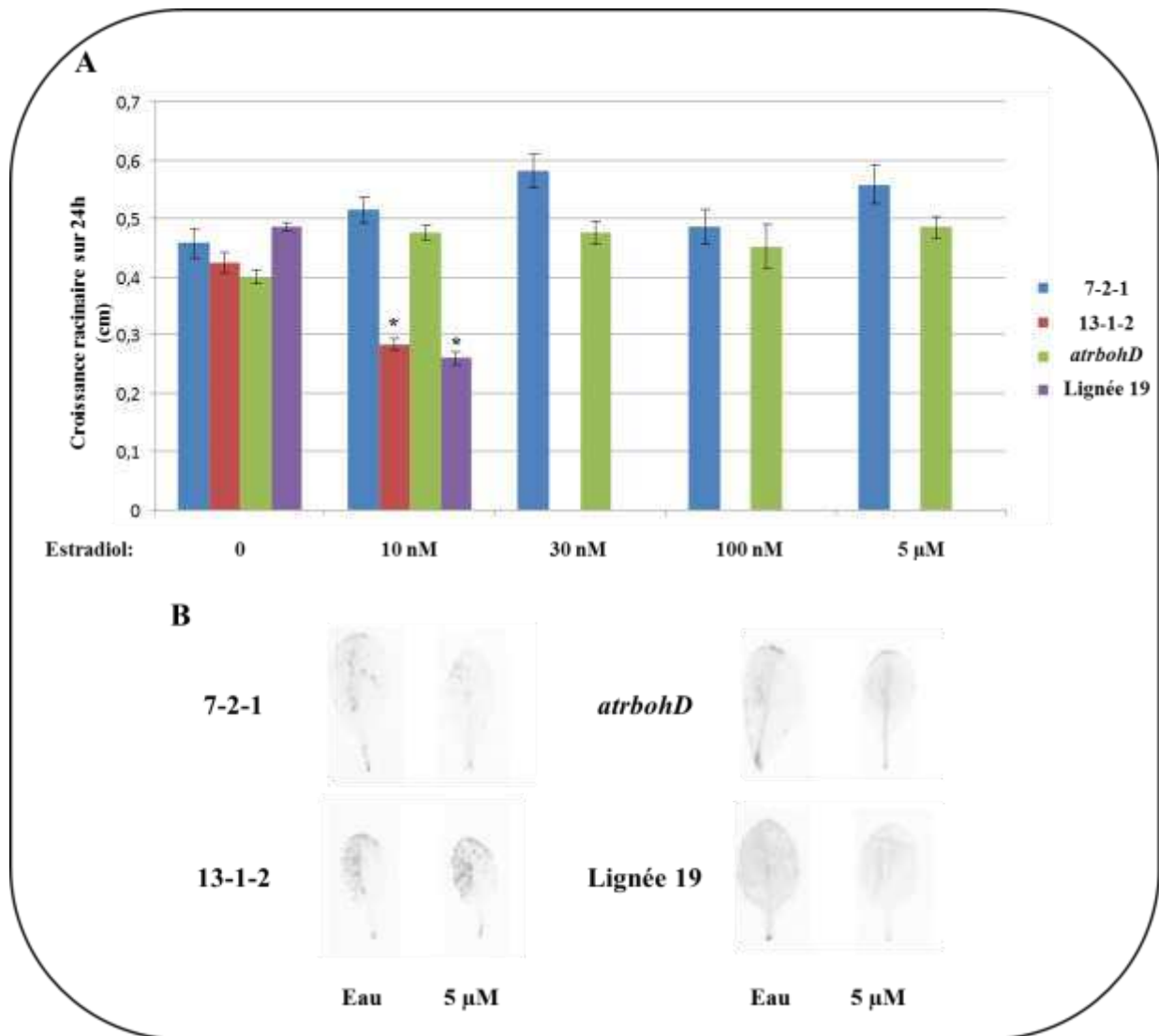


**Figure 48: DspA/E induit l'accumulation d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoplastique**

Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées à l'eau ou avec de l'estradiol à 5 μM. Des fragments de tissus ont été prélevés 24 heures post-inoculation et infiltrés sous-vide avec le chlorure de cérium. Les fragments de tissus sont ensuite fixés au tétroxyde d'osmium, inclus en résine et coupés à l'ultramicrotome pour être observé au microscope électronique à transmission. (l): lacuneux.

Ces résultats ont été confirmés par les observations en microscopie électronique à transmission sur des fragments de feuilles traités au chlorure de cérium des lignées 7-2-1, 13-1-2 et du suppresseur *II-36-1* (Figure 48). Un léger marquage traduit par la formation de grains noirs est observé dans le contrôle Eau pour la lignée 13-1-2 au niveau de l'apoplaste qui n'est pas observé pour la lignée 7-2-1 et le suppresseur *II-36-1*. Le marquage est bien plus important à 5  $\mu\text{M}$  pour la lignée 13-1-2. Ce marquage n'est pas observé pour la lignée 7-2-1 et le suppresseur *II-36-1* à la même concentration. Ceci confirme que DspA/E induit la formation de la FAO  $\text{H}_2\text{O}_2$  au niveau de l'apoplaste et que sa toxicité pourrait être liée à la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la paroi.





**Figure 49: La mutation *atrbohD* n'affecte pas la toxicité de DspA/E**

(A): Des plantules de 6 jours ont été cultivées sur milieu MS 1% de sucrose puis traitées ou non à l'estradiol aux concentrations indiquées. La croissance racinaire est mesurée 24 heures après traitement à l'estradiol. 13-1-2= lignée DspA/E ; Lignée 19= 13-1-2 x *atrbohD*. Les astérisques représentent une différence significative pour  $p < 0.05$  selon le test de Mann et Whitney.

(B): Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées ou non (Eau) avec de l'estradiol (5μM). Les feuilles ont été prélevées 2 heures post-inoculation et infiltrées sous-vide avec le DAB. Les feuilles ont ensuite été décolorées 16 heures post-inoculation. Les photos sont prises sur une plaque lumineuse et passées en noir et blanc pour une meilleure visibilité.

(A, B): Les mêmes résultats ont été obtenus pour 2 répétitions biologiques.

## 5. Rôle du gène *AtrbohD* sur la toxicité de DspA/E

Nous avons observé précédemment que le gène *AtrbohD* est nécessaire pour l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* (Figure 40). Cependant, son rôle vis-à-vis de l'effecteur DspA/E demeure inconnu. L'effet toxique de DspA/E passe-t-il par une activation de la NADPH oxydase? Ou au contraire la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  via la NADPH oxydase est-elle indépendante de DspA/E.

Afin de répondre à cette question, nous avons croisé la lignée 13-1-2 avec le mutant *atrbohD*. Des tests permettant de vérifier si la toxicité de DspA/E dans ce croisement était modifiée ont été effectués.

Dans un premier temps, la sensibilité des F1 issues du croisement entre la lignée 13-1-2 portant DspA/E et le mutant *atrbohD* sur estradiol a été vérifiée et confirmée sur 30 nM et 5  $\mu\text{M}$  (Résultats non présentés). La descendance F2 a ensuite été récupérée et génotypée par PCR afin d'identifier des individus double homozygotes pour DspA/E et la mutation *atrbohD*. Deux lignées double homozygotes nommées 9 et 19 ont été isolées (Jeoren Stellingwerf-Rapport de stage). Un test d'élongation racinaire a été effectué sur ces deux lignées avec différentes concentrations en estradiol et un test en DAB a également été effectué. La Figure 49 présente les résultats d'élongation racinaire et de DAB pour la lignée 19.

Sur la Figure 49A, la lignée contrôle 7-2-1 portant la GFP ne présente aucune différence en terme de croissance racinaire selon la concentration en estradiol utilisée. C'est également le cas pour le mutant *atrbohD*, sa croissance n'est pas affectée par l'estradiol. La lignée contrôle 13-1-2 portant DspA/E, présente une diminution de la croissance racinaire dès 10 nM. A partir de 30 nM la croissance racinaire de cette même lignée est complètement inhibée, ainsi que pour les concentrations plus élevée 100 nM et 5  $\mu\text{M}$ . La lignée 19 présente exactement le même phénotype que la lignée 13-1-2, une diminution de la croissance dès 10 nM et un arrêt total de croissance à partir de 30 nM. Ces résultats indiquent que la mutation *atrbohD* n'affecte pas la toxicité de DspA/E sur la croissance racinaire.

Sur la Figure 49B, la lignée contrôle 7-2-1 portant la GFP ne présente aucune différence en terme de formation de précipité brun après infiltration à l'eau et à l'estradiol. La lignée contrôle 13-1-2 portant DspA/E, présente quant à elle une formation de précipité brun traduisant l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 5  $\mu\text{M}$ . Le mutant *atrbohD* et la lignée 19 ne présente quant à eux aucune formation de précipité brun. Ces résultats montrent que la NADPH oxydase est responsable de l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  induit par DspA/E.

## 6. Discussion

### *Localisation des FAOs*

Nos résultats de DAB et de DCFH-DA montrent que la souche sauvage d'*E. amylovora* induit l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  apoplastique et intracellulaire chez *A. thaliana*. Le chlorure de cérium nous a permis de montrer que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire s'accumule dans le cytoplasme, les peroxysomes, les chloroplastes et les mitochondries (Figures 43, 44 et 47). De plus, la souche sauvage d'*E. amylovora* induit l'accumulation d'ions superoxyde dans des structures qui pourraient être des chloroplastes. L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de localiser les FAOs chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora*.

### *Importance de la NADPH oxydase*

Nous avons montré que la source principale de production des FAOs au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* est la NADPH oxydase codée par le gène *AtrbohD*. En effet, l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire et intercellulaire détectée grâce au DCFH-DA et au DAB chez Col-0 ne l'est plus chez le mutant *atrbohD* infecté par *E. amylovora* (Figure 44 et résultats non présentés). La NADPH oxydase est donc nécessaire à la formation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire accumulé au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*.

En réponse à l'infection par *E. amylovora*, les ions superoxyde sont induits chez le mutant *atrbohD* comme chez Col-0, dans des structures probablement chloroplastiques. Ceci montre que la NADPH oxydase n'est pas nécessaire à l'accumulation de ces ions dans ces structures intracellulaires. D'après Foyer et Noctor, 2013, les sources de production d'ions superoxyde chez les plantes se situent au niveau des photosystèmes I et II. Cette source d'ions superoxyde est notamment fortement induite en réponse à *P. syringae* avirulent (Grosskinsky et al., 2012) et leur rôle au cours d'une interaction avec un pathogène avirulent serait de provoquer une HR (Apel and Hirt, 2004). L'ensemble de ces études suggèrent que les ions superoxyde induits par *E. amylovora* auraient un rôle positif dans la défense d'*A. thaliana*.

Des mesures de croissance d'*E. amylovora* ont été effectuées chez le mutant *atrbohD* et aucune différence n'a pu être mise en évidence entre Col-0 et le mutant *atrbohD* (Fagard-non publié). Cependant, la bactérie *E. amylovora* provoque plus de symptômes de nécrose chez le mutant *atrbohD* comparativement à Col-0. Ces résultats sont cohérents avec les études de Torres et al., 2002, 2005 qui montrent que la NADPH oxydase joue un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire. En effet, un double mutant d'*A. thaliana atrbohD/lsd1* inoculé soit par l'agent pathogène avirulent *P. syringae* DC3000 AvrRPM1 soit par l'agent pathogène virulent *B. cinerea* présente une augmentation de l'étendue de la mort cellulaire. De plus, le simple mutant *lsd1* présente une augmentation de l'étendue des symptômes dans le cas d'une HR, indiquant que LSD1 est nécessaire au contrôle de la HR. Cette étendue de mort cellulaire amplifiée chez le double mutant *atrbohD/lsd1* est diminuée chez le double mutant complémenté avec le gène *AtrbohD*. Les auteurs concluent que la NADPH oxydase contrôle l'étendue de la mort cellulaire grâce aux FAOs générés par *AtrbohD*. Au regard de ces résultats et de nos résultats, le rôle de la

NADPH oxydase au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* serait de limiter la propagation de la mort cellulaire provoquée par la bactérie grâce à la génération de FAOs.

### ***Rôle de DspA/E dans la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>***

Nous avons montré que le mutant bactérien *dspA/E* induit une accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire moins importante que la souche sauvage comme l'atteste les résultats de DAB (Figure 42). Les observations en microscopie électronique confirment ces résultats. En effet, après infection avec le mutant bactérien *dspA/E*, la formation de précipités noirs traduisant l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est observée, que ce soit au niveau du cytoplasme, des mitochondries, des peroxysomes ou des chloroplastes comparativement à la souche sauvage d'*E. amylovora*.

Nous avons confirmé le rôle de DspA/E dans l'induction de l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une coloration au DAB, révélant la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chez une lignée transgénique 13-1-2 exprimant DspA/E. De plus, l'analyse du croisement entre la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E et le mutant *atrbohD* indique que l'induction de l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par DspA/E nécessite la NADPH oxydase.

Nos observations réalisées en DCFH-DA sont en apparente contradiction avec les observations réalisées en DAB et chlorure de cérium. En effet, le marquage au DCFH-DA est plus important après infection avec le mutant *dspA/E*. Cependant, le DCFH-DA permet de détecter non seulement l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais aussi certaines espèces nitrosylées telles que les ions peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Crow, 1997; Curtin et al., 2002). Les différences de résultats observés ne sont donc pas nécessairement incohérentes. Ces résultats pourraient suggérer donc que le stress oxydant mesuré à l'aide du DCFH-DA sur plantes infectées par le mutant *dspA/E*, serait à la fois une mise en évidence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais également d'espèces nitrosylées intracellulaires.

### ***Les espèces nitrosylées sont-elles produites au cours de l'interaction?***

Les résultats d'analyse des FAOs produits chez *A. thaliana* en réponse au mutant *dspA/E* suggèrent que des espèces nitrosylées pourraient être accumulées au cours de l'infection. Il serait donc important de vérifier au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* si des espèces nitrosylées sont accumulées. Afin de déterminer quelles espèces nitrosylées pourraient être accumulées en réponse à la bactérie, il serait intéressant de co-inoculer *E. amylovora* avec un chélateur du NO, le CPTIO, puis d'observer si une fluorescence est toujours détectée en présence du DCFH-DA. Il est également possible d'utiliser une sonde autre que le DCFH-DA pour quantifier directement le produit d'oxydation du NO (le N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) comme la Diaminorhodamine-4M.

Les espèces nitrosylées pourraient avoir un rôle majeur au cours de l'interaction. Il a par exemple été montré que le NO est produit de manière significative en réponse à un traitement par des PAMPs et à certains agents pathogènes (Lamotte et al., 2004; Melotto et al., 2006). De plus, le NO joue un rôle régulateur sur différentes composantes de la signalisation et est impliqué dans la mise en place de la HR (Wimalasekera et al., 2011; Sun and Li, 2012). Dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*, il a été montré que le double mutant d'*A. thaliana* de la nitrate réductase (*nia1nia2*) présente plus de symptômes que chez le sauvage Col-0 (Fagard,

non publié). De plus, la quantité de NO chez ce double mutant est diminuée en réponse à l'infection par *P.syringae* pv. *maculicola*, empêchant ainsi la HR de se mettre en place (Modolo et al., 2006). Ces résultats pourraient donc suggérer que le NO serait impliqué dans la défense d'*A. thaliana* suite à l'infection par *E. amylovora*. Ainsi, l'étude des espèces nitrosylées au cours de l'interaction permettrait de mieux comprendre le rôle du stress oxydant.

Nous avons montré que la catalase limite la croissance d'*E. amylovora*, ceci étant corrélé avec une diminution des symptômes (Figure 45). Ces résultats indiquent que la catalase limite la multiplication de la bactérie dans la plante. Comme la catalase permet la dissociation de l' $H_2O_2$  en eau et dioxygène, on pourrait donc s'attendre à une diminution de l'accumulation d' $H_2O_2$  induite par *E. amylovora* dans les plantes co-infiltrées avec la catalase. Or, nos résultats ne montrent pas de différence macroscopique entre des feuilles infectées par la bactérie et des feuilles co-infiltrées avec la bactérie et la catalase. Il serait donc intéressant de vérifier en microscopie électronique si le stress oxydant au niveau des espaces intercellulaire est supprimé par la catalase.

Nous avons également utilisé le DCFH-DA qui permet de visualiser la formation de FAOs intracellulaires 16 heures post-inoculation. A notre grande surprise, la simple infiltration de la catalase dans les feuilles provoque l'apparition d'une fluorescence verte typique de l'oxydation du DCF (Annexe 7). Le fait que la catalase provoque l'apparition d'une fluorescence verte en absence d'infection peut s'expliquer par son action dans les espaces intercellulaire. En effet, dans ce compartiment, plusieurs enzymes impliquées dans la formation de FAOs comme l' $H_2O_2$  et les ions superoxydes ont été identifiées. C'est le cas de la NADPH oxydase, de plusieurs oxydases et peroxydases (Foyer et al., 2009). Ces enzymes peuvent utiliser l'oxygène issu de la dismutation de l' $H_2O_2$  par la catalase. Ainsi l'augmentation de fluorescence verte observée en réponse à la catalase s'expliquerait par l'utilisation de l'oxygène comme précurseur pour ces enzymes. C'est le cas par exemple de la NADPH oxydase qui synthétise des ions superoxyde à partir de l'oxygène. Cette accumulation d'ions superoxyde en réponse à la catalase modifierait ainsi la balance redox de la cellule en faveur d'un état plus oxydant. De ce fait, la catalase provoquerait indirectement l'accumulation de FAOs provoquant ainsi la mise en place des défenses ce qui aurait pour conséquence la limitation de la croissance de la bactérie.

### *Dualité de DspA/E sur le stress oxydant ?*

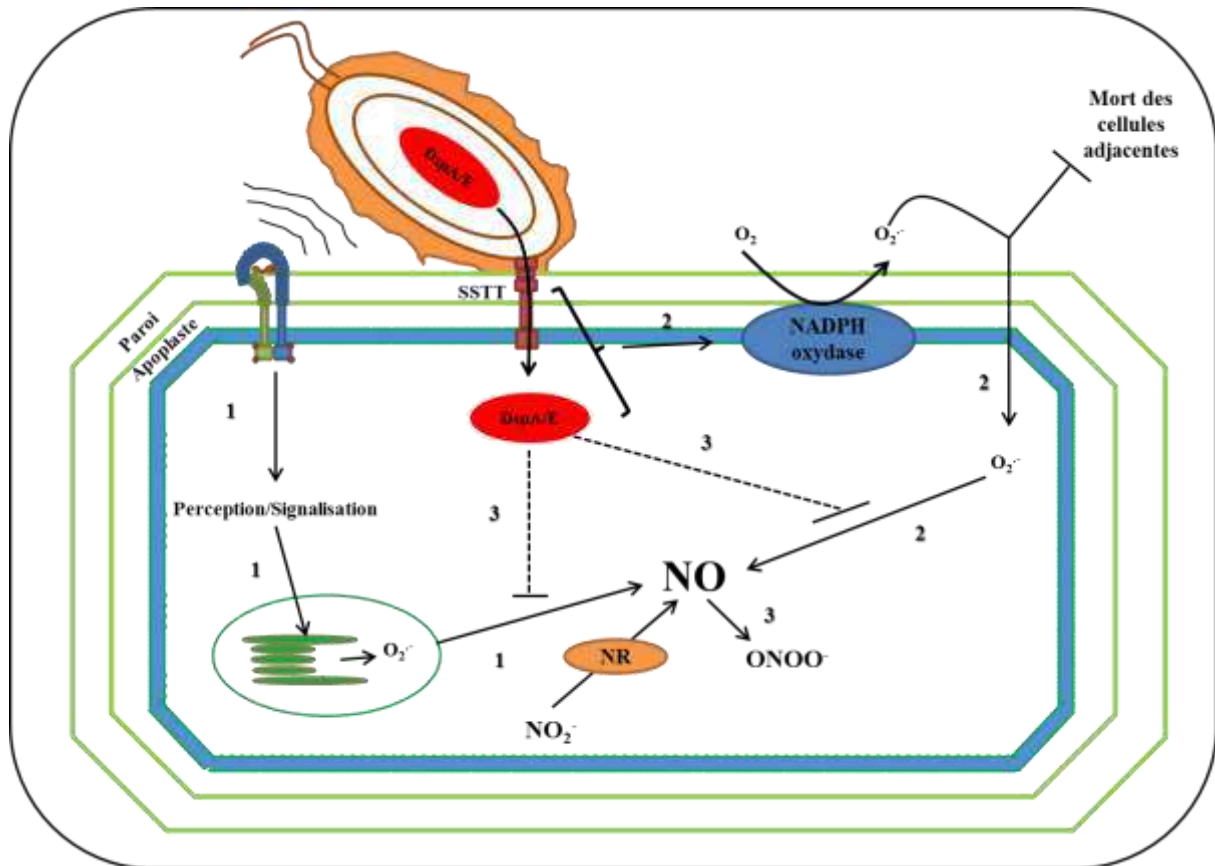
Nos résultats montrent que DspA/E semble réprimer le stress oxydant intracellulaire puisqu'un mutant *dspA/E* induit une plus forte accumulation de fluorescence détectée à l'aide du DCFH-DA (Figure 42). A l'heure actuelle nous ne sommes pas en mesure de dire s'il s'agit d'une répression d' $H_2O_2$ , de peroxy-nitrite ou du NO directement. D'autant plus que la bactérie sauvage induit également le stress oxydant (Figure 42 et Figure 43). Seule la mise en évidence et la quantification des espèces nitrosylées nous permettront de répondre à cette question.

En revanche, les résultats de la Figure 48 nous conduisent à penser que DspA/E induirait une partie du stress oxydant localement. En effet, une accumulation d' $H_2O_2$  apoplastique est induite en réponse à la bactérie sauvage, ce que l'on n'observe plus en réponse à un mutant bactérien *dspA/E*. Ainsi le mutant bactérien *dspA/E* n'est plus capable d'induire le stress oxydant apoplastique. Ces résultats sont intéressants à la lumière de l'analyse de Foyer et Noctor (2009) qui indiquent que ce n'est pas uniquement la quantité de FAOs qui serait impliquée dans l'initiation d'une réponse à un pathogène mais aussi la localisation précise de la production.

Une accumulation d' $H_2O_2$  détectée par le marquage au chlorure de cerium est toujours observée en réponse à ce mutant bactérien (Figure 47). L'origine de ce stress oxydant peut être expliquée par le fait que ce mutant bactérien possède toujours son système de sécrétion de type 3, par conséquent la bactérie peut toujours injecter certains effecteurs comme l'effecteur HrpN qui induit le stress oxydant sur poire (Venisse et al., 2003) et sur cellules d'*A. thaliana* (Reboutier et al., 2007a). L'origine de ce stress peut s'expliquer également par la présence des flagelles et de l'amylovorane qui sont des PAMPs potentiels. Ceci est en accord avec les résultats publiés par Degraeve et al en 2008 montrant qu'un mutant du système de sécrétion de type 3 induit toujours un stress oxydant (Degraeve et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats suggère que DspA/E jouerait un double rôle dans l'accumulation du stress oxydant au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*. Tout d'abord un rôle d'inducteur local au niveau de l'espace intercellulaire comme observé en microscopie électronique, puis un rôle de répresseur au niveau intracellulaire probablement en réprimant l'accumulation d'espèces nitrosylées. Le fait que DspA/E réprime les espèces nitrosylées est une hypothèse intéressante. En effet, plusieurs études attestent que le NO est un messenger important dans la mise en place des réponses de défenses de la plante face à un agent pathogène (Delledonne et al., 1998; Shirasu and Schulze-Lefert, 2000; Romero-Puertas et al., 2004; Zeier et al., 2004; Grün et al., 2006; Hong et al., 2008). De plus, dans leur étude, Delledonne et al., expliquent que le *burst* oxydatif provoquant l'accumulation d' $H_2O_2$  et d'ions superoxyde n'est pas suffisant pour permettre l'induction d'une forte résistance. Les auteurs montrent également que l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de NO permet de restaurer la croissance de *P. syringae* AvrRPM1 chez *A. thaliana*. Une étude de 2011 réalisée par Gaupels et al., 2011., montre que les ions peroxy-nitrites s'accumulent au cours de la HR dans l'interaction entre *A. thaliana* et *P. syringae* pv. *tomato* portant la protéine d'avirulence AvrB.





**Figure 50: Rôle du stress oxydant et hypothèses du rôle de DspA/E sur le stress oxydant au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora***

(1): La bactérie *E. amylovora* est détectée par la cellule végétale via ses PAMPs ce qui va induire une signalisation conduisant à l'accumulation d'ions superoxyde chloroplastiques comme il a été observé avec nos résultats de détection au NBT. Ces ions superoxyde couplés au NO pourraient induire la formation des ions peroxynitrites détectés par le DCFH-DA.

(2): La bactérie injecte son effecteur DspA/E dans la cellule végétale via le SSTT. DspA/E et le SSTT provoquent l'activation de la NADPH oxydase qui synthétise des ions superoxydes qui se dissocient en  $H_2O_2$  ou sont dissociés par des superoxyde dismutases de l'apoplaste. Une partie de des ions superoxyde passe dans la cellule végétale et vont se coupler au NO (synthétisé grâce à la Nitrate reductase (NR) pour former des ions peroxynitrites. L'autre partie va inhiber la progression de la mort des cellules adjacentes.

(3): Une fois DspA/E injecté dans la cellule végétale, l'effecteur réprimerait l'accumulation des ions peroxynitrites.

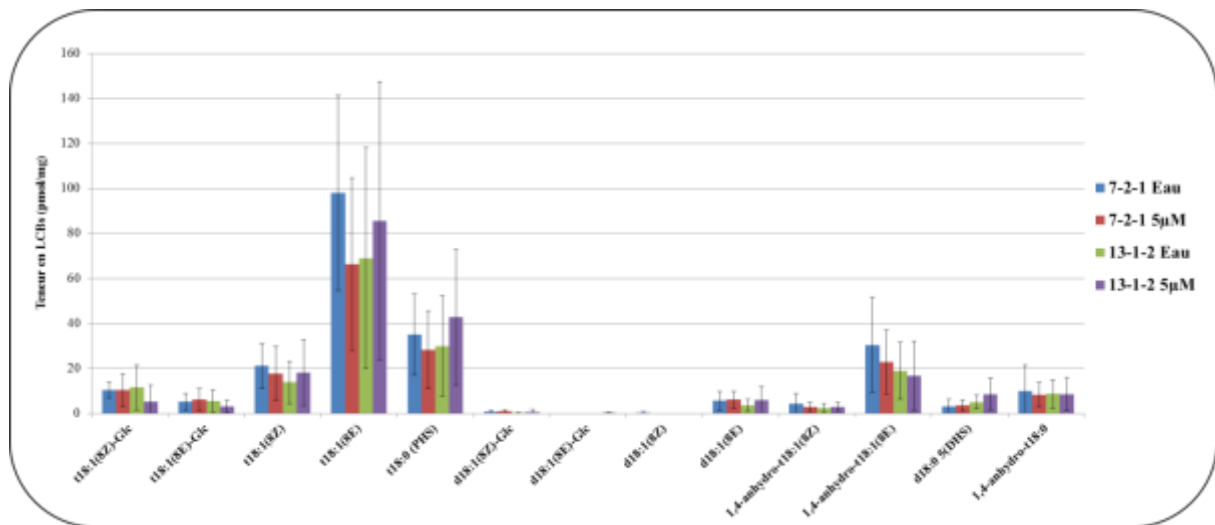


Cependant, les ions peroxy-nitrites ne tuent pas les cellules végétales contrairement aux cellules animales suggérant ainsi que ces ions auraient un rôle dans la signalisation conduisant à la HR (Delledonne et al., 1998).

Enfin, de récents résultats montrent que la bactérie *E. amylovora* se multiplie mieux sur un milieu limité en azote (M. Farjad et M. Fagard communication personnelle) ce qui pourrait limiter la disponibilité en NO dans les cellules. Le NO pourrait donc jouer un rôle important au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* et DspA/E pourrait avoir un rôle de répresseur d'espèces nitrosylées comme les ions peroxy-nitrites. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces ions au cours de l'interaction en utilisant des capteurs de ces ions, l'urate ou le Gamma-tocophérol (Desel et al., 2007). La Figure 50 fait le bilan des hypothèses sur le stress oxydant au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* ainsi que le rôle possible de DspA/E sur ce stress oxydant.

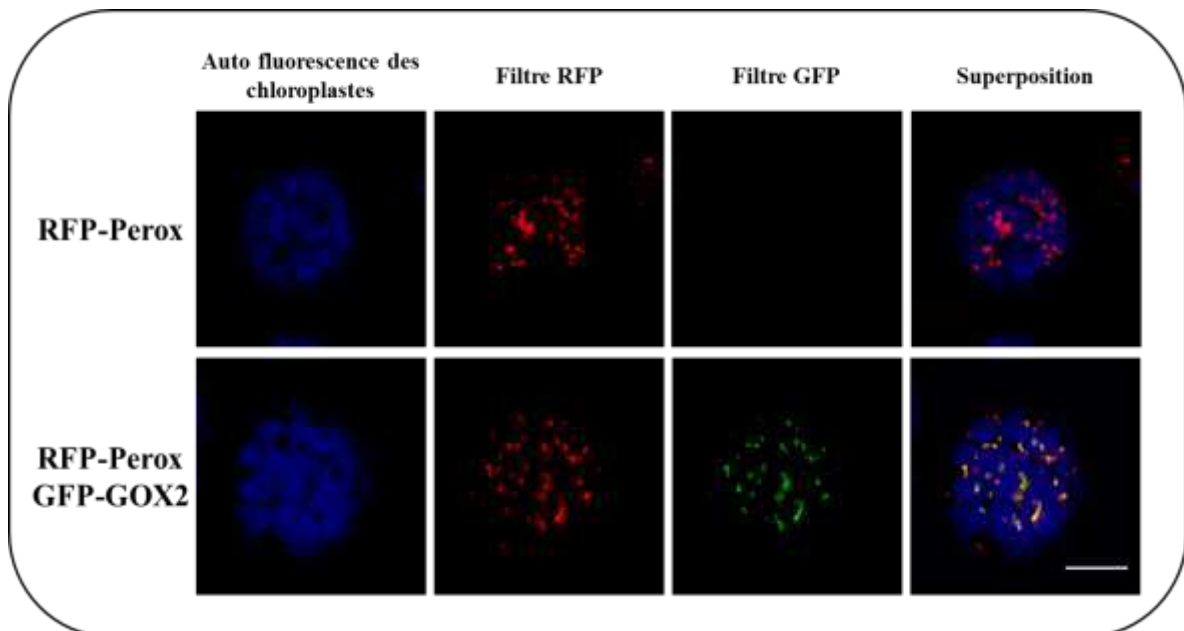


# **Résultats complémentaires**



**Figure 51: DspA/E ne réprime pas l'accumulation des acides gras à longue chaîne (LCBs)**

Des plantules de 10 jours ont été induites à l'estradiol 5  $\mu\text{M}$  ou non pendant 20 minutes et prélevées 24 heures après. Les LCBs totaux ont été extraits à partir de matériel lyophilisé, ont subi une hydrolyse basique et ont été analysés en HPLC. (7-2-1) : Lignée GFP ; (13-1-2) : Lignée DspA/E.



**Figure 52: La glycolate oxydase 2 est localisée dans les peroxysomes chez *A. thaliana***

Une lignée de protoplastes d'*A. thaliana* transformée de manière stable avec une RFP (RFP-Perox) a été transfectée à l'aide d'un vecteur portant le gène de la glycolate oxydase 2 fusionné avec la GFP en N-terminal. Barre d'échelle=30  $\mu\text{M}$ .

## I. DspA/E n'a pas d'effet sur la voie des sphingolipides

L'effecteur DspA/E induit la mort cellulaire chez différentes espèces de plantes (Gaudriault et al., 1997; Boureau et al., 2006; Degrave et al., 2008). Cet effecteur est également toxique pour la levure (Siamer et al., 2011). Au laboratoire des interactions plantes-pathogènes, un criblage de mutants supprimeurs de la toxicité induite par DspA/E chez la levure a été réalisé. Au cours de sa thèse, Sabrina Siamer a caractérisé une partie de ces supprimeurs. Parmi ces supprimeurs de la toxicité, les plus forts sont affectés dans la voie des sphingolipides et accumulent des précurseurs des sphingolipides, les acides gras à longue chaîne (LCBs). De plus, l'ajout dans le milieu de culture des acides gras à longue chaîne la phytosphingosine et la dihydrosphingosine suppriment la toxicité de DspA/E chez la levure. Ces résultats sont confortés par le fait que l'expression de DspA/E dans la levure conduit à la répression du niveau de LCBs. L'ensemble de ces résultats montrent que la toxicité de DspA/E chez la levure est due à la diminution du taux de LCBs (Siamer, 2013).

Au regard de ces résultats, nous avons analysé le niveau d'accumulation des sphingolipides totaux afin de voir si l'effet toxique de DspA/E chez *A. thaliana* est corrélé au niveau des LCBs. Pour cela, des plantules des lignées 7-2-1 et 13-1-2 ont été traitées ou non avec de l'estradiol 5  $\mu\text{M}$  et prélevées 24 heures après traitement. La Figure 51 présente les résultats de l'analyse des sphingolipides totaux. Les mesures montrent qu'il n'y a aucune différence de contenu de sphingolipides entre la lignée contrôle (7-2-1) et la lignée exprimant DspA/E (13-1-2). Ces résultats indiquent que DspA/E n'a pas d'effet sur le niveau des LCBs totaux chez *A. thaliana*.

## II. La glycolate oxydase 2 est peroxysomale

Nos résultats de microscopie électronique montrent que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  s'accumule essentiellement au niveau de la paroi en réponse à *E. amylovora* et suite à l'expression de DspA/E dans la lignée 13-1-2 (Figure 47 et Figure 48). De plus, dans les supprimeurs de la toxicité induite par DspA/E qui portent une mutation dans le gène *GOX2*, une diminution de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  apoplastique est observée.

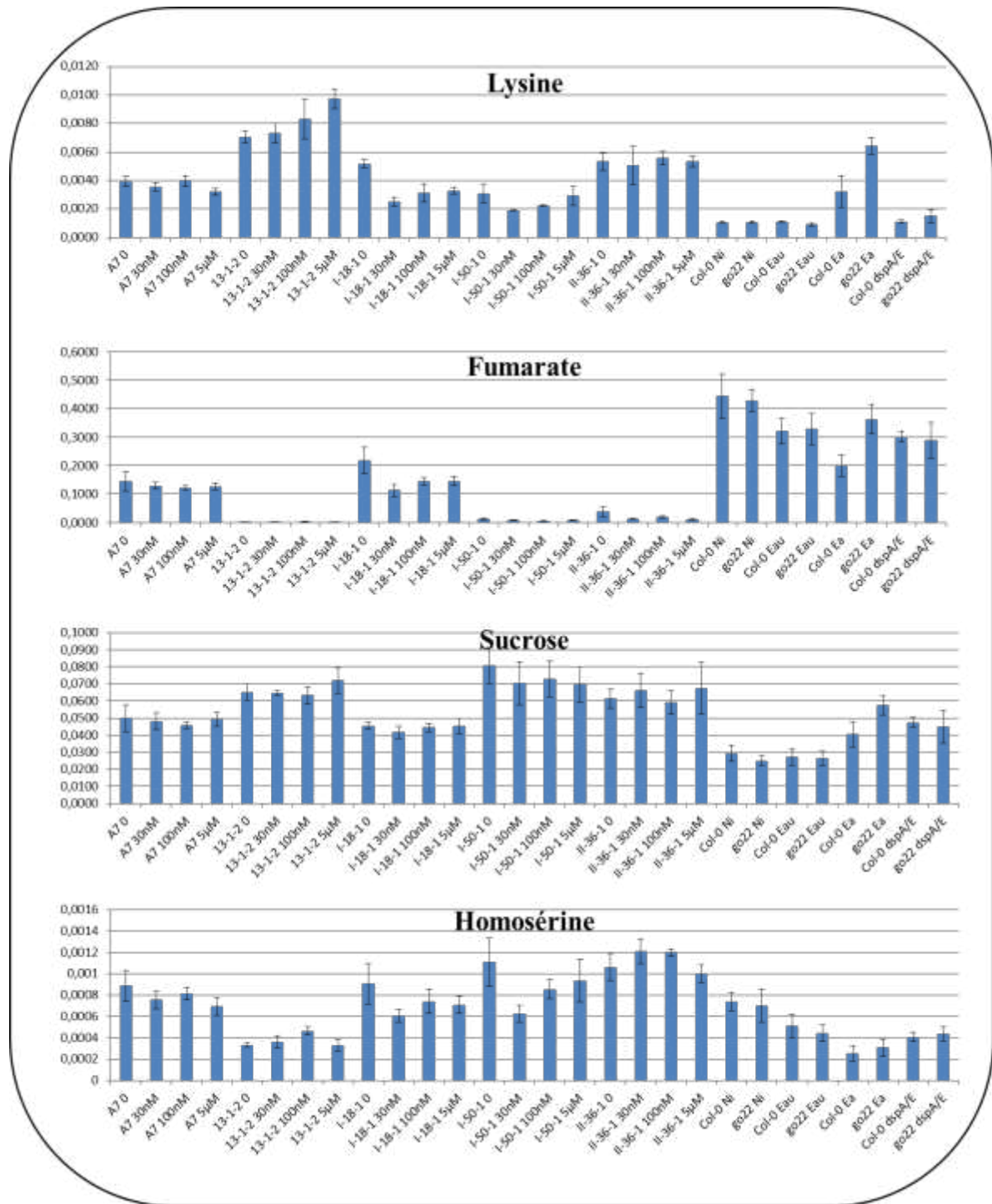
Les glycolate oxydases sont des enzymes qui sont considérées comme peroxysomales. En effet, l'analyse du protéome des peroxysomes d'*A. thaliana* a mis en évidence 42 protéines portant une séquence d'adressage au peroxysomes (Reumann et al., 2007). Parmi ces protéines, les glycolate oxydases 1 et 2 ont été identifiées ce qui suggère une localisation peroxysomale de ces protéines. Cependant, il a été montré que la glycolate oxydase 1 (AT3G14420) est localisée également au niveau des chloroplastes et dans d'autres compartiments (membrane et peroxysomes), les auteurs pensent que cette enzyme peut catalyser des réactions différentes dans les chloroplastes et dans le peroxysome (Reumann et al., 2007; Armbruster et al., 2009). Ces données et l'observation de l'accumulation *GOX2*-dépendante d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la paroi nous ont poussés à déterminer la localisation de la glycolate oxydase 2.

Afin de déterminer la localisation de la glycolate oxydase 2, nous avons transformé une lignée de protoplastes qui expriment une protéine peroxisomale couplée à la RFP de manière stable (Mano et al., 2004), avec une construction portant la glycolate oxydase 2 fusionnée avec la GFP

dans sa partie N-terminale. De cette façon nous avons pu comparer la localisation de la glycolate oxydase 2 à celle d'un marqueur du peroxysome (Figure 52) avec un filtre RFP, on observe que la lignée RFP-Perox présente des zones rouges traduisant la présence des peroxysomes dans l'ensemble du protoplaste. La photo pour le filtre GFP pour la lignée RFP-Perox seule ne présente aucune fluorescence comme attendu. La lignée RFP-Perox transfectée avec la construction GFP-GOX2 présente une fluorescence verte dans le même type de structures observées avec le filtre RFP. La superposition de l'ensemble des clichés, montre une couleur jaune au niveau des structures observées avec les filtres GFP et RFP et uniquement sur cette zone. L'ensemble de ces résultats montre que la glycolate oxydase 2 est localisée au niveau des peroxysomes.







**Figure 53: Métabolites représentatifs pour chaque catégorie modulés par DspA/E et *E. amylovora* dans les supresseurs et le mutant *gox2-2***

Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines ou des plantules de 10 à 12 jours ont été traitées par la souche sauvage d'*E. amylovora*, de l'eau ou le mutant bactérien de DspA/E (*dspA/E*) pour les plantes et par de l'eau ou de l'estradiol pour les plantules. Les prélèvements ont été effectués à 24 heures post-induction ou inoculation. Résultats pour 3 répétitions biologiques.

### III. *E. amylovora* module l'accumulation de plusieurs métabolites dépendamment et indépendamment de DspA/E

De précédents résultats montrent que DspA/E induit et réprime certaines défenses et est toxique pour les cellules végétales (Boureau et al., 2006; Degrave et al., 2008, 2013). Cependant, les mécanismes permettant à DspA/E d'être toxique demeurent inconnus. La recherche de candidats suppresseurs de la toxicité de DspA/E a permis d'identifier la glycolate oxydase 2 comme suppresseur potentiel de la toxicité. Une autre façon de comprendre les mécanismes de la toxicité induite par DspA/E est d'étudier les métabolites induits ou réprimés au cours de l'infection ou lorsque DspA/E seul est exprimé. Ces analyses métabolomiques permettent également de mieux comprendre si des métabolites sont plutôt impliqués dans la maladie provoquée par *E. amylovora* ou plutôt impliqués dans les défenses mises en place par la plante. Nous avons donc effectué des analyses métabolomiques sur des plantes infectées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* ou la souche mutante de DspA/E (*dspA/E*) et des plantes des lignées 7-2-1, 13-1-2 et les suppresseurs *I-18-1*, *II-36-1* et *I-50-1* induits ou non à l'estradiol. Les métabolites ont été classés en plusieurs catégories. La synthèse des résultats est présentée en Annexe 8 et la Figure 53 montre les profils des métabolites représentatifs de chaque catégorie.

La première grande catégorie présente les métabolites dont l'accumulation est augmentée lors de l'infection par *E. amylovora*. Dans cette catégorie on trouve des métabolites qui s'accumulent lors de l'infection par *E. amylovora* de manière DspA/E dépendante et en réponse à l'expression de DspA/E dans la lignée transgénique 13-1-2. Ces métabolites s'accumulent beaucoup plus fortement en réponse à la bactérie et dans la lignée 13-1-2 que dans les conditions contrôles. En revanche, leur quantité n'est pas augmentée dans les plantes inoculées par le mutant *dspA/E* par rapport au contrôle eau. Les métabolites trouvés dans cette catégorie sont la Lysine (un acide aminé), le Stigmastérol (un phytostérol) et le Pipecolate (un acide organique) (Annexe 8). Une deuxième catégorie correspond aux métabolites dont l'accumulation est diminuée lors de l'infection par *E. amylovora* de manière DspA/E-dépendante et par DspA/E seul. Ces métabolites s'accumulent moins en présence de la bactérie et dans la lignée 13-1-2 que dans les conditions contrôles. Leur quantité n'est pas diminuée en présence de la bactérie mutée pour DspA/E par rapport au contrôle eau. Les métabolites de cette catégorie sont le Fumarate (un acide organique du cycle de Krebs) et le Myo-inositol (une molécule organique) (Annexe 8).

Les troisièmes et quatrièmes catégories, présentent les métabolites dont l'accumulation est affectée par *E. amylovora* sauvage, par le mutant *dspA/E* et suite à l'expression de DspA/E dans la lignée transgénique 13-1-2. C'est-à-dire que DspA/E n'est pas le seul facteur modulant ces métabolites. Les métabolites de la catégorie 3 s'accumulent dans ce cas. Les métabolites de cette catégorie sont le sucrose, le fructose, le maltose (des glucides) le salicylate (une hormone végétale) et le Glycosylsalicylate (une forme du SA conjuguée à un sucre). Les métabolites de la catégorie 4 sont moins induits dans ce cas. Les métabolites de cette catégorie sont l'Homosérine (un acide aminé) et le Déhydro-ascorbate (Forme oxydée de la vitamine C).

Les cinquièmes et sixièmes catégories, présentent les métabolites dont l'accumulation n'est pas affectée suite à l'inoculation par *E. amylovora* mais qui sont affectés par l'expression de

DspA/E dans la lignée transgénique 13-1-2. Les métabolites trouvés dans la catégorie 5 sont plus accumulés en réponse à l'expression de DspA/E. Les métabolites de cette catégorie sont l'Anhydro-glucose (un monomère de cellulose), la Spermidine (un polyamine), le Pyruvate (un acide du cycle de Krebs), le Glutarate (un acide du cycle de Krebs), l'Acide oléique (un acide gras monoinsaturé), l'Acide linoléique (un acide gras polyinsaturé), l'Eicosanoate (un acide gras), la Sérine (un acide aminé) et l'A-aminoadipate (un précurseur de la lysine). Les métabolites trouvés dans la catégorie 6 sont moins accumulés en réponse à l'expression de DspA/E. Les métabolites trouvés dans cette catégorie sont le Galactosylglycérol (un dérivé du galactose), le Digalactosylglycérol (un dérivé du galactose), l'Urate (produit de dégradation des purines), le Thréonate (un dérivé de l'ascorbate), le Thréonate lactone (un précurseur du thréonate), le Glycérate (un intermédiaire dans le cycle de Calvin), le Galactonate (un dérivé du glucose), l'Erythronate (produit de dégradation de l'ascorbate), le Citrate (un acide du cycle de Krebs), le Phytol-2 (un constituant de la chlorophylle), la Glycine (un acide aminé) et le GABA (un dérivé du glutamate).

L'ensemble de ces résultats, montre que l'infection par la bactérie *E. amylovora* affecte l'accumulation d'un nombre important de métabolites et ce dépendamment de DspA/E. (comme la lysine ou le fumarate par exemple). Cependant, d'autres métabolites sont modulés par la bactérie et pas uniquement dépendamment de DspA/E (comme le sucrose et l'homosérine). L'accumulation d'un grand nombre de métabolites est affectée dans la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E mais pas dans des plantes sauvages infectées par *E. amylovora*. Ces différences observées entre les métabolites modulés dans les feuilles et les plantules, pourraient s'expliquer en partie par l'âge des plantes utilisées. En effet, les plantules sont âgées de 15 jours et les plantes de 5 semaines.

#### IV. Discussion

##### ***Quel est l'implication des métabolites modulés par *E. amylovora* et par DspA/E ?***

Nos résultats montrent que l'accumulation de plusieurs métabolites est affectée au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*. Dans une première catégorie sont regroupés les métabolites qui s'accumulent plus lors de l'inoculation par la bactérie de manière DspA/E-dépendante. Ils sont au nombre de trois : **lysine, pipecolate et stigmastérol**.

Un lien entre la lysine et le pipecolate a été clairement établi. Le pipecolate étant un produit de dégradation de la lysine (Revelles et al., 2005). Le pipecolate et la lysine s'accumulent de plus fortement dans des feuilles d'*A. thaliana* en réponse à l'agent pathogène *P. syringae* pv. *maculicola* (Návarová et al., 2012). L'application de pipecolate directement dans le terreau de culture permet d'augmenter la résistance à *P. syringae* pv. *maculicola* virulent et *P. syringae* pv. *maculicola* portant le gène d'avirulence *AvrRPM1*. L'ensemble de ces résultats montrent que le pipecolate joue un rôle important dans la défense comme *P. syringae*. Il serait intéressant de faire des tests d'inoculation d'*E. amylovora* sur des plantes ayant poussé sur terreau supplémenté avec du pipecolate.

Le **stigmastérol** est un métabolite impliqué dans la mise en place de la résistance. En effet, ce métabolite s'accumule dans des feuilles inoculées avec *P. syringae* pv. *maculicola* et *P. syringae* pv. *maculicola* portant les gènes d'avirulence *AvrRpm1* et *AvrRpt2* (Griebel and Zeier, 2010). Ce composé est synthétisé à partir d'un précurseur, le beta-sitostérol, par le cytochrome P450 CYP710A1. Des mutants de ce cytochrome n'accumulent plus de stigmastérol et l'inoculation de ces mutants montre que les souches bactériennes virulente et avirulente de *P. syringae* pv. *Maculicola* se multiplient et se maintiennent respectivement moins dans la plante. De plus, des plantes traitées au stigmastérol présentent une augmentation de leur sensibilité à des souches virulentes et avirulentes de *P. syringae*. Selon Griebel et Zeier, le stigmastérol augmenterait la perméabilité membranaire. Dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*, l'accumulation de stigmastérol serait induite par DspA/E, provoquant ainsi une perturbation dans la perméabilité des membranes des cellules. Ceci est cohérent avec le fait que l'on mesure plus de fuites d'électrolytes au bout de 24 heures avec *E. amylovora* sauvage et pas avec un mutant *dspA/E*. Ainsi le rôle du stigmastérol au cours de l'interaction serait de provoquer la mort cellulaire en perturbant la fluidité des membranes. Il serait intéressant d'inoculer *E. amylovora* sauvage sur les mutants *cyp710A1* et voir si la bactérie est toujours capable de se multiplier transitoirement.

Les résultats concernant les métabolites qui s'accumulent au cours de l'infection par *E. amylovora* de manière dépendante de DspA/E renforcent l'hypothèse d'un double rôle de DspA/E c'est-à-dire que DspA/E est à la fois un inducteur des défenses et un inducteur de la mort cellulaire qui serait bénéfique à la bactérie (Cf. § Conclusion générale). Il serait intéressant de vérifier quels sont les métabolites accumulés dans des temps plus tardifs de l'infection. Le fait que la bactérie ne se multiplie plus passé 24 heures nous suggère que des métabolites plutôt requis lors des défenses comme le pipicolate seraient plus induits.

Deux métabolites s'accumulent moins suite à l'infection par la souche sauvage d'*E. amylovora* de manière dépendante de DspA/E, le **fumarate** et le **myo-inositol**. L'accumulation de fumarate n'est pas connue pour être affectée dans le cas de défense ou de maladie des plantes. Cependant, la lysine est un précurseur de ce composé et la conversion de la lysine en fumarate passe par la transformation de la lysine en A-aminoadipate, métabolite qui est induit dans la lignée 13-1-2 exprimant DspA/E uniquement (métabolite de la cinquième catégorie). L'A-aminoadipate est un précurseur du fumarate (Tcherkez et al., 2012). Ceci suggère que DspA/E réprimerait l'une des enzymes permettant la conversion de l'A-aminoadipate en fumarate.

Le **myo-inositol** est un métabolite impliqué dans la mort cellulaire (Meng et al., 2009). Il a été montré notamment que la production de myo-inositol empêche la mort cellulaire programmée puisque des mutants *atips1* mutés pour dans le gène permettant la biosynthèse de ce métabolite présentent plus de mort cellulaire en jours long. Il serait intéressant de faire pousser la lignée 13-1-2 portant DspA/E en présence de Myo-inositol sans estradiol afin d'observer si les plantes ont un phénotype proche de la lignée contrôle 7-2-1 portant la GFP.

La troisième catégorie, comporte les métabolites dont l'accumulation est provoquée par *E. amylovora* (sauvage et mutant *dspA/E*) et dans la lignée 13-1-2 suite à l'expression de DspA/E. Ce qui signifie que DspA/E n'est pas le seul inducteur de l'accumulation de ces métabolites. Les

inducteurs potentiels de l'accumulation de ces métabolites pourraient être les PAMPs de la bactérie, le système de sécrétion de type 3 ou d'autres effecteurs injectés *via* ce système de sécrétion de type 3 (Boureau et al., 2011). Ces métabolites sont au nombre de cinq (**sucrose, fructose, maltose, salicylate et glycosylsalicylate**). Le fait que le SA s'accumule en présence de la bactérie n'est pas surprenant. En effet, le nombre de publications décrivant une accumulation de SA au cours d'une interaction plante-pathogène est important que ce soit au cours d'une interaction entre un pathogène virulent ou avirulent (Loake and Grant, 2007). Ceci est cohérent avec l'étude de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* au cours de laquelle la voie SA est induite que ce soit avec la souche sauvage ou des mutants du système de sécrétion de type 3 et de différents effecteurs tels que HrpN, HrpW et DspA/E (Degrave et al., 2008). Ceci indique que la voie SA est induite en partie par les PAMPs bactériens. Le glycosylsalicylate est quant à lui peu documenté dans la littérature. C'est une forme glycosylée du SA qui est transitoire et est convertie en SA 2-O-beta-D-glucoside, une forme plus stable (Lee and Raskin, 1998). Ces composés s'accumulent lors de la mise en place des défenses des plantes (Song, 2006). Il est possible que cette forme du SA serve de réserve de stockage dans la vacuole ou soit une forme transitoire qui serait dégradée par la suite pour réguler le niveau du SA libre dans la cellule.

Le sucrose, le fructose et le maltose sont des hexoses servant de précurseurs pour le stockage d'amidon. Le fait qu'ils s'accumulent peut être le signal d'une entrée en sénescence par dégradation de l'amidon (Masclaux-communication personnelle). Cette accumulation d'hexoses conduit à l'inhibition de l'activité d'enzymes du cycle de Calvin et *in fine* à la dégradation de la chlorophylle dans le cas d'une infection de l'orge par un champignon biotrophe (Swarbrick et al., 2006). Ce qui serait cohérent avec la chlorose formée sur les feuilles infectées mais également avec nos données de transcriptome qui montre que la bactérie réprime la photosynthèse chez *A. thaliana* et chez les génotypes sensibles de pommier (Malnoy et al., 2007). Il serait intéressant de mesurer l'activité des invertases qui permettent de convertir les hexoses en amidon et de doser l'amidon sur des feuilles infectées pour voir si la bactérie provoque une diminution de la quantité d'amidon, un indice d'entrée en sénescence des feuilles.

La quatrième catégorie comporte les métabolites dont l'accumulation est réprimée par la souche *E. amylovora* (sauvage et mutant *dspA/E*) et dans la lignée 13-1-2 suite à l'expression de DspA/E. Ce qui signifie que DspA/E n'est pas le seul répresseur de l'accumulation de ces métabolites. Ils sont au nombre de deux (**déhydroascorbate et homosérine**). L'homosérine n'a aucun rôle connu lié aux défenses ou à la maladie des plantes. Le déhydroascorbate est la forme oxydée de l'ascorbate. Le rapport ascorbate oxydé/ascorbate réduit est un indicateur important de l'état red/ox de la cellule (Foyer and Noctor, 2011). En effet, l'ascorbate est majoritairement sous forme réduite dans la cellule, une augmentation du stress oxydatif par la formation d'ions superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène conduit à augmenter le pool d'ascorbate oxydé conduisant à augmenter le rapport ascorbate oxydé/ascorbate réduit. Cependant, les analyses métabolomiques effectuées ne permettent pas de discerner les formes réductrices et oxydées de l'ascorbate et nous ne pouvons donc pas dire avec certitude si la bactérie et/ou DspA/E répriment la forme oxydée de l'ascorbate uniquement. La mesure du niveau global de l'ascorbate dans les plantes infectées par la bactérie et dans la lignée 13-1-2 serait un indice supplémentaire du rôle du stress oxydant au cours de l'interaction et du rôle de DspA/E sur ce stress oxydant. Il serait



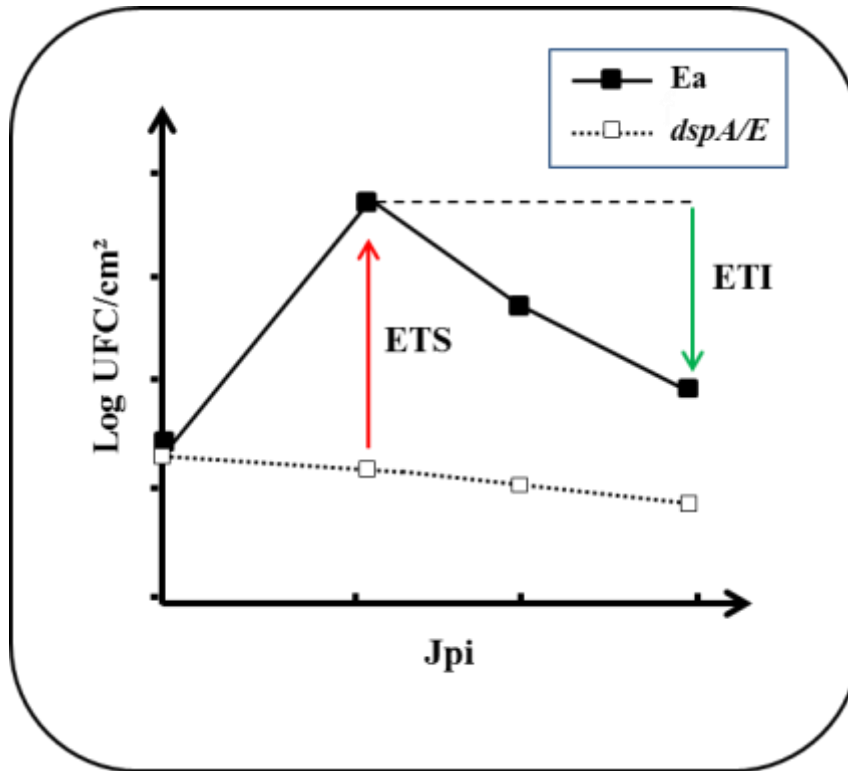
intéressant de mesurer le rapport glutathion oxydé/glutathion réduit qui est un bon indicateur de l'état red/ox de la cellule puisque la régénération de l'ascorbate dépend du glutathion (Foyer and Noctor, 2011, 2013).

Les cinquième et sixième catégories regroupent tous les métabolites dont l'accumulation est affectée uniquement par l'expression DspA/E (13-1-2). Ces métabolites sont plus nombreux que dans le cas d'une modulation par la bactérie seule. La modulation de ces métabolites pourrait être due à un effet à long terme de l'accumulation de DspA/E dans la lignée 13-1-2, lignée dans laquelle DspA/E est légèrement exprimé sans induction (Degrave et al., 2013). Une hypothèse alternative expliquerait cet effet sur l'accumulation par le fait que DspA/E serait en quantité importante dans les plantes transgéniques induites contrairement à l'injection par la bactérie.





# **Conclusion générale et perspectives**



**Figure 54: Hypothèses concernant le rôle de DspA/E dans l'immunité chez *A. thaliana***

La bactérie *E. amylovora* se multiplie transitoirement chez *A. thaliana* et cette multiplication est dépendante de DspA/E puisque le mutant *dspA/E* ne se multiplie pas. Deux jours après l'inoculation, la population bactérienne ne se maintient pas et chute. Dans les deux premiers jours, la multiplication dépendante de DspA/E peut être considérée comme étant de l'ETS puis dans les jours d'après, la population bactérienne chute, il est possible qu'il y ait une reconnaissance de l'activité de DspA/E conduisant à de l'ETI. ETS: Effector Triggered Susceptibility; ETI: Effector Triggered Immunity Jpi: Jours post-inoculation

L'étude du pathosystème *A. thaliana*/*E. amylovora* nous a permis de montrer que la bactérie se multiplie transitoirement et ceci est associé à une nécrose et à l'expression de gènes de défenses. Contrairement à ce qui se passe sur pommier, plante hôte d'*E. amylovora*, chez *A. thaliana*, cette nécrose ne s'étend pas sur l'ensemble de la feuille mais reste localisée à la zone inoculée (résultats non présentés). La résistance d'*A. thaliana* à *E. amylovora* est un cas de résistance non-hôte de type II, c'est-à-dire qui conduit à une mort cellulaire locale qui présente des similitudes avec la HR (Senthil-Kumar and Mysore, 2013). La réaction hypersensible (HR) est une mort cellulaire programmée qui a lieu suite à la reconnaissance spécifique d'un effecteur par une protéine de résistance R de la plante (Flor, 1971). Dans le cas de notre pathosystème la recherche d'interacteurs de DspA/E ne nous a pas permis d'identifier de protéines R correspondante. Il est cependant possible que ce soit l'activité de DspA/E qui soit reconnue par une protéine R correspondante qui resterait à identifier.

### ***Quel est le type de la mort cellulaire provoquée par la bactérie E. amylovora chez A. thaliana ?***

Comme dans le cas de l'interaction entre *E. amylovora* et la plante non-hôte *N. benthamiana* (Oh et al., 2007), le cas du pathosystème *E. amylovora*/*A. thaliana* est complexe. En effet, dans les premières heures de l'infection l'effecteur DspA/E est indispensable à la bactérie afin qu'elle se multiplie (Degrave et al., 2008) (Figure 54). Cette première phase de multiplication bactérienne peut être considérée comme étant de l'ETS. Par la suite, la population bactérienne *in planta* chute, c'est-à-dire que l'ETS est perdue. Le fait que cette ETS soit perdue suggère que la bactérie est reconnue par la plante dans les phases plus tardives de l'infection. Des travaux précédents ont montré que DspA/E joue un rôle important dans l'induction des défenses chez *A. thaliana* (Degrave et al 2013), notamment la voie EDS1 dont il a été démontré qu'elle est impliquée dans la résistance non hôte d'*A. thaliana* à *E. amylovora* (Moreau et al., 2012). Cette deuxième phase de l'interaction correspondrait donc au moins en partie à de l'ETI. Ces différentes phases au cours de l'infection sont accompagnées d'une mort cellulaire qui donne lieu à des symptômes de nécrose au bout de quelques jours. Ce type de symptôme nécrotique est caractéristique de l'interaction entre *E. amylovora* et ses plantes hôtes telles que le pommier. En conséquence, et du fait de l'existence à la fois de l'ETS (associée à la nécrose chez la plante hôte), de l'ETI (généralement associée à une HR) et du fait que l'on observe une augmentation de la nécrose en présence d'un inhibiteur de la traduction, la CHX (Moreau et al., 2012). La question se pose dans le cas de notre pathosystème du type de mort cellulaire observée et de son rôle dans le cas de l'interaction entre *E. amylovora* et *A. thaliana*.

### **Eléments de similitudes entre la HR et la mort cellulaire induite**

Comme il a été énoncé précédemment (Discussion du chapitre 2), il est possible que dans le cas de notre pathosystème une HR soit observée. En effet, certains éléments de la littérature tendent vers cette hypothèse.

C'est le cas par exemple du rôle de certaines phytohormones. **L'acide salicylique** par exemple s'accumule au cours de la HR mais ne semble pas être l'élément déclencheur de cette HR. Il serait plutôt une conséquence de l'activation de la HR (Verberne et al., 2000). Ceci est cohérent avec le fait que le SA s'accumule au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* et que la mort cellulaire induite par DspA/E ne passe pas par une voie SA fonctionnelle (Degrave et al., 2013). **L'acide jasmonique** s'accumule également au cours de la HR et a été décrit comme limitant la HR dans les cellules environnant la zone d'inoculation (Norman-Setterblad et al., 2000; Devadas et al., 2002). Ceci est cohérent avec le fait que la voie JA est induite au cours de l'interaction de manière dépendante de DspA/E et que la nécrose ne s'étend pas sur la feuille entière lorsque la moitié de la feuille est inoculée. Par ailleurs, des tests d'inoculation de la bactérie dans le mutant *jar1*, un mutant de perception de la voie JA présente plus de symptômes (Fagard, non publié). Ce résultat suggère que la voie JA empêche la propagation de la mort des cellules environnantes au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*.

**Les lipides** sont des molécules également impliquées dans la mise en place de la HR et plusieurs exemples de mutants affectés dans le métabolisme des lipides et dans la mise en place de la HR ont été décrits dans la littérature tels que *acd5* ou *acd11* (Brodersen et al., 2002; Liang et al., 2003). De même que la fumonisine B1, une mycotoxine produite par des champignons phytopathogènes déclenche la HR en perturbant le métabolisme des sphingolipides (Abbas et al., 1994; Stone et al., 2000). Enfin, le facteur de transcription AtMYB30 chez *A. thaliana* a été décrit comme étant un régulateur positif de la HR en contrôlant l'expression de gènes codant la synthèse des acides gras à très longue chaîne, les VLCFA. Notamment, lorsque ce facteur est surexprimé, les plantes accumulent plus de VLCFA, alors qu'au contraire, les plantes mutées pour ce facteur de transcription accumulent moins de VLCFA. L'accumulation de VLCFA dans les plantes surexprimant AtMYB30 conduit d'ailleurs à une accélération de la HR en réponse à *P. syringae* portant le gène d'avirulence *AvrRPM1* (Vailleau et al., 2002; Raffaele et al., 2008). Les travaux menés sur la toxicité de DspA/E chez la levure ont montré que DspA/E réprime l'accumulation de bases à longues chaînes (LCB), un précurseur des sphingolipides (Siamer, 2013). En revanche, la mesure d'accumulation des LCBs en réponse à l'expression de DspA/E a montré que l'effecteur n'a pas d'effet sur l'accumulation des LCBs chez *A. thaliana* indiquant ainsi que la toxicité de DspA/E ne s'exprimerait pas *via* la voie des lipides.

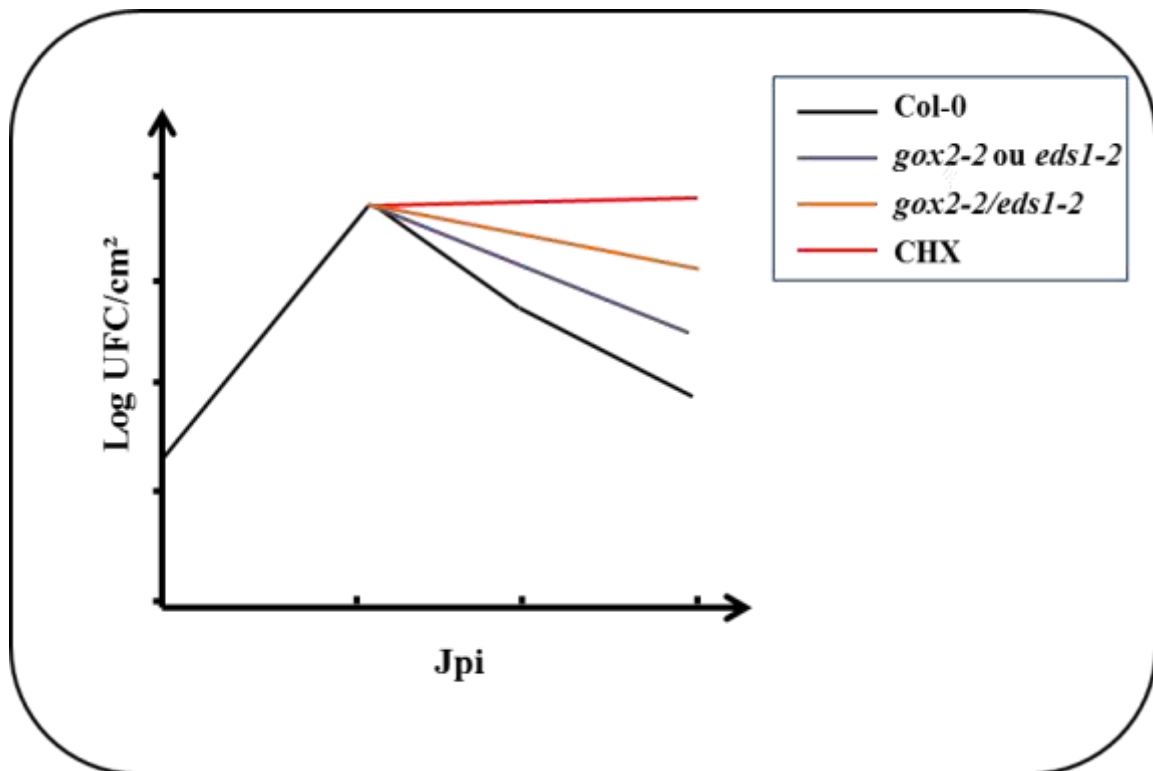
Plusieurs études attestent de l'accumulation **de FAOs et du NO** au cours de la HR. L'implication des FAOs dans la mise en place des défenses a été montrée et il a été constaté qu'une production bi-phasique de FAOs est déclenchée dans le cas d'une HR. Plus précisément, une première phase est déclenchée dans les minutes suivant la détection de l'agent pathogène, ce n'est que dans le cas d'une HR qu'une deuxième phase est déclenchée plusieurs heures après (Allan and Fluhr, 1997; Wojtaszek, 1997; Mittler et al., 2011). Ceci est cohérent avec nos temps d'observation de détection de FAOs (16 heures post-inoculation). Il faut noter cependant qu'un burst oxydatif est également observé au cours de la maladie provoquée par *E. amylovora* sur ses plantes hôtes (Venisse et al., 2001) et que le rôle de ce burst oxydatif au cours de la maladie n'est actuellement pas élucidé.

Nous avons énoncé précédemment que le NO est impliqué dans la mise en place de la HR (Zhang et al., 2003; Sun and Li, 2012 et Discussion chapitre 3). De plus, la balance entre le NO et les FAOs semble importante pour la mise en place de la HR puisque le NO interagit avec le peroxyde d'hydrogène pour déclencher la HR et avec les ions superoxyde pour former des ions peroxynitrites (Romero-Puertas et al., 2004). Nos résultats suggèrent que le NO pourrait être impliqué au cours de l'interaction (cf. chapitre 3) et que DspA/E réprimerait cette accumulation de NO des ions peroxynitrites.

Enfin, plusieurs exemples dans la littérature attestent de l'existence d'**influx calciques** impliqués dans la HR (Atkinson et al., 1996; Yu et al., 1998; Grant et al., 2000; Balagué et al., 2003; Cheval et al., 2013). Dans le cas de notre pathosystème il serait intéressant de vérifier les influx calciques au cours de l'interaction. D'autant plus que ces influx calcique activent plusieurs enzymes telles que des CDPK qui sont impliquées dans les mécanismes de la HR (Romeis et al., 2001) ou les NADPH oxydases telle que AtrbohD qui peuvent potentiellement lier le calcium permettant de déclencher un burst oxydatif (Grant et al., 2000; Sagi and Fluhr, 2006).

### **Éléments en contradiction avec la HR**

D'autres éléments décrivant la HR dans la littérature sont différents par rapport à nos résultats. En effet, sur la plante non-hôte *N. benthamiana*, *E. amylovora* et DspA/E induisent la mort cellulaire dépendamment de SGT1 (Oh et al., 2007) impliquée dans la mise en place de la HR (Peart et al., 2002) et interagissant avec RAR1 (Azevedo et al., 2002) impliqué également dans la mise en place de la HR (Tornero et al., 2002). Cependant, des tests d'inoculation des mutants *rar1-13* et *sgt1b-3* d'*A. thaliana* avec *E. amylovora* ne montrent pas une diminution des symptômes chez ces mutants en réponse à la bactérie ainsi que dans le double mutant (Fagard non-publié). Des résultats similaires ont été observés dans le mutant *ndr1-1* alors que NDR1 est impliqué dans la mise en place de la HR en réponse à *P. syringae* portant le gène d'avirulence *AvrRPT2*. Des résultats similaires ont été observés dans le mutant *eds1-2* corrélés à plus de croissance bactérienne (Moreau et al., 2012) alors que le gène EDS1 est nécessaire pour la mise en place de la HR en réponse au virus Turnip crinckle virus chez *A. thaliana*. Un autre argument en défaveur de la HR dans le cas de notre interaction est le besoin de la lumière pour la mise en place de la HR (Liu et al., 2007). En effet, des tests d'inoculation par *E. amylovora* de plantes ayant été conservées à l'obscurité pendant toute la durée de l'inoculation montrent que ces plantes présentent plus de symptômes nécrotiques que les plantes conservées à la lumière.

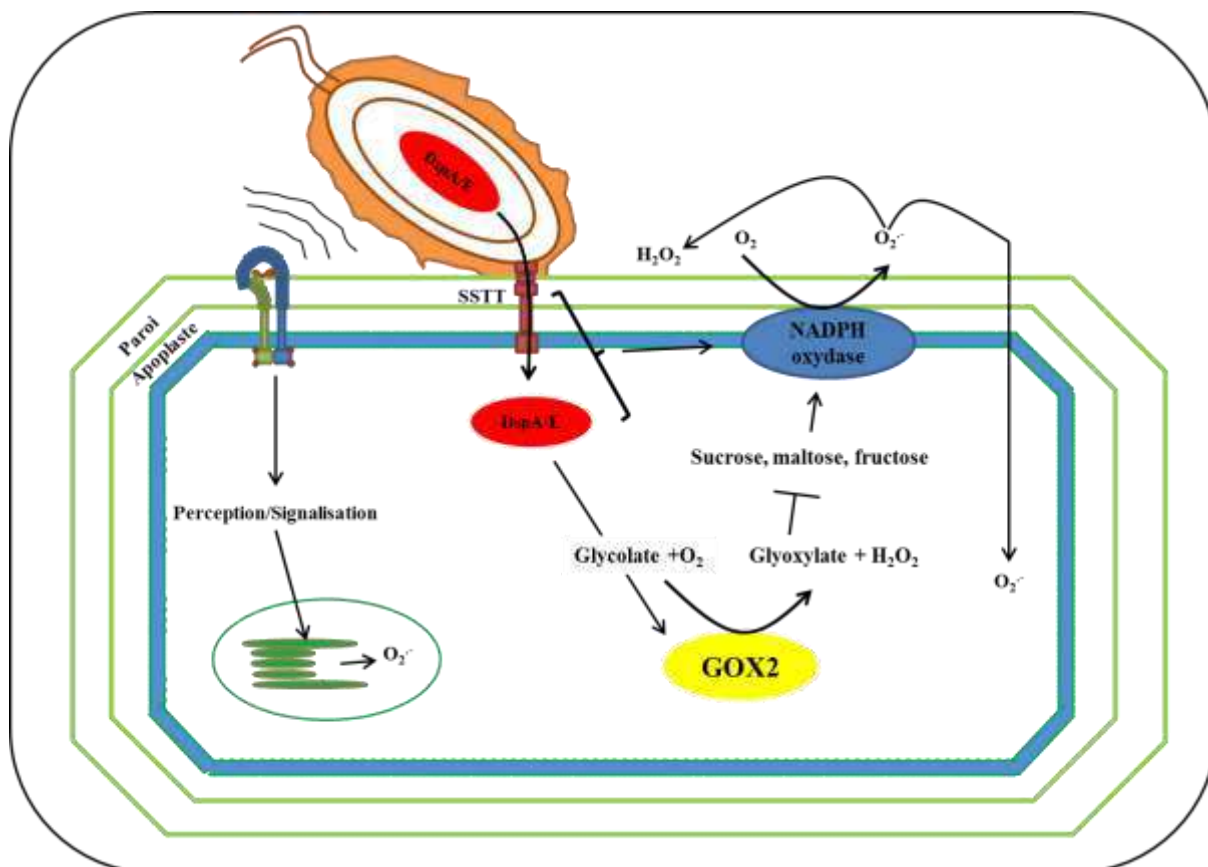


**Figure 55: Hypothèses concernant les défenses multi-couches chez *A. thaliana* en réponse à *E. amylovora***

La bactérie *E. amylovora* se multiplie transitoirement chez *A. thaliana*. Deux jours après inoculation, la population bactérienne chute dans la plante sauvage (Degrave et al., 2008; trait noir). Dans le cas du mutant *eds1-2* (Moreau et al., 2012) ou *gox2-2* (Figure 39; trait violet), la population bactérienne fini par chuter également mais moins que dans le sauvage Col-0. On peut faire l'hypothèse que dans le cas d'un double mutant *eds1-2/gox2-2* (trait orange), la population bactérienne chuterait également mais se maintiendrait plus encore que dans un simple mutant. Enfin, dans le cas de l'utilisation de la CHX ou dans des mutants multiples (trait rouge), la population bactérienne se maintient au cours du temps (Moreau et al., 2012). Jpi: Jours post-inoculation

Une hypothèse alternative serait que la mort cellulaire observée, pourrait être l'association de deux types de mort cellulaire, c'est-à-dire une mort cellulaire déclenchée par DspA/E dans les premières heures de l'infection et une mort cellulaire de type HR dans les heures plus tardives de l'infection. Enfin, l'étude du pathosystème *A. thaliana/E. amylovora* a permis de montrer que la plante met en place un mécanisme de résistance non-hôte. Ce type de mécanisme est décrit comme étant une résistance multi-couches (Senthil-Kumar and Mysore, 2013). Nos résultats sur EDS1, sur la CHX et GOX2 (plus de croissance de la bactérie dans les mutants respectifs et en présence de CHX) suggèrent que la résistance mise en place dans le cas de notre pathosystème est une résistance multi-couches. Il serait intéressant de croiser les mutants des gènes EDS1, GOX2 mais aussi de callose synthase PMR4 afin de confirmer cette résistance multi-couche (Figure 55).





**Figure 56: Lien entre la glycolate oxydase et le stress oxydant**

La bactérie *E. amylovora* injecte son effecteur de type 3 DspA/E dans la cellule végétale. DspA/E va induire l'activité de la glycolate oxydase 2 qui oxyde le glycolate en glyoxylate et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'activité glycolate oxydase va perturber le métabolisme primaire de la cellule conduisant à inhiber l'accumulation d'hexoses solubles tels que le maltose, le sucrose et le fructose. Cette inhibition tend à empêcher l'activation de la NADPH oxydase.

### ***Quel est le lien entre la glycolate oxydase 2 et le stress oxydant ?***

Nos résultats montrent que la glycolate oxydase et le stress oxydant ont un rôle important au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*. En effet, la glycolate oxydase 2 a été identifiée comme étant un suppresseur de la toxicité induite par DspA/E (Chapitre 2). De plus, la bactérie *E. amylovora* n'induit plus de mort cellulaire et se multiplie 10 fois plus dans le mutant *gox2-2* que dans Col-0 et des réactions de défenses telles que l'expression de marqueurs de défenses ou la déposition de callose se retrouvent modulées différemment dans le mutant *gox2-2* par rapport à Col-0. Nos données sur le stress oxydant montrent que la bactérie *E. amylovora* induit plusieurs FAOs ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2^-$ ) et des indices nous indiquent que des espèces nitrosylées pourraient s'accumuler au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora* (Chapitre 3, Figure 43). Nos résultats montrent également que DspA/E induit, entre autre, un stress oxydant d'origine apoplastique (Figure 48) et que ce stress oxydant est perdu au niveau de l'apoplaste lorsque les plantes sont inoculées avec le mutant bactérien *dspA/E* ainsi que dans le suppresseur *II-36-1* (Figure 48) et le mutant *gox2-2* (résultats non présentés). Ensuite, nos résultats montrent que l'activité glycolate oxydase augmente en réponse à la bactérie et ceci est dépendant de DspA/E. Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre la glycolate oxydase et le stress oxydant au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*.

Dans la discussion de leur étude, Rojas et al., 2012 expliquent que le rôle des glycolate oxydases 1 et 2 reste à élucider. Ces deux enzymes sont impliquées dans la photorespiration et il semble que leur mécanisme d'action soit d'être impliquées dans le changement du métabolisme primaire (Foyer et al., 2009). Les auteurs expliquent que le rôle de ces enzymes au cours de la résistance non-hôte ne serait pas directement relié à la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  mais plutôt à l'interconnexion entre les FAOs et les sucres solubles (Couée et al., 2006; Rojas et al., 2012). Ceci est cohérent avec nos données de métabolome. En effet, on observe une augmentation des sucres solubles issus du métabolisme primaire, le fructose, le sucrose et le maltose dans la lignée 13-1-2 portant DspA/E ainsi que dans des plantes sauvages infectées par *E. amylovora*. La glycolate oxydase 2 semble impliquée dans cette augmentation (résultats non présentés). Ainsi, lorsque l'effecteur DspA/E est injecté dans la cellule, il va activer la glycolate oxydase. Cette activation va provoquer une perturbation dans le métabolisme des sucres, ce qui va empêcher la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  via la NADPH oxydase. Cependant, la perturbation du métabolisme des sucres et le lien entre la NADPH oxydase et les sucres reste à déterminer. Les hypothèses concernant le lien entre le stress oxydant et la glycolate oxydase 2 sont présentées en Figure 56.



# **Matériel et méthodes**

## I. Matériel biologique.

### 1. Matériel végétal

Les plantes utilisées au cours de cette thèse sont décrites dans les manuscrits (Degrave et al., 2008, 2013). Les graines des écotypes Col-0 et Ler-0 proviennent de l'institut National de recherche agronomique (INRA). Les mutants d'insertion ADN-T proviennent du NASC. Les mutants *gox2-2* ont été donnés par l'équipe de Kirankumar Mysore (SALK\_044052, insertion située 300 paires de bases avant le 5'UTR). La lignée stable exprimant la RFP est issue de l'étude de (Mano et al., 2004). Les lignées transgéniques exprimant la GFP ou DspA/E proviennent d'une transformation de l'écotype Col-0 transformé avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* souche C58C1 en utilisant la méthode de trempage floral selon (Clough and Bent, 1998). Les mutants supresseurs sont issus de la lignée transgénique 13-1-2 mutagénisée à l'EMS qui est un composé mutagène qui chez *A. thaliana* provoque dans la majorité des cas (99%) des changements d'une cytosine en thymine conduisant à la substitution d'un couple cytosine/guanine en thymine/adénine dans l'ADN. A plus faible fréquence, l'EMS peut générer des transversions guanine/cytosine à cytosine/guanine ou thymine/adénine. De façon plus rare des réarrangements du génome peuvent s'effectuer et des séquences d'ADN peuvent être tronquées. Ce composé va générer des mutations aléatoirement dans le génome d'*A. thaliana* (Kim et al., 2006). La dénomination des supresseurs (*I-18-1*, *I-40-1*, *I-50-1* et *II-36-1*) a été choisie de la façon suivante : Le chiffre romain (I ou II) correspond à la concentration en EMS utilisée (0.2 ou 0.4%). Le second numéro (18, 40, 50 ou 36) correspond au pool récupéré en génération M2. Le dernier numéro correspond au mutant résistant putatif récupéré en M2

### 2. Conditions de culture

Pour la croissance en chambres de culture, les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 5 à 6 semaines et inoculées selon la méthode décrite dans (Degrave et al., 2008). Pour la culture *in vitro*, les graines ont été semées sur milieu MS 1% de sucrose, pH 5.7 après avoir été stérilisées avec un mélange éthanol-javel (1 mL d'une solution mère de 40 mL de barychlore dans 9 mL d'éthanol 100%) pendant 8 minutes et rincées deux fois pendant 1 minute. Les graines ont été ensuite vernalisées pendant 48h à 4°C. Les plantules ont ensuite poussées selon un cycle de 16 heures de jour et 8 heures de nuit avec respectivement des températures de 25°C et 20°C. Pour les plantes qui ont été cultivées en présence d'estradiol (17-beta estradiol, St Louis, OH, USA) le composé a directement été incorporé dans le milieu. Pour l'incubation, les plantes ont été traitées à l'estradiol soit par immersion totale pendant 10 à 20 minutes pour les extractions protéiques et nucléiques soit par traitements en gouttes de 20 µL pour l'élongation racinaire.

### 3. Souches bactérienne

Les souches bactériennes utilisées sont décrites dans (Degrave et al., 2008, 2013). La souche sauvage d'origine d'*E. amylovora* provient de la collection française des bactéries phytopathogènes (CFPB 1430). Les souches utilisées, sont stockées à -80°C dans du milieu Luria

Bertani (LB) et du glycérol 40%, 1/1, V/V et sont cultivées sur milieu solide LB agar (Bacto-tryptone 10 g.L<sup>-1</sup>, extrait de levure 5 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.L<sup>-1</sup> et agar 15 g.L<sup>-1</sup>, pH 7) avec un antibiotique de sélection. Au bout de 3 jours de croissance, les bactéries peuvent être cultivées dans un milieu LB liquide sur la nuit à 30°C et être transférées sur milieu LB solide le lendemain matin afin d'effectuer les inoculations en fin de journée. Les bactéries sont remises en suspension au bout de 8 heures et la densité optique (DO) de la culture est mesurée. Une suspension à une DO de 0,1 (10<sup>8</sup> bactéries. mL<sup>-1</sup>) est utilisée pour inoculer les feuilles.

## II. Méthodes

### 1. Méthodes d'infections

Les plantes d'*A. thaliana* âgées de 5 semaines sont inoculées avec les différentes souches d'*E. amylovora* dans de l'eau stérile. Dans le cas des analyses de stress oxydatif, le demi-limbe droit est inoculé afin de vérifier si le stress se propage à la feuille entière. Dans le cas d'analyses de symptômes ou de croissance bactérienne la feuille entière est inoculée. L'inoculation se fait à l'aide d'une seringue sans aiguille qui est appliquée sur la face abaxiale de la feuille.

### 2. Comptage bactérien

La mesure s'effectue par comptage des unités formant une colonie (UFC). Les plantes sont inoculées la veille au soir, puis les feuilles récupérées une à une et prises en photo afin de mesurer la surface foliaire avant d'être placées dans des tubes Eppendorf Safelock<sup>®</sup> de 2 mL contenant deux billes de verre. Les feuilles sont ensuite broyées séparément à l'aide du broyeur à bille TissueLyser II Qiagen<sup>®</sup> à une fréquence de 30 à 50 Hz. Le broyat est récupéré dans 500 µL d'eau stérile, 20 µL de ce broyat est récupéré et déposé dans 180 µL d'eau stérile et des dilutions sériées au 10<sup>ème</sup> du broyat sont effectuées en plaque de microtitration. Un dépôt de 5 µL de toutes les dilutions est effectué deux fois afin d'établir une moyenne du nombre de colonie par dilution sur milieu LB solide supplémenté avec un antibiotique de sélection selon la souche bactérienne utilisée. Les boîtes sont ensuite placées à 30°C pendant une journée et le nombre de colonies est compté et rapporté à la surface foliaire.

### 3. Méthodes de biologie moléculaire

#### 3.1 Génotypage

L'identification de mutants homozygotes, s'effectue à l'aide de la réaction de polymérase en chaîne. L'ADN génomique, est extrait à l'aide du tampon CTAB (Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM beta-Mercaptoethanol 0.2% et CTAB 2%), selon le protocole d'extraction de Doyle et Doyle, 1990. Les échantillons sont broyés à froid dans de l'azote liquide à l'aide du TissueLyser II Qiagen<sup>®</sup>. Ils sont ensuite incubés pendant 30 minutes dans 800 µL de tampon CTAB pendant 30 minutes (agités toutes les 10 minutes). 800 µL de chloroforme alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés. Les échantillons sont mis à centrifuger pendant 10 minutes à 7000 rpm. 600 µL de la phase aqueuse sont récupérés et l'ADN est précipité à l'aide de 600 µL

d'isopropanol rajoutés. Les échantillons sont de nouveaux centrifugés à 7000 rpm pendant 15 minutes. Le culot d'ADN est ensuite rincé à l'aide de 1200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 75%. Les culots sont repris dans 20 à 30  $\mu\text{L}$  d'eau stérile.

La réaction de PCR est préparée en Super mix contenant de l'eau osmosée (12,2 $\mu\text{L}$ ), du tampon 10X (2 $\mu\text{L}$ ), d'un mélange des 4 nucléotides à 2,5 mM (2 $\mu\text{L}$ ), de  $\text{MgCl}_2$  à 50 mM (0,6 $\mu\text{L}$ ), des oligonucléotides à 10 $\mu\text{M}$  (0,3 $\mu\text{L}$  de chaque) et de la *Taq* DNA polymérase Recombinant à 5 U. $\mu\text{L}^{-1}$  (0,2 $\mu\text{L}$ ) de chez Invitrogen<sup>®</sup>. Le volume réactionnel final est de 20  $\mu\text{L}$  et la réaction est effectuée avec 1  $\mu\text{L}$  de matrice. L'amplification est effectuée dans le thermocycleur TC-512 (TECHNE<sup>®</sup>). Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1% contenant 0,02 mg de BET pour 100 mL. La visualisation des signaux est effectuée grâce à une enceinte UV.

### 3.2 Extraction ADN nucléaire au CTAB

Le matériel végétal une fois prélevé est broyé à l'aide d'azote liquide (environ 4 g pour 400 disques foliaires issus de 100 plantes F2 des supprimeurs). La poudre est transférée dans un tube Falcon<sup>®</sup> 50 mL qui contient 40 mL de tampon d'extraction de noyaux (10 mM TRIS-HCl pH 9.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 500 mM sucrose, 4 mM spermidine, 1 mM spermine et 0.1%  $\beta\text{ME}$ ). Le mélange est vortexé puis filtré à l'aide d'une toile à bluter d'une porosité de 25  $\mu\text{M}$  dans un tube Falcon<sup>®</sup> de 50 mL. Le liquide est récupéré par gravité dans un premier temps puis le reste dans la toile à bluter est récupéré par centrifugation à 2000 rpm et à 4°C pendant 30s (la toile à bluter est bloquée au préalable dans le pas de vis du tube). Ensuite 8 mL de tampon d'extraction des noyaux supplémenté avec du triton X-100 à 10% et du  $\beta\text{ME}$  à 0.1% est rajouté. Ce mélange est mis à incuber pendant 2 minutes sur de la glace puis est agiter doucement pendant 2 minutes. Le tout est ensuite centrifugé à 4500 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot de noyaux est visible à cette étape et apparait vert-clair voir blanc. Le surnageant est éliminé et l'extraction d'ADN au CTAB (100 mM Tris pH 7.5, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% et CTAB 1% s'effectue par la suite. 2 mL du tampon CTAB préchauffé sont ajouter au culot. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 60°C (mélangé toutes les 10 minutes) puis laissé à refroidir pendant 5 minutes à température ambiante. Le tout est réparti dans 2 tubes Eppendorf de 2 mL. 700  $\mu\text{L}$  de chloroforme alcool isoamylique (24 :1) froid sont ajoutés et le tout est agité pendant 2 minutes. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 6000 rpm à température ambiante. La phase supérieure aqueuse est transférée dans 2 tubes Eppendorf et le même volume d'isopropanol est ajouté. Le tout est mélangé pendant 1 minute et mis à centrifugé 5 minutes à 13000 rpm à température ambiante. Le culot d'ADN nucléaire est rincer avec 1 mL d'éthanol 75% et centrifuger pendant 5 minutes à 13000 rpm. L'éthanol est retiré, le culot séché et repris dans 50  $\mu\text{L}$  de TE.

### 3.3 Extraction et dosage d'ARN

Les échantillons sont broyés à froid dans de l'azote liquide en vue de limiter la dégradation des ARNs. Les ARNs sont extraits à l'aide du TRIZOL<sup>®</sup> qui contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup>, puis centrifugés pendant 10 minutes à 12000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et mis à incuber



pendant 5 minutes à température ambiante, permettant une complète dissociation des acides nucléoprotéiques. Afin d'éliminer le phénol, 0.2 mL de chloroforme sont ajoutés et une mise en incubation de 3 minutes est effectuée à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 12000 rpm à 4°C. La phase supérieure aqueuse contenant les ARNs est récupérée et transférée dans un nouveau tube, 0.5 mL d'Isopropanol par mL de TRIZOL<sup>®</sup> utilisés sont ajoutés afin de permettre la précipitation des ARNs. Un temps d'incubation de 10 minutes est effectué, suivit d'une étape de centrifugation de 10 minutes à 12000 rpm à 4°C. Le culot d'ARNs est rincé à l'éthanol 75% et mis à centrifuger à 7500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est finalement séché et resuspendu dans 30 µL d'eau DEPC. Les ARNs sont ensuite stockés à -80°C. La concentration des ARN est mesurée deux fois avec un Nanodrop<sup>®</sup> à une longueur d'onde de 260 nm. Afin de vérifier l'intégrité des ARNs, 1 µg peut être déposé sur gel d'agarose 1%, la réaction de rétro transcription est par la suite effectuée.

Les ARNs sont dans un premier temps traités à la DNase (Désoxyribonucléase I RNase free (1U) de chez Thermo Scientific<sup>®</sup>). 1 µg d'ARNs sont traités avec 1 µL de tampon 10X supplémenté avec du MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de DNase dans un volume final qsp eau DEPC. La réaction de rétro transcription, est effectuée grâce au kit RevertAid Reverse Transcriptase de chez Thermo Scientific<sup>®</sup>. Une première étape de dénaturation de 5 µL d'ARNs et d'hybridation en présence de 1 µL d'oligodT à 0.5 µg.µL<sup>-1</sup> est effectuée à 65°C pendant 5 minutes dans un volume final de 12.5 µL. La seconde étape, correspond à la rétro transcription en présence de 4 µL de tampon 5X, de 0.5 µL de Riboblock<sup>®</sup>, de 2µL de dNTP à 10 mM et de 1 µL de RevertAid à 42°C pendant 1h. Une dernière étape d'inactivation de l'enzyme est réalisée pendant 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont repris dans 180 µL d'eau Osmosée.

### 3.4 PCR quantitative (qPCR)

La réaction de PCR quantitative a été effectuée à l'aide de l'agent fluorescent intercalant; le SYBR Green. La réaction de qPCR, est préparée sur des plaques de quantification de 96 puits de chez Applied biosystem<sup>®</sup>. La réaction est également préparée en Master mix, chaque puits contient 1.5 µL d'eau osmosée, 0.5µL du primer Forward et 0.5 µL du primer Reverse à 10 µM, de 5 µL de mix pour qPCR de chez Applied biosystem<sup>®</sup> contenant les dNTP, le tampon 10X, la taq polymérase ainsi que le SYBR Green. La réaction est effectuée avec 2.5 µL de matrice dans un volume final de 10 µL. Le thermocycleur utilisé est le système 7300 qPCR de chez Applied Biosystems<sup>®</sup>.

Pour les PCR quantitatives effectuées sur le thermocycleur Biorad<sup>®</sup> CFX96. Le mix employé pour chaque échantillon est le suivant : 4 µL d'eau osmosée, 0.5 µL du primer Forward et 0.5 µL du primer Reverse à 0.3 µM, de 7.5 µL de mix pour qPCR de chez Applied biosystem<sup>®</sup> et 2.5 µL de matrice dans un volume final de 15 µL.

Le programme employé pour les deux appareils est le suivant : La première étape est de 5 minutes à 95°C. La seconde étape est de 15 secondes à 95°C. La troisième étape est de 1 minute à 60°C et une lecture de la plaque est effectuée. Les étapes 2 à 3 sont répétées 39 fois à partir de la troisième étape. La quatrième étape est de 15 secondes à 95°C et l'étape 5 est une étape permettant de faire une courbe de dissociation des amorces. Elle commence à 60°C et par

incrémentations de 0.5°C, la température monte à 95°C. Une lecture de plaque est effectuée à cette étape.

### 3.5 Clonage du gène *GOX2* en Gateway

Le plasmide pda09796 (10 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) contenant la séquence codante du gène *GOX2* a été commandé sur le site du RIKEN. Les primers utilisés pour effectuer le clonage en Gateway sont les suivants :

Start gox2-2-F: 5'**GGA GAT AGA ACC** ATG GAG ATC ACT AAC GTT ACC GA 3'

Stop gox2-2-R: 5'**TCC ACC TCC GGA TC** CTA TAA CCT GGG CAA ATG GC 3'

End gox2-2-R: 5'**TCC ACC TCC GGA TC** **A**TA TAA CCT GGG CAA ATG GC 3'

La partie surlignée en vert est la séquence U5 du primer pour le gateway et en bleu la séquence U3 (Primers universels qui contiennent les sites de recombinaison attB1 et attB2). Ces deux primers sont fusionnés respectivement aux oligos Forward et Reverse en amont et en aval de la séquence codante du gène *GOX2*. L'utilisation des primers Start et Stop permettra de conserver le codon stop du gène et de greffer la GFP dans la partie N-terminale du gène. Sur le primer End le nucléotide en rouge indique une suppression du codon Stop dans la séquence du gène ceci permettra de greffer la GFP dans la partie C-terminale du gène.

Dans un premier temps, une PCR clonage avec les oligos ci-dessus (Start gox2-2-F/Stop gox2-2-R et Start gox2-2-F/End gox2-2-R) et la Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ ) de chez thermo Scientific<sup>®</sup> est effectuée sur le plasmide pda09796 (20 cycles,  $T_m=58^\circ\text{C}$ , temps d'élongation=1min30s à  $72^\circ\text{C}$ , taille attendue 1200 pb). Une seconde PCR est lancée avec 1  $\mu\text{L}$  de la première PCR avec les oligos U3/U5 (même conditions de PCR). Les bandes sont extraites du gel et purifiées avec le kit Wizard SV gel and PCR clean-up system<sup>®</sup>. La concentration des produits PCR est mesurée au Nanodrop<sup>®</sup> et une BP réaction est lancée avec le plasmide pDONR207 (qui contient les sites attP1 et attP2 qui vont recombiner avec attB1 et attB2) portant un gène de résistance à la gentamycine. La BP réaction est effectuée avec 0.5  $\mu\text{L}$  de l'enzyme BP clonase Gateway II enzyme Mix de chez Invitrogen<sup>®</sup>, 65 ng de produit PCR, 65 ng du pDONR207, 1  $\mu\text{L}$  du tampon de l'enzyme et eau qsp 5 $\mu\text{L}$  dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL (tubes de transfo). L'incubation est effectuée à température ambiante pendant 3 jours. Ensuite 1  $\mu\text{L}$  de protéinase K est rajouté dans les tubes et le tout est passé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes. 50  $\mu\text{L}$  de bactéries Top10 chimiocompétentes One Shot<sup>®</sup> sont ajoutés. Le tout est mis à incubé à  $42^\circ\text{C}$  pendant 45 secondes et placé sur de la glace. 1 mL de milieu LB est ajouté dans les tubes de transfo qui sont mis à incuber pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation (120 rpm). 300  $\mu\text{L}$  de ces tubes sont ensuite étalés sur milieu LB supplémentés avec de la Gentamycine à  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Au bout de 24 heures des colonies se forment sur les boîtes. Des PCR ( $T_m=58^\circ\text{C}$ , Temps élongation=1 minute à  $72^\circ\text{C}$  et 30 cycles) sur 8 colonies par boîtes sont effectuées à l'aide d'un oligo forward situé dans le plasmide pDONR207 (Seq\_LA-F) et un oligo Reverse situé dans le deuxième exon du gène *GOX2* (AT3G14415-RP). Les clones pour lesquels la présence du gène *GOX2* est confirmée sont amplifiés en culture liquide (LB+ Gentamycine à  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) pendant une nuit à  $37^\circ\text{C}$ . Le lendemain 500  $\mu\text{L}$  de ces suspensions bactériennes sont récupérées et mises

dans 500  $\mu\text{L}$  de glycérol 80% afin de conserver les clones à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le reste des suspensions est utilisé pour purifier les plasmides à l'aide du kit Roche (High pure plasmid isolation kit<sup>®</sup>). La concentration en plasmide est mesurée au Nanodrop<sup>®</sup> et une partie est envoyée au séquençage pour vérifier que la séquence du gène soit dépourvue de mutations avant la transformation des protoplastes pour la localisation de la protéine GOX2.

Avant la transformation des protoplastes, une réaction LR est effectuée avec les plasmides pDONR207 contenant le gène *GOX2* avec ou sans la mutation supprimant le codon stop, avec le plasmide pMDC43 permettant de greffer la GFP en N-terminal ou le plasmide pMDC83 permettant de greffer la GFP en C-terminal. 80 ng du plasmide pDONR207 (stop ou end) sont mélangés avec 80 ng du plasmide pMDC43 ou 83, 1  $\mu\text{L}$  de tampon 5X, 1  $\mu\text{L}$  de LR enzyme clonase de chez Invitrogen<sup>®</sup> et eau qsp 5  $\mu\text{L}$ . Les mélanges sont mis à incuber pendant 3 heures à température ambiante. Ensuite 0.5  $\mu\text{L}$  de protéinase K sont rajoutés, une incubation de 10 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  est effectuée. 50  $\mu\text{L}$  De bactéries Top 10 chimiocompétentes sont transformées pendant 45 secondes à  $37^{\circ}\text{C}$ . 1 mL de LB est rajouté et les bactéries sont mises sous agitation pendant 1 heure à  $37^{\circ}\text{C}$ . Ensuite 150  $\mu\text{L}$  des tubes de transfo sont étalés sur LB supplémenté avec la Kanamycine à  $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (gène de résistance à l'antibiotique présent sur les plasmides pMDC). Une PCR est effectuée sur les colonies formées sur les boîtes de LB afin de vérifier que la transformation a été effectuée à l'aide d'un oligo situé dans la GFP (eGFP 591-F) et l'oligo AT3G14415-RP ( $T_m=58^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes et température élévation  $72^{\circ}\text{C}$  pendant 1 minute 30 secondes). Une fois la vérification faite, les clones sont amplifiés en milieu liquide supplémenté avec de la Kanamycine à  $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de façon à récupérer un maximum de  $\mu\text{g}$  de plasmide pour la transformation des protoplastes. Les plasmides sont récupérés par MiniPreps effectuées à l'aide d'un kit Qiagen<sup>®</sup>.

### 3.6 Isolement et transformation des protoplastes

Les protoplastes sont isolés à partir de plantules des lignées Col-0 et RFP-Peroxisome âgées de 10 jours à partir de 2 g de matériel végétal frais. Les 2 g pour chaque lignée sont broyés dans un volume de 15 mL d'une solution TVL (0.3 M sorbitol et 50 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Le tout est ensuite transféré dans une solution enzymatique (0.5 M sucrose, 10 mM MES-KOH pH5.7, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 40 mM KCl, 1% Cellulase [Onozuka R-10] et 1% Macerozyme [R10]). Le tout est transféré dans un bécher qui est parafilmé et protégé de la lumière et mis en agitation à 35 rpm pendant une nuit. Le lendemain matin, la préparation est filtrée avec une étamine à fromage pré-humidifiée avec une solution W5 (0.1% glucose, 0.08% KCl, 0.9% NaCl, 1.84%  $\text{CaCl}_2$  et 2 mM MES-KOH pH5.7) dans un tube Falcon<sup>®</sup> 50 mL. La solution est recouverte avec 10 mL de solution W5 qui constitue le gradient de sucrose. Le tout est centrifugé 2 minutes à 100g (Eviter les systèmes de freinage et le froid). Après l'étape de centrifugation, les protoplastes sont collectés au niveau de l'interface entre la solution d'enzyme et la solution W5 dans un Falcon<sup>®</sup> 15 mL. Les protoplastes sont ensuite centrifugés 2 minutes à 100g (pas besoin de précautions particulières) trois fois et rincés avec 5 mL de solution W5 entre chaque centrifugation. Après le dernier rinçage, les protoplastes sont resuspendus dans 1 mL de solution MMG (4 mM MES-KOH pH 5.7, 0.4 M mannitol et 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

Pour l'étape de transfection des protoplastes par les constructions GOX2/GFP, 10 µL de plasmide de chaque construction (concentrées à 1 µg et 2.5 µg) sont mélangés avec 100 µL de protoplastes dans le MMG et 110 µL de PEG. Le tout est mélangé et mis à incubé 20 minutes à l'obscurité. 600 µL du tampon W5 sont ensuite ajoutés, le mélange est centrifugé à 100g pendant 2 minutes et le surnageant est retiré. 500 µL du tampon W5 sont ajoutés et le tout est incubé la nuit à l'obscurité à température ambiante dans une plaque de titration. Les observations sont faites avec un microscope confocal SP2 Leica®.

### 3.7 Isolement des supresseurs sans DspA/E

Afin d'isoler les supresseurs sans l'effecteur DspA/E, il a fallu récupérer les plantes F2 issues du croisement entre les supresseurs et Col-0. Ces F2 sont passées sur estradiol de façon à éliminer les plantes qui portent DspA/E sans la mutation ou qui portent DspA/E avec la mutation à l'état hétérozygote (9/16 de plantes ne germant pas). Les plantes qui germent sur estradiol sont ensuite repiquées en chambre de culture afin d'être génotypées par la suite. Parmi ces plantes survivantes, on trouve des plantes portant DspA/E et la mutation à l'état homozygote (1/16), des plantes portant DspA/E à l'état hétérozygote et la mutation à l'état homozygote (2/16). Cela fait en tout 3/16 de plantes que l'on élimine après le génotypage de DspA/E par PCR. Le reste des plantes a été génotypé par la méthode des CAPS. Parmi les plantes restantes, les plantes intéressantes ne représentent que 1/16 du total. Les autres plantes portent la mutation à l'état hétérozygote (2/16) ou ne la porte pas (1/16). Ce qui signifie que sur 100 plantes, seulement 6 plantes porteront la mutation à l'état homozygote. Le génotypage par CAPS a été effectué à l'aide des amorces GOXI181-F(TTACAGATTACTACATCAACG) et GOXExon3/4-R (CTACTCAGAACAATCATAACG) et l'enzyme de restriction LweI (SfaNI) pour le supresseur *II-36-1*. Pour le supresseur *I-18-1*, le génotypage a été effectué avec les amorces GOXI361-F (GATGTGAACAAAATTGATATG) et GOXI361-R (GATGTGAACAAAATTGATATG) et l'enzyme de restriction MwoI (HpyF10VI). Un exemple d'identification par marqueur CAPS pour le supresseur *I-18-1* est présenté en annexe 3.

## 4. Méthodes de biochimie

### 4.1 Incorporation à la méthionine 35<sup>S</sup>

L'incorporation à la méthionine marquée et la migration des protéines totales sont décrites dans Degrave *et al.* (2013).

### 4.2 Dépôt de callose

La procédure pour la dépôt de callose est décrite dans Degrave *et al.* (2008).

### 4.3 Mesure de l'activité glycolate oxydase

Les échantillons sont broyés à l'aide du TissueLyser II Qiagen® à froid dans des Eppendorf de 2ml contenant 2 billes de verre. L'enzyme est récupérée des extraits protéiques grâce à des

colonnes NAP-5 Sephadex G-25 DNA grade de GE Healthcare®. Les colonnes sont équilibrées avec 10 mL (4 x 2.5 mL) de tampon Tris (50 mM pH8). Les échantillons en poudre sont resuspendus avec 600 µL de tampon Tris supplémenté avec un cocktail anti-protéases. Le tout est centrifugé pendant 10 minutes à 14000 RPM. 550 µL des échantillons sont récupérés et placés dans une nouvelle série de tube Eppendorf 1.5 mL. Le tout est centrifugé 5 minutes pour éliminer les débris. 500 µL sont récupérés et passés sur les colonnes équilibrées. On élue les colonnes avec 1 mL de tampon Tris dans une nouvelle série d'Eppendorf. Un Bradford à 595 nM est effectué sur les extraits protéiques. L'activité glycolate oxydase se mesure à 30°C. Pour chaque échantillon, 730 µl de Tris à 30°C sont ajoutés, 50 µL d'O-Dianisidine à 8 mM (Sigma®), 10 µL de glycolate à 1 M (Sigma) et 200 µL de l'échantillon dans la cuve du spectrophotomètre. Le tout est mélangé à l'aide d'une spatule puis rapidement 10 µL de peroxydase à 1 mg.mL<sup>-1</sup> sont ajoutés. Le tout est mélangé et la cinétique est lancée pendant 5 minutes. Lorsque la courbe de vitesse d'apparition du substrat (l-odanisidine oxydée) est en phase linéaire un intervalle de temps de 1 minute est relevé pour mesurer la vitesse de la réaction.

#### 4.4 Mesure des sphingolipides totaux

La procédure pour la mesure des sphingolipides totaux est décrite dans (Markham and Jaworski, 2007). Les mesures en contenus des sphingolipides dans notre étude ont été effectuées sur des plantules âgées de 10 à 12 jours et cultivées en jours long.

#### 4.5 Dosage des métabolites

Des plantes âgées de 5 semaines ont été infiltrées à l'eau ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* ou le mutant de DspA/E (*dspA/E*). 5 à 6 feuilles pour chaque conditions ont été prélevées dans de l'azote liquide et broyées. Entre 15 et 25 mg de poudre ont été traitées sur la plate-forme métabolomique de l'observatoire végétal en GC-MS Agilent. La poudre est mélangée dans 2 mL de méthanol à 80% puis du ribitol à 100 mmol est ajouté comme étalon interne. Les échantillons sont ensuite dérivés. La GC/MS Agilent de l'observatoire du végétal possède une source à Impact électronique (EI) et une source à Ionisation chimique (CI). Un analyseur quadripolaire permet la caractérisation et la reconnaissance des métabolites à l'aide d'une bibliothèque. Le traitement des résultats se fait par une Analyse en Composante Principale (ACP). La mesure des métabolites, a également été effectuée sur des plantules âgées de 10 à 12 jours induites ou non avec de l'estradiol 5 µM. Ces plantules ont subi le même traitement que pour les feuilles inoculées (<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/fr/plateformes/Observatoire-du-vegetal.html>).

### 5. Mesure du stress oxydant

#### 5.1 Marquage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la 3,3'-DiAminoBenzidine (DAB)

Pour chaque traitement et génotype entre 5 et 9 feuilles ont été utilisées. Les feuilles ont été collectées 2 heures après traitement (inoculation ou infiltration) dans des tubes Falcon® de 50 mL contenant la solution de DAB à 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Cette solution de DAB est préparée à partir d'un

stock mère à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  dont le pH est ajusté entre 3.6 et 3.8. Le DAB est préparé dans de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite passés dans une enceinte qui permet de faire le vide. Le vide est appliqué progressivement jusqu'à atteindre une pression de -25 Pa. Les tubes restent 1 minute sous cette pression et la pression est relâchée doucement. Ceci permet au produit de s'infiltrer par les stomates dans l'ensemble de la feuille. Le vide est appliqué trois fois (Attention : Bien vérifier que chaque feuille est infiltrée). Les feuilles sont ensuite récupérées et placées dans des boîtes de Pétri contenant un papier humidifié. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité sur la nuit. 14 heures après infiltration du DAB les feuilles sont décolorées avec de l'éthanol 96% sous agitation douce. L'éthanol est régulièrement changé lorsqu'il est saturé en chlorophylle. Après décoloration totale les feuilles sont conservées dans de l'éthanol 70% ou du glycérol 25% avant d'être prises en photo.

### 5.2 Marquage à la 2',7'- Dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA)

Le DCFH-DA qui pénètre dans la cellule est déstérifié et oxydé par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire rendant ce composé fluorescent. La fluorescence est observable à la loupe à une excitation de 470 nm et une émission de 510 nm.

Le DCFH-DA est préparé à une concentration de 30 mM dans du DMSO puis dilué au  $100^{\text{ème}}$  dans de l'eau osmosée. Il est infiltré dans les feuilles sous vide (3 fois une minute). L'observation se fait à la loupe sous filtre GFP, à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure.

### 5.3 Marquage de l' $\text{O}_2^-$ au NitroBlueTétrazolium

Le NBT est préparé le jour même. Il est préparé à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate 100 mM pH 7.4. Les feuilles sont plongées pendant 15 minutes dans la solution de NBT et une seule infiltration sous vide est appliquée. La décoloration s'effectue comme pour le DAB (Attention : Le précipité bleu formé ne se conserve pas plus de 3 mois contrairement au précipité brun de DAB).

### 5.4 Marquage de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ au chlorure de cérium et préparation des échantillons pour les observations au microscope électronique

Des morceaux de 0.1 par 0.3 mm d'échantillons sont découpés dans les feuilles inoculées ou infiltrées. Les morceaux découpés ont ensuite été marqués au chlorure de cérium ( $\text{CeCl}_3$ ) 5 mM dans du tampon MOPS 50 mM pH 7.2 pendant 1 heures à température ambiante. Les échantillons sont ensuite fixés. Pour cela, ils sont plongés dans 3 mL de fixateur (tampon Cacodylate 0.1 M pH 7.2, 1.5% PFA (Paraformaldéhyde) et 2% GA (glutaraldéhyde)) dans des piluliers pendant 4 heures. Une alternance de vide/agitation est effectuée au cours de ces 4 heures afin de faire pénétrer le fixateur dans l'ensemble des tissus. Les échantillons sont ensuite lavés avec du tampon cacodylate 4 fois 15 minutes sous agitation. Ils sont stockés à l'obscurité pendant une nuit à  $4^\circ\text{C}$ . Le tampon cacodylate est remplacé par le post-fixateur (Cacodylate 0.1M pH 7.2 et  $\text{OsO}_4$  (TétraOxyde Osmium)). Les piluliers sont fermés et peuvent rester 1 heure à température ambiante ou 4 heures à  $4^\circ\text{C}$ . Les échantillons sont ensuite rincés avec de l'eau milliQ 3 fois 10



minutes sous agitation. Une déshydratation croissante à l'éthanol est ensuite effectuée pendant 30 minutes à chaque étape avec de l'éthanol 25% tout d'abord puis du 50%, du 70% (possible de laisser sur la nuit à 4°C) puis 85% et enfin 90% pendant une nuit à 4°C (possible pendant deux jours). 3 bains successifs d'éthanol 100% d'1 heure sont ensuite effectués. Les échantillons sont ensuite mis dans un mélange 50% éthanol absolu, 50% oxyde de propylène pendant 30 minutes et 3 bains successifs à l'oxyde de propylène de 30 minutes sont appliqués, le tout sous agitation afin de terminer la déshydratation et commencer l'imprégnation en résine. Un premier bain constitué de 2/3 oxyde de propylène et 1/3 résine Epon–Araldite est effectué pendant une nuit sous agitation à piluliers fermés. Un second bain 1/3 oxyde de propylène et 2/3 résine Epon–Araldite est effectué pendant 9 heures toujours sous agitation et à piluliers fermés. Les piluliers sont ouverts la nuit pour évaporation. Un bain de résine pure pendant 1 heure est ensuite effectué à piluliers fermés et un autre bain à piluliers fermés. L'inclusion en résine des échantillons est ensuite effectuée en moule-cercueils préalablement remplis avec de la résine. La polymérisation de la résine s'effectue pendant 48 heures dans une étuve à 60°C. Les blocs de résine formés contenant les échantillons sont ensuite démoulés et identifiés.

Les blocs sont ensuite préparés pour la coupe. Une première préparation grossière à la lame de rasoir est effectuée afin de passer uniquement l'échantillon pris dans la résine au microtome. Une série de premières coupes semi-épaisses (entre 50 et 100  $\mu$ M) est effectuée avec l'ultra microtome. Ces coupes sont passées dans du bleu de toluidine 0.1% et montées entre lame et lamelle à l'Eukitt<sup>®</sup> (Dominique Dutscher) afin de vérifier l'intégrité des tissus. Une fois la vérification faite, des coupes ultra-fines (entre 50 et 70 nm) sont effectuées à l'aide d'un rasoir en diamant. Les coupes sont ensuite récupérées sur grille de cuivre pour microscope électronique à transmission et sont observé avec le microscope Zeiss<sup>®</sup> Em912 Omega.

## 6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à l'arbre de choix des tests statistiques proposé par Anostat (<http://www.anostat.fr/>) ou par le site web SISA (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/>) ou par le site web proposé par l'UPMC et l'INSERM (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

## 7. Alignements de séquences

### Importation des données :

L'analyse des séquences s'effectue avec le logiciel CLC Genomics Workbench 6.0.2. Dans un premier temps, un espace de travail est créé (dossier avec les fichiers d'analyses). Ensuite les fichiers de séquence brute sont importés. Il faut cliquer sur « Import » et sélectionner les 2 fichiers en .fastq.gz. Le premier fichier correspond à la séquence en Forward et le second en Reverse. Dans les options générales, il faut cliquer sur « Paired reads » (ceci permet de sélectionner les deux sens de la séquence) et Discard read names (ceci permet de gagner de l'espace). Ne pas cocher « Discard quality scores ». Le séquençage a été effectué en Paired-end (Forward-Reverse), cette case est donc sélectionnée. La distance minimale à choisir est de 300 et



la distance maximale de 500. Dans les options Illumina, la case « Remove failed reads » est cochée. Et pour les « Quality scores », le séquençage ayant été effectué en qualité Illumina récente, la ligne « NCBI/Sanger or Illumina Pipeline 1.8 and later » est sélectionnée. Après avoir cliqué sur « Next », on sélectionne la case « Make Log » et une sauvegarde est effectuée dans le dossier de travail créé au début de l'analyse. Après avoir cliqué sur « Finish », le temps d'attente de l'importation de la séquence varie entre 15 et 30 minutes selon la puissance de l'ordinateur.

### **Alignement sur l'annotation du TAIR :**

Les alignements de séquences sont effectués avec l'annotation du TAIR10. Dans l'onglet « Toolbox », puis dans le dossier « NGS Core Tools », l'option « Map Reads to Reference » est sélectionnée. Dans la fenêtre, la séquence récemment importée est sélectionnée et se retrouve dans la colonne « Selected Elements ». Après avoir cliqué sur « Next », la séquence de référence sur laquelle la séquence d'intérêt est alignée est sélectionnée. Cette séquence est « Arabidopsis thaliana (Col-0 TAIR10) sequence ». « No masking » est sélectionné. Dans les options de mapping, le « Mismatch cost » doit être sur 1, « Insertion cost » reste à 3 et le « Deletion cost » à 3 également. Le « Length fraction » est modifié en 0,95 et le « Similarity fraction » à 0,99 si on souhaite être très stringent. Il est possible de diminuer la stringence en rentrant les paramètres à 0,9 et 0,95 respectivement. Ne pas cocher « Global alignment », laisser coché « Auto-detect paired distances » et laisser « Maps randomly » coché. Après avoir cliqué sur « Next », « Create reads track est sélectionné » ainsi que « Create report et Collect un-mapped reads », une sauvegarde est à effectuer dans le dossier de travail et un « Log » également. Après « Next », le logiciel aligne la séquence sur la référence du TAIR.

### **Détection de SNPs :**

La détection de SNPs s'effectue *via* l'onglet « Toolbox » dans le dossier « Resequencing Analysis », l'option « Quality-based Variant Detection » est sélectionnée. Dans la fenêtre, la séquence récemment alignée avec la séquence du TAIR est sélectionnée et se retrouve dans la colonne « Selected Elements ». Après avoir cliqué sur « Next », on sélectionne les filtres de qualité. Il faut établir une fenêtre de lecture autour du SNP. Pour cela on sélectionne le nombre de nucléotides autour du SNP. On choisit une fenêtre de 11 nucléotides (« Neighborhood radius ») autour de la mutation. On autorise un seul « Gap » et/ou « Mismatch ». La qualité minimale dans le voisinage du SNP est de 30 (« Minimum neighborhood quality ») et la qualité minimale du nucléotide central est de 40 (« Minimum central quality ») ce qui correspond à un choix de qualité minimale obtenue pour les séquences (appelées reads). Les cases « Ignore non-specific matches et Ignore broken pairs » restent cochées. Après avoir cliqué sur « Next », on sélectionne le minimum de couverture des SNPs, c'est-à-dire le nombre de séquences qui vont être identiques pour un SNP. Dans « Minimum coverage » le nombre 10 reste tel quel. Ensuite parmi les 10 séquences de couverture minimale on sélectionne un pourcentage d'apparition du SNP, dans « Minimum variant frequency (%) ». Ces deux derniers paramètres jouent directement sur la stringence de la recherche de SNPs. Dans un premier temps, une stringence forte est appliquée. Les paramètres « Minimum coverage » et « Minimum variant frequency (%) » sont à 10 et 100% respectivement. Il est possible ensuite de diminuer la stringence dans le cas où très peu de SNPs sont trouvés. Il est également possible d'être très peu stringent de façon à faire une cartographie

pour localiser le pic de SNPs permettant de localiser plus précisément une mutation d'intérêt. La case « Advanced » doit être cochée avec les paramètres « Maximum coverage à 200, « Required variant count » à 10 et « Sufficient variant count » à 200. Dans « Variant filters » la case « Require presence in both forward and reverse reads » doit être cochée. Après avoir cliqué sur « Next », laisser le niveau de ploïdie sur 2 et le code génétique sur standard. Après avoir cliqué de nouveau sur « Next », les cases « Create track », « Create annotated table » et « Make log » doivent être cochées. Sauvegarder et cliquer sur « Next » puis « Finish ». La recherche de SNPs se fait *via* le tableau généré par le logiciel (« Annotated table »). Le tableau est constitué de 16 colonnes. La première colonne (« Mapping ») présente la région de mapping où une variation dans la séquence a été identifiée par rapport à la séquence de référence du TAIR. Les résultats de mapping sont donnés dans l'ordre des chromosomes 1 à 5 et des organites mitochondrie (Mt) et plaste (Pt). La seconde colonne (« Reference position ») présente la position de référence du TAIR où le logiciel a détecté une variation dans la séquence d'intérêt. La troisième colonne (« Type ») présente le type de variation qui a été détectée. La quatrième colonne (« Length ») présente la longueur en nucléotides de la variation. La cinquième colonne (« Reference ») présente le nucléotide de la séquence de référence. La sixième colonne (« Allele ») présente la variation allélique de la séquence d'intérêt. La septième colonne (« Linkage ») indique le groupe de liaison d'appartenance de SNPs situés dans la même séquence (reads) dans le cas où plusieurs SNPs ont été détectés dans le même read. La huitième colonne (« Linkage ») indique si la variation est à l'état homozygote ou hétérozygote. La neuvième colonne (« Count ») indique le nombre de séquences pour lesquelles la variation est apparue. La dixième colonne (« Coverage ») indique la couverture, c'est-à-dire le nombre de reads présents à la position correspondante. La onzième colonne (« Frequency ») indique la fréquence à laquelle la variation a été détectée par le logiciel dans les séquences (Count/Coverage). La douzième colonne (« Forward/reverse balance ») indique si la part de présence d'une variation sur un read Forward et son complémentaire Reverse. Une variation présente dans les mêmes proportions sur les reads forward et reverse affichera une balance de 0.5. La treizième colonne (« Average quality ») indique la qualité de score (que l'on peut observer dans le fichier importé au départ) de la base ayant subi une variation. La quatorzième colonne (« Overlapping annotations ») indique si la variation est liée à une annotation (par exemple si la variation est située dans une séquence codante). La quinzième colonne (« Coding region change ») indique si la variation touche la séquence codante d'un gène. La dernière colonne (« Amino acid change ») indique si le changement de variation dans la séquence codante d'un gène provoque un changement d'acide aminé dans la séquence protéique ou si la mutation est synonyme.

### Commentaires :

Dans la « Navigation area », un fichier « Mapping summary report » a été créé par le logiciel après l'alignement avec la séquence de référence du TAIR. La consultation de ce document est nécessaire pour avoir une idée de la qualité de la séquence effectuée par le séquenceur. Une colonne « Total reads » donne le nombre de reads totaux séquencés. Par exemple, pour les supresseurs *I-18-1*, *I-40-1* et *II-36-1* le nombre total de reads était compris entre 65 et 80 millions contre 35 millions pour le supresseur *I-50-1*. Le logiciel donne également le pourcentage de reads qui ont pu ou non être alignés sur la séquence de référence. En

conséquence de ces résultats, la stringence pour l'alignement d'une séquence d'intérêt sur une séquence de référence pourra être revue. Par exemple, pour une même stringence (« Length fraction=0.90 et Similarity=0.95) pour les supresseurs *I-18-1* et *I-50-1*. Le pourcentage de reads qui ont pu être alignés sur la séquence de référence représentait 97% pour le supresseur *I-18-1* tandis que pour le supresseur *I-50-1* le nombre de reads qui ont pu être alignés ne représentait que 60%. Ces résultats indiquent que la séquence du supresseur *I-50-1* est de moins bonne qualité que les séquences des autres supresseurs. En conclusion il faut effectuer des analyses moins stringentes afin de pouvoir aligner plus de séquences sur la séquence de référence pour augmenter la possibilité de trouver des SNPs.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- A M Bocsanczy, S.V.B.** Contributions of the genome sequence of *Erwinia amylovora* to the fire blight community.
- Abbas, H.K., Tanaka, T., Duke, S.O., Porter, J.K., Wray, E.M., Hodges, L., Sessions, A.E., Wang, E., Merrill, A.H., Jr, and Riley, R.T.** (1994). Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.* **106**: 1085–1093.
- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 601–611.
- Agrios, G.N.** (2005). *Plant Pathology* (Academic Press).
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* **17**: 73–90.
- 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.
- Allan, A.C. and Fluhr, R.** (1997). Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell* **9**: 1559–1572.
- Ancona, V., Li, W., and Zhao, Y.** (2013). Alternative sigma factor RpoN and its modulation protein YhbH are indispensable for *Erwinia amylovora* virulence. *Mol. Plant Pathol.*
- Andro, T., Chambost, J.P., Kotoujansky, A., Cattaneo, J., Bertheau, Y., Barras, F., Van Gijsegem, F., and Coleno, A.** (1984). Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacteriol.* **160**: 1199–1203.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 14620–14625.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–399.
- Armbruster, U., Hertle, A., Makarenko, E., Zuhlke, J., Pribil, M., Dietzmann, A., Schliebner, I., Aseeva, E., Fenino, E., Scharfenberg, M., Voigt, C., and Leister, D.** (2009). Chloroplast Proteins without Cleavable Transit Peptides: Rare Exceptions or a Major Constituent of the Chloroplast Proteome? *Mol. Plant* **2**: 1325–1335.
- Asai, S., Mase, K., and Yoshioka, H.** (2010). Role of nitric oxide and reactive oxygen [corrected] species in disease resistance to necrotrophic pathogens. *Plant Signal. Behav.* **5**: 872–874.

- Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J., and Keen, N.T.** (1996). Syringolide 1 Triggers Ca<sup>2+</sup> Influx, K<sup>+</sup> Efflux, and Extracellular Alkalinization in Soybean Cells Carrying the Disease-Resistance Gene Rpg4. *Plant Physiol.* **112**: 297–302.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol. Microbiol.* **49**: 1537–1546.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369–377.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**: 2073–2076.
- VAN Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M., and VAN Kan, J.A.L.** (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 41–54.
- Balagué, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmström, S., Köhler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F., and Roby, D.** (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* **15**: 365–379.
- Barny, M.-A.** (1995). *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 333–340.
- Barny, M.A., Guinebretière, M.H., Marçais, B., Coissac, E., Paulin, J.P., and Laurent, J.** (1990). Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol. Microbiol.* **4**: 777–786.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P.** (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.
- Bashir, Z., Ahmad, A., Shafique, S., Anjum, T., Shafique, S., and Akram, W.** (2013). Hypersensitive response - A biophysical phenomenon of producers. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **3**: 105–110.
- Baulcombe, D.** (2013). Small RNA—the Secret of Noble Rot. *Science* **342**: 45–46.
- Bednarek, P.** (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 407–414.
- Bellemann, P. and Geider, K.** (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 931–940.

- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., and Yoshioka, H.** (2013). Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**: 271–277.
- Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D.C.** (1999). *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 266–292.
- Berkey, R., Bendigeri, D., and Xiao, S.** (2012). Spingolipids and Plant Defense/Disease: The “Death” Connection and Beyond. *Front. Plant Sci.* **3**.
- Berry, M.C., McGhee, G.C., Zhao, Y., and Sundin, G.W.** (2009). Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **291**: 80–87.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H., and Mansfield, J.W.** (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209–221.
- Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 454–456.
- Bitá, C.E. and Gerats, T.** (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Block, A. and Alfano, J.R.** (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 39–46.
- Boch, J. and Bonas, U.** (2010). *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 419–436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bocsanczy, A.M., Nissinen, R.M., Oh, C.-S., and Beer, S.V.** (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 425–434.
- Bogdanove, A.J., Bauer, D.W., and Beer, S.V.** (1998). *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *J. Bacteriol.* **180**: 2244–2247.
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., and Geider, K.** (1998). Colonization of Host Plants by the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* Marked with Genes for Bioluminescence and Fluorescence. *Phytopathology* **88**: 416–421.
- Boureau, T., ElMaarouf-Bouteau, H., Garnier, A., Brisset, M.-N., Perino, C., Pucheu, I., and Barny, M.-A.** (2006). DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**: 16–24.



- Boureau, T., Siamer, S., Perino, C., Gaubert, S., Patrit, O., Degrave, A., Fagard, M., Chevreau, E., and Barny, M.-A.** (2011). The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 24**: 577–584.
- Brisset, M.N. et al.** Inducteurs de défenses naturelles des plantes : Vergers. *Phytoma- Déf. Végétaux*: 20–24.
- Brisset, M.-N., Cesbron, S., Thomson, S.V., and Paulin, J.-P.** (2000). Acibenzolar-S-methyl Induces the Accumulation of Defense-related Enzymes in Apple and Protects from Fire Blight. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**: 529–536.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 15**: 109–119.
- Brito, B., Marenda, M., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (1999). prhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **31**: 237–251.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H.M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jørgensen, L.B., Brown, R.E., and Mundy, J.** (2002). Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**: 490–502.
- Buchko, G.W., Niemann, G., Baker, E.S., Belov, M.E., Smith, R.D., Heffron, F., Adkins, J.N., and McDermott, J.E.** (2010). A multi-pronged search for a common structural motif in the secretion signal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III effector proteins. *Mol. Biosyst.* **6**: 2448–2458.
- Bugert, P. and Geider, K.** (1995). Molecular analysis of the ams operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol. Microbiol.* **15**: 917–933.
- Büttner, D.** (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **MMBR 76**: 262–310.
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A., and Montesinos, E.** (2007). Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **10**: 123–132.
- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., Van de Weg, W.E., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., and Durel, C.-E.** (2005). Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **111**: 128–135.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Roby, D., and Rivas, S.** (2011). The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *Plant Cell* **23**: 3498–3511.

- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H., and Zhou, J.-M.** (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2527–2540.
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C.R., Dunn, T.M., and Cahoon, E.B.** (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* **18**: 3576–3593.
- Chen, Q., Han, Z., Jiang, H., Tian, D., and Yang, S.** (2010). Strong positive selection drives rapid diversification of R-genes in Arabidopsis relatives. *J. Mol. Evol.* **70**: 137–148.
- Chen, S. and Andreasson, E.** (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 743–758.
- Cheval, C., Aldon, D., Galaud, J.-P., and Ranty, B.** (2013). Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 1766–1771.
- Chien, C.-F., Mathieu, J., Hsu, C.-H., Boyle, P., Martin, G.B., and Lin, N.-C.** (2013). Nonhost resistance of tomato to the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a is due to a defective E3 ubiquitin ligase domain in *avrptobb728a*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **26**: 387–397.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465–476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E.** (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 451–485.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **16**: 735–743.
- Corbaz, R.** (1990). *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes* (PPUR presses polytechniques).
- Cornelis, G.R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 811–825.
- Costacurta, A. and Vanderleyden, J.** (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: 1–18.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., and El Amrani, A.** (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 449–459.

- Crow, J.P.** (1997). Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* **1**: 145–157.
- Curtin, J.F., Donovan, M., and Cotter, T.G.** (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* **265**: 49–72.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.
- Daniels, C.H., Fristensky, B., Wagoner, W., and Hadwiger, L.A.** (1987). Pea genes associated with non-host disease resistance to *Fusarium* are also active in race-specific disease resistance to *Pseudomonas*. *Plant Mol. Biol.* **8**: 309–316.
- Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S.T., Li, D., and Staskawicz, B.J.** (2005). Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. *Plant Cell* **17**: 1292–1305.
- Dean, P.** (2011). Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 1100–1125.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.-B., Nomura, K., and He, S.Y.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 9927–9932.
- Degrave, A.** (2009). Rôle de l'effecteur de type III DspA au cours de l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Erwinia amylovora* (Paris 11).
- Degrave, A., Fagard, M., Perino, C., Brisset, M.N., Gaubert, S., Laroche, S., Patrit, O., and Barny, M.-A.** (2008). *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**: 1076–1086.
- Degrave, A., Moreau, M., Launay, A., Barny, M.-A., Brisset, M.-N., Patrit, O., Tacconnat, L., Vedel, R., and Fagard, M.** (2013). The bacterial effector DspA/E is toxic in *Arabidopsis thaliana* and is required for multiplication and survival of fire blight pathogen. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 506–517.
- Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P., and Expert, D.** (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **11**: 734–742.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588.
- Denny, T.P.** (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 173–197.
- Desel, C., Hubbermann, E.M., Schwarz, K., and Krupinska, K.** (2007). Nitration of gamma-tocopherol in plant tissues. *Planta* **226**: 1311–1322.

- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 8024–8029.
- Deslandes, L. and Rivas, S.** (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* **17**: 644–655.
- Devadas, S.K., Enyedi, A., and Raina, R.** (2002). The Arabidopsis *hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **30**: 467–480.
- Devergne, J.-C.** (1998). *Maladies à virus des plantes ornementales* (Editions Quae).
- Dietrich, C.R., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M., and Cahoon, E.B.** (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **54**: 284–298.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 8888–8893.
- Douet, V., Expert, D., Barras, F., and Py, B.** (2009). *Erwinia chrysanthemi* Iron Metabolism: the Unexpected Implication of the Inner Membrane Platform within the Type II Secretion System. *J. Bacteriol.* **191**: 795–804.
- Drénou, C.** (1999). *La taille des arbres d'ornement: du pourquoi au comment* (Forêt privée française).
- Durel, C.-E., Denancé, C., and Brisset, M.-N.** (2009). Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes “Evereste” and *Malus floribunda* clone 821. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* **52**: 139–147.
- Egea, C., Alcázar, M.D., and Candela, M.E.** (1996). Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* **98**: 737–742.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199–206.
- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Périno, C., Rigault, M., Boucher, V., Shevchik, V.E., and Expert, D.** (2007). Arabidopsis *thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**: 794–805.
- Farineau, J. and Morot-Gaudry, J.-F.** (2006). *La Photosynthèse: processus physiques, moléculaires et physiologiques* (Editions Quae).
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C., and Zhou, J.-M.** (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**: 114–118.

- Fenselau, S. and Bonas, U.** (1995). Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **8**: 845–854.
- Flor, H.H.** (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275–296.
- Flor, H.H.** (1956). Mutations in Flax Rust Induced by Ultraviolet Radiation. *Science* **124**: 888–889.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., and Noctor, G.** (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 455–484.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* **155**: 2–18.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2013). Redox signaling in plants. *Antioxid. Redox Signal.* **18**: 2087–2090.
- Freschi, L.** (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* **4**: 398.
- Froidure, S., Roby, D., and Rivas, S.** (2010). Expression of the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 is post-transcriptionally regulated. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* **48**: 735–739.
- Fu, Z.Q. and Dong, X.** (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 839–863.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., and Ferrari, S.** (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **148**: 1695–1706.
- Gaudriault, S., Brisset, M.N., and Barny, M.A.** (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett.* **428**: 224–228.
- Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J.P., and Barny, M.A.** (1997). DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol. Microbiol.* **26**: 1057–1069.
- Gaudriault, S., Paulin, J.-P., and Barny, M.-A.** (2002). The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Mol. Plant Pathol.* **3**: 313–320.
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D., and Delledonne, M.** (2011). Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* **25**: 222–228.

- Gawarzewski, I., Smits, S.H.J., Schmitt, L., and Jose, J.** (2013). Structural comparison of the transport units of type V secretion systems. *Biol. Chem.* **394**: 1385–1398.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., and Mackey, D.** (2012). The Coronatine Toxin of *Pseudomonas syringae* Is a Multifunctional Suppressor of Arabidopsis Defense. *Plant Cell* **24**: 4763–4774.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C., and Boucher, C.A.** (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3065–3076.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**: 277–284.
- Goosens, V.J., Monteferrante, C.G., and van Dijl, J.M.** (2013). The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., and Mansfield, J.** (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **23**: 441–450.
- Griebel, T. and Zeier, J.** (2010). A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **63**: 254–268.
- Grosskinsky, D.K., Koffler, B.E., Roitsch, T., Maier, R., and Zechmann, B.** (2012). Compartment-Specific Antioxidative Defense in Arabidopsis Against Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* **102**.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., and Durner, J.** (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 507–516.
- Guo, H. and Ecker, J.R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 40–49.
- Guo, M., Block, A., Bryan, C.D., Becker, D.F., and Alfano, J.R.** (2012). *Pseudomonas syringae* Catalases Are Collectively Required for Plant Pathogenesis. *J. Bacteriol.* **194**: 5054–5064.
- Guo, X. and Stotz, H.U.** (2007). Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in Arabidopsis is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **20**: 1384–1395.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U.** (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* **163**: 233–255.
- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y., and Mackey, D.** (2007). Layered basal defenses underlie non-host resistance of Arabidopsis to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **51**: 604–616.



- Ham, J.H., Majerczak, D.R., Nomura, K., Mecey, C., Uribe, F., He, S.-Y., Mackey, D., and Coplin, D.L.** (2009). Multiple activities of the plant pathogen type III effector proteins WtsE and AvrE require WxxxE motifs. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **22**: 703–712.
- Hammerschmidt, R. and Dann, E.K.** (1999). The role of phytoalexins in plant protection. *Novartis Found. Symp.* **223**: 175–187; discussion 188–190.
- Hartwig, U.A., Joseph, C.M., and Phillips, D.A.** (1991). Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Seeds Enhance Growth Rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **95**: 797–803.
- He, S.Y., Nomura, K., and Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 181–206.
- Hirai, N., Sugie, M., Wada, M., Lahlou, E.H., Kamo, T., Yoshida, R., Tsuda, M., and Ohigashi, H.** (2000). Triterpene phytoalexins from strawberry fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1707–1712.
- Hong, J.K., Yun, B.-W., Kang, J.-G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., and Loake, G.J.** (2008). Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* **59**: 147–154.
- Van der Hoorn, R.A.L. and Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* **20**: 2009–2017.
- Hopkins, W.G.** (2003). *Physiologie végétale* (De Boeck Supérieur).
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M.B.** (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol. Microbiol.* **50**: 377–389.
- Innes, R.W., Bent, A.F., Kunkel, B.N., Bisgrove, S.R., and Staskawicz, B.J.** (1993). Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* **175**: 4859–4869.
- James, D.G. and Price, T.S.** (2004). Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *J. Chem. Ecol.* **30**: 1613–1628.
- Janjusevic, R., Quezada, C.M., Small, J., and Stebbins, C.E.** (2013). Structure of the HopA1(21-102)-ShcA chaperone-effector complex of *Pseudomonas syringae* reveals conservation of a virulence factor binding motif from animal to plant pathogens. *J. Bacteriol.* **195**: 658–664.
- Jawad, Z. and Paoli, M.** (2002). Novel sequences propel familiar folds. *Struct. Lond. Engl.* 1993 **10**: 447–454.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and Greenberg, J.T.** (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr. Biol. CB* **17**: 499–508.



- Jeong, B., Lin, Y., Joe, A., Guo, M., Korneli, C., Yang, H., Wang, P., Yu, M., Cerny, R.L., Staiger, D., Alfano, J.R., and Xu, Y.** (2011). Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity. *J. Biol. Chem.* **286**: 43272–43281.
- Jha, G., Rajeshwari, R., and Sonti, R.V.** (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **18**: 891–898.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**: 4004–4014.
- Jia, Z., Zou, B., Wang, X., Qiu, J., Ma, H., Gou, Z., Song, S., and Dong, H.** (2010). Quercetin-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**: 522–527.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L., and He, S.Y.** (2001). Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **40**: 1129–1139.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R.** (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757–1760.
- Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G., and Expert, D.** (1996). Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **9**: 143–150.
- Kang, H.G., Fang, Y., and Singh, K.B.** (1999). A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces defense-related genes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **20**: 127–133.
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2013). MYC2: the master in action. *Mol. Plant* **6**: 686–703.
- Kentner, D. and Sourjik, V.** (2006). Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 619–624.
- Khan, M.A., Zhao, Y., and Korban, S.S.** (2011). Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Mol. Biol. Report.* **30**: 247–260.
- Khokhani, D., Zhang, C., Li, Y., Wang, Q., Zeng, Q., Yamazaki, A., Hutchins, W., Zhou, S.-S., Chen, X., and Yang, C.-H.** (2013). Discovery of plant phenolic compounds that act as type three secretion system inhibitors or inducers of fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*

- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 6496–6501.
- Kim, Y., Schumaker, K.S., and Zhu, J.-K.** (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **323**: 101–103.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., and Dangl, J.L.** (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 73–78.
- Konecki, K., Gernold, M., Wensing, A., and Geider, K.** (2013). Growth inhibition of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species by neutralized short-chain fatty acids. *Arch. Microbiol.*
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 325–331.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.
- Lagaert, S., Beliën, T., and Volckaert, G.** (2009). Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 1064–1073.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–275.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D.** (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **135**: 516–529.
- Laurent, J.** (1989). Characterization of a Ubiquitous Plasmid in *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2**: 160.
- Lee, A.H.-Y. et al.** (2012). A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathog.* **8**: e1002523.
- Lee, H.I. and Raskin, I.** (1998). Glucosylation of Salicylic Acid in *Nicotiana tabacum* Cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* **88**: 692–697.
- Lee, J., Klessig, D.F., and Nürnberger, T.** (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* **13**: 1079–1093.
- Lewis, J.D., Abada, W., Ma, W., Guttman, D.S., and Desveaux, D.** (2008). The HopZ family of *Pseudomonas syringae* type III effectors require myristoylation for virulence and avirulence functions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Bacteriol.* **190**: 2880–2891.

- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.-M., and Shao, F.** (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **315**: 1000–1003.
- Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J.T.** (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17**: 2636–2641.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J., and Collmer, A.** (2006). Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 19**: 1151–1158.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and 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.
- Liu, J. and Rost, B.** (2003). NORSp: predictions of long regions without regular secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3833–3835.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., and Zhang, S.** (2007). Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **51**: 941–954.
- Loake, G. and Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 466–472.
- Van Loon, L.C., Geraats, B.P.J., and Linthorst, H.J.M.** (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**: 184–191.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J.** (2006b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135–162.
- Lorrain, S.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* **8**: 263–271.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P.** (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 496–501.
- Lucas, J.** (2009). *Plant Pathology and Plant Pathogens* (John Wiley & Sons).
- Luderer, R. et al.** (2001). No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 14**: 867–876.
- Luderer, R. and Joosten, M.H.** (2001). Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat. *Mol. Plant Pathol.* **2**: 355–364.

- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique (PPUR presses polytechniques).
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 743–754.
- Mahalingam, R. and Fedoroff, N.** (2003). Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiol. Plant.* **119**: 56–68.
- Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E.E., He, S.Y., and Aldwinckle, H.S.** (2007). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 20**: 1568–1580.
- Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J.L., Barny, M.-A., Sundin, G.W., Smits, T.H.M., and Duffy, B.** (2012). Fire Blight: Applied Genomic Insights of the Pathogen and Host. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 475–494.
- Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Hayashi, M., and Nishimura, M.** (2004). An *Arabidopsis* dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **38**: 487–498.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N.** (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* **17**: 9–15.
- Marino, D., Froidure, S., Canonne, J., Ben Khaled, S., Khafif, M., Pouzet, C., Jauneau, A., Roby, D., and Rivas, S.** (2013). *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nat. Commun.* **4**: 1476.
- Markham, J.E. and Jaworski, J.G.** (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **RCM 21**: 1304–1314.
- Markham, J.E., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hématy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, J.-C., Satiat-Jeunemaître, B., and Faure, J.-D.** (2011). Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 2362–2378.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., and Tanksley, S.D.** (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432–1436.
- McGhee, G.C. and Jones, A.L.** (2000). Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4897–4907.
- McGrath, M.J., Koczan, J.M., Kennelly, M.M., and Sundin, G.W.** (2009). Evidence that prohexadione-calcium induces structural resistance to fire blight infection. *Phytopathology* **99**: 591–596.

- McNally, R.R., Toth, I.K., Cock, P.J.A., Pritchard, L., Hedley, P.E., Morris, J.A., Zhao, Y., and Sundin, G.W.** (2012). Genetic characterization of the HrpL regulon of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* reveals novel virulence factors. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 160–173.
- Melech-Bonfil, S. and Sessa, G.** (2010). Tomato MAPKKKε is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **64**: 379–391.
- Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y.** (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 101–122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Meng, P.H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J.P., and Bergounioux, C.** (2009). Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PLoS One* **4**: e7364.
- Meng, X., Bonasera, J.M., Kim, J.F., Nissinen, R.M., and Beer, S.V.** (2006). Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**: 53–61.
- Meng, X. and Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 245–266.
- Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P., and Cornelis, G.R.** (1991). Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **173**: 4994–5009.
- Mishina, T.E. and Zeier, J.** (2006). The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* **141**: 1666–1675.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 300–309.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19613–19618.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Oliveira, H.C., Seligman, K., and Salgado, I.** (2006). Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* **171**: 34–40.
- Moeder, W. and Yoshioka, K.** (2008). Lesion mimic mutants: a classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* **3**: 764–767.

- Momol, M.T. and Aldwinckle, H.S.** Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora.*, J.L. Vanneste, ed (CABI: Wallingford), pp. 55–72.
- Monaghan, J. and Zipfel, C.** (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 349–357.
- Moreau, M., Degrave, A., Vedel, R., Bitton, F., Patrit, O., Renou, J.-P., Barny, M.-A., and Fagard, M.** (2012). EDS1 contributes to nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* against *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**: 421–430.
- Munkvold, K.R. and Martin, G.B.** (2009). Advances in experimental methods for the elucidation of *Pseudomonas syringae* effector function with a focus on AvrPtoB. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 777–793.
- Mutka, A.M., Fawley, S., Tsao, T., and Kunkel, B.N.** (2013). Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **74**: 746–754.
- Mysore, K.S. and Ryu, C.-M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9**: 97–104.
- Nagai, T., Abe, A., and Sasakawa, C.** (2005). Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* **280**: 2998–3011.
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., and Zeier, J.** (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–5141.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.G.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol. CB* **18**: 650–655.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G.** (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 139.
- Nimtz, M., Mort, A., Domke, T., Wray, V., Zhang, Y., Qiu, F., Coplin, D., and Geider, K.** (1996). Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydr. Res.* **287**: 59–76.
- Nissinen, R.M., Ytterberg, A.J., Bogdanove, A.J., VAN Wijk, K.J., and Beer, S.V.** (2007). Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 55–67.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **13**: 430–438.



- Ntoukakis, V., Balmuth, A.L., Mucyn, T.S., Gutierrez, J.R., Jones, A.M.E., and Rathjen, J.P.** (2013). The tomato Prf complex is a molecular trap for bacterial effectors based on Pto transphosphorylation. *PLoS Pathog.* **9**: e1003123.
- Oh, C.-S. and Beer, S.V.** (2007). AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**: 426–436.
- Oh, C.-S., Kim, J.F., and Beer, S.V.** (2005). The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection double dagger. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 125–138.
- Oh, C.-S., Martin, G.B., and Beer, S.V.** (2007). DspA/E, a type III effector of *Erwinia amylovora*, is required for early rapid growth in *Nicotiana benthamiana* and causes NbSGT1-dependent cell death. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 255–265.
- Opalski, K.S., Schultheiss, H., Kogel, K.-H., and Hüchelhoven, R.** (2005). The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **41**: 291–303.
- Pandey, S.P., Roccaro, M., Schön, M., Logemann, E., and Somssich, I.E.** (2010). Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **64**: 912–923.
- Paulin, J.P.** (2000). *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. 87–115.
- Paulin, J.-P. and Sampson, R.** (1973). Fireblight in France. II. Characters of the strains of *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al., 1920, isolated from a Franco-Belgian focus. *Ann. Phytopathol.* **5**: 389–397.
- Payne, S.M., Wyckoff, E.E., Murphy, E.R., Oglesby, A.G., Boulette, M.L., and Davies, N.M.L.** (2006). Iron and Pathogenesis of *Shigella*: Iron Acquisition in the Intracellular Environment. *Biometals* **19**: 173–180.
- Peart, J.R. et al.** (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 10865–10869.
- Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M.J., and Waller, F.** (2010). *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **584**: 4053–4056.
- Peil, A., Garcia-Libreros, T., Richter, K., Trognitz, F.C., Trognitz, B., Hanke, M.-V., and Flachowsky, H.** (2007). Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breed.* **126**: 470–475.
- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N., and Levine, A.** (2012). ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signal. Behav.* **7**: 409–415.



- Perrella, G., Lopez-Vernaza, M.A., Carr, C., Sani, E., Gosselé, V., Verduyn, C., Kellermeier, F., Hannah, M.A., and Amtmann, A.** (2013). Histone deacetylase complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 3491–3505.
- Pester, D., Milčevićová, R., Schaffer, J., Wilhelm, E., and Blümel, S.** (2012). *Erwinia amylovora* Expresses Fast and Simultaneously hrp/dsp Virulence Genes during Flower Infection on Apple Trees. *PLoS ONE* **7**: e32583.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **17**: 696–706.
- Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte** (2003). (De Boeck Supérieur).
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 489–521.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 308–316.
- Poueymiro, M. and Genin, S.** (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 44–52.
- Price, C.T.D., Jones, S.C., Amundson, K.E., and Kwaik, Y.A.** (2010). Host-mediated post-translational prenylation of novel dot/icm-translocated effectors of *legionella pneumophila*. *Front. Microbiol.* **1**: 131.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Reardon, C.L., Smits, T.H.M., and Duffy, B.** (2011). Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology* **101**: 1234–1241.
- Qiu, J.-L. et al.** (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* **27**: 2214–2221.
- Qutob, D. et al.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**: 3721–3744.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D.** (2008). A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 752–767.
- Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J.G., and Dodds, P.N.** (2009). In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 1017–1024.

- Ramade, F.** (2009). *Eléments d'écologie : Ecologie fondamentale - 4e édition* (Dunod).
- Ramos, L.S., Lehman, B.L., Sinn, J.P., Pfeufer, E.E., Halbrecht, N.O., and McNellis, T.W.** (2013). The fire blight pathogen *Erwinia amylovora* requires the *rpoN* gene for pathogenicity in apple. *Mol. Plant Pathol.*: n/a–n/a.
- Ramos-Morales, F.** (2012). Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biol.* **2012**: 1–36.
- Raven, P.H., Evert, R.F., and Eichhorn, S.E.** (2000). *Biologie végétale* (De Boeck Supérieur).
- Reboutier, D. and Bouteau, F.** (2008). Harpins and ion channels modulations: Many ways to die. *Plant Signal. Behav.* **3**: 314–316.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Laroche, S., Rona, J.-P., Barny, M.-A., and Bouteau, F.** (2007a). The HrpN(ea) harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **20**: 94–100.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J.-P., Haapalainen, M., Barny, M.-A., and Bouteau, F.** (2007b). Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* **120**: 3271–3278.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, W., and Jahn, O.** (2007). Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* **19**: 3170–3193.
- Revelles, O., Espinosa-Urgel, M., Fuhrer, T., Sauer, U., and Ramos, J.L.** (2005). Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **187**: 7500–7510.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., and Marano, M.R.** (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **20**: 1222–1230.
- Rivas, S. and Thomas, C.M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 395–436.
- Robert, D. and Catesson, A.-M.** (2000). *Organisation végétative* (Wolters Kluwer France).
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G.** (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 317–343.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., and Mundy, J.** (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 621–649.

- Rojas, C. and Mysore, K.S.** (2012). Glycolate oxidase is an alternative source for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during plant defense responses and functions independently from NADPH oxidase. *Plant Signal. Behav.* **7**: 752–755.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Wang, K., Ryu, C.-M., Kaundal, A., and Mysore, K.S.** (2012). Glycolate Oxidase Modulates Reactive Oxygen Species-Mediated Signal Transduction during Nonhost Resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 336–352.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., and Jones, J.D.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* **20**: 5556–5567.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., and Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**: 273–287.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., and Lahaye, T.** (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**: 645–648.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., and Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**: 795–803.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B.** (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**: 370–374.
- Le Roux, P.-M.F., Khan, M.A., Brogini, G.A.L., Duffy, B., Gessler, C., and Patocchi, A.** (2010). Mapping of quantitative trait loci for fire blight resistance in the apple cultivars “Florina” and “Nova Easygro.” *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* **53**: 710–722.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15**: 5690–5700.
- Sagi, M. and Fluhr, R.** (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* **141**: 336–340.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jørgensen, J.-E., Weigel, D., and Andersen, S.U.** (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat. Methods* **6**: 550–551.
- Schroth, M.N., Thomson, S.V., Hildebrand, D.C., and Moller, W.J.** (1974). Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12**: 389–412.
- Schulze, S. et al.** (2012). Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol.* **195**: 894–911.
- Senthil-Kumar, M. and Mysore, K.S.** (2013). Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 407–427.

- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.-J., Ono, K., Toki, S., and Takatsuji, H.** (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* **19**: 2064–2076.
- Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P.** (2000). Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **44**: 371–385.
- Siamer, S.** (2013). Étude de la toxicité de DspA, protéine essentielle au pouvoir pathogène d'*Erwinia amylovora*, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Paris 11).
- Siamer, S., Gaubert, S., Boureau, T., Brisset, M.-N., and Barny, M.-A.** (2013). Mutational analysis of a predicted double  $\beta$ -propeller domain of the DspA/E effector of *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **342**: 54–61.
- Siamer, S., Patrit, O., Fagard, M., Belgareh-Touzé, N., and Barny, M.-A.** (2011). Expressing the *Erwinia amylovora* type III effector DspA/E in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strongly alters cellular trafficking. *FEBS Open Bio* **1**: 23–28.
- Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E., and Mougous, J.D.** (2012). Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 453–472.
- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B., and Tuteja, N.** (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* **6**: 196–203.
- Sinn, J.P., Oh, C.-S., Jensen, P.J., Carpenter, S.C.D., Beer, S.V., and McNellis, T.W.** (2008). The C-terminal half of the HrpN virulence protein of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* is essential for its secretion and for its virulence and avirulence activities. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **21**: 1387–1397.
- Smits, T.H., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., and Duffy, B.** (2010). Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **23**: 384–393.
- Sohn, K.H., Saucet, S.B., Clarke, C.R., Vinatzer, B.A., O'Brien, H.E., Guttman, D.S., and Jones, J.D.G.** (2012). HopAS1 recognition significantly contributes to *Arabidopsis* nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pathogens. *New Phytol.* **193**: 58–66.
- Song, J.T.** (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cells* **22**: 233–238.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G.R.** (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 11998–12002.
- Steinbrenner, A.D., Goritschnig, S., Krasileva, K.V., Schreiber, K.J., and Staskawicz, B.J.** (2012). Effector recognition and activation of the *Arabidopsis thaliana* NLR innate immune receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **77**: 249–257.

- Stockwell, V.O. and Stack, J.P.** (2007). Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. *Phytopathology* **97**: 244–249.
- Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T., and Ausubel, F.M.** (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* **12**: 1811–1822.
- Straus, M.R., Rietz, S., Ver Loren van Themaat, E., Bartsch, M., and Parker, J.E.** (2010). Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **62**: 628–640.
- Sun, A. and Li, Z.** (2012). Regulatory role of nitric oxide in lipopolysaccharides-triggered plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* **8**.
- Swarbrick, P.J., Schulze-Lefert, P., and Scholes, J.D.** (2006). Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* **29**: 1061–1076.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A., and Bonas, U.** (2010). Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol.* **187**: 1058–1074.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., and Van den Ackerveken, G.** (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **26**: 523–534.
- Taguchi, F., Ogawa, Y., Takeuchi, K., Suzuki, T., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.** (2006). A homologue of the 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III gene located in the glycosylation island of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* regulates virulence factors via N-acyl homoserine lactone and fatty acid synthesis. *J. Bacteriol.* **188**: 8376–8384.
- Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.** (2003). Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *J. Bacteriol.* **185**: 6658–6665.
- Tamura, M. and Tachida, H.** (2011). Evolution of the number of LRRs in plant disease resistance genes. *Mol. Genet. Genomics MGG* **285**: 393–402.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.-M.** (2006). Regulation of the Type III Secretion System in Phytopathogenic Bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**: 1159–1166.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–330.
- Tcherkez, G., Boex-Fontvieille, E., Mahé, A., and Hodges, M.** (2012). Respiratory carbon fluxes in leaves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 308–314.

- Tellström, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Küster, H., and Niehaus, K.** (2007). The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **143**: 825–837.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., and Whiteman, N.K.** (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* **17**: 260–270.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 20**: 1250–1261.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**: 1005–1015.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 517–522.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* **37**: 1130–1134.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* **141**: 373–378.
- Tosti, N., Pasqualini, S., Borgogni, A., Ederli, L., Falistocco, E., Crispi, S., and Paolocci, F.** (2006). Gene expression profiles of O<sub>3</sub>-treated *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ.* **29**: 1686–1702.
- Triplett, L.R., Wedemeyer, W.J., and Sundin, G.W.** (2010). Homology-based modeling of the *Erwinia amylovora* type III secretion chaperone DspF used to identify amino acids required for virulence and interaction with the effector DspE. *Res. Microbiol.* **161**: 613–618.
- Trosky, J.E., Liverman, A.D.B., and Orth, K.** (2008). *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell. Microbiol.* **10**: 557–565.
- Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C.G.N., and Grant, M.R.** (2010). *Arabidopsis* Auxin Mutants Are Compromised in Systemic Acquired Resistance and Exhibit Aberrant Accumulation of Various Indolic Compounds. *Plant Physiol.* **152**: 1562–1573.
- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 459–465.
- Underwood, W.** (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front. Plant Sci.* **3**: 85.



- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y.** (2007). The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **52**: 658–672.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.-L., Triantaphylidès, C., and Roby, D.** (2002). A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 10179–10184.
- Vanneste, J.L.** (2000). *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia Amylovora* (CABI).
- Velasco, R. et al.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* **42**: 833–839.
- Venisse, J.-S., Barny, M.-A., Paulin, J.-P., and Brisset, M.-N.** (2003). Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Lett.* **537**: 198–202.
- Venisse, J.S., Gullner, G., and Brisset, M.N.** (2001). Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* **125**: 2164–2172.
- Venugopal, S.C., Jeong, R.-D., Mandal, M.K., Zhu, S., Chandra-Shekara, A.C., Xia, Y., Hersh, M., Stromberg, A.J., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2009). Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS Genet.* **5**: e1000545.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., and Linthorst, H.J.** (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* **18**: 779–783.
- Vogt, I., Wöhner, T., Richter, K., Flachowsky, H., Sundin, G.W., Wensing, A., Savory, E.A., Geider, K., Day, B., Hanke, M.-V., and Peil, A.** (2013). Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus × robusta* 5-*Erwinia amylovora*. *New Phytol.* **197**: 1262–1275.
- W. Thomas Shier, H.K.A.** (1995). Complete structures of the sphingosine analog mycotoxins fumonisin B 1 and AAL toxin T A: Absolute configuration of the side chains. *Tetrahedron Lett. - TETRAHEDRON LETT* **36**: 1571–1574.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X.** (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* **2**: e123.
- Wang, D., Korban, S.S., Pusey, P.L., and Zhao, Y.** (2012a). AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amylovoran Production in *Erwinia amylovora*. *PLoS ONE* **7**: e45038.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., and Gilchrist, D.G.** (1996). Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *Plant Cell* **8**: 375–391.

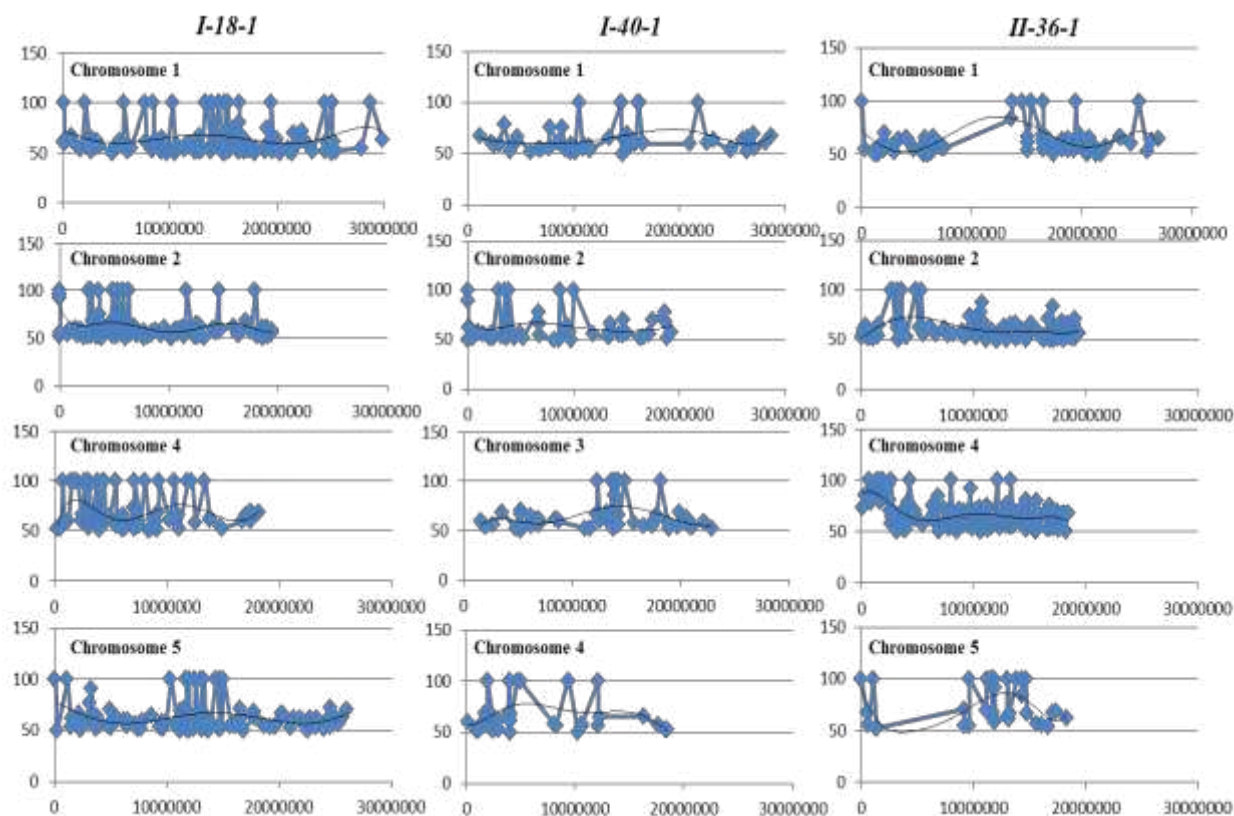


- Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N.A., and Shimura, H.** (2012b). RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**: 1275–1285.
- Wang, W. et al.** (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 3163–3179.
- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X., and Zhou, J.-M.** (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **22**: 2033–2044.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**: 1021–1058.
- Wei, Z., Kim, J.F., and Beer, S.V.** (2000). Regulation of hrp genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **13**: 1251–1262.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S.V.** (1992a). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85–88.
- Wei, Z.M., Sneath, B.J., and Beer, S.V.** (1992b). Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **174**: 1875–1882.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., and Jin, H.** (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**: 118–123.
- Wilson, M.** (1993). Interactions Between the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in Pear Blossoms. *Phytopathology* **83**: 117.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F.E.** (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **181**: 593–603.
- Wodzinski, R. s. and Paulin, J.-P.** (1994). Frequency and diversity of antibiotic production by putative *Erwinia herbicola* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 603–607.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322** ( Pt 3): 681–692.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C.** (2012). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep.* **1**: 639–647.
- Xing, W. et al.** (2007). The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature* **449**: 243–247.
- Xu, J., Wei, X., Yan, L., Liu, D., Ma, Y., Guo, Y., Peng, C., Zhou, H., Yang, C., Lou, Z., and Shui, W.** (2013). Identification and functional analysis of phosphorylation

- residues of the Arabidopsis BOTRYTIS-INDUCED KINASE1. *Protein Cell* **4**: 771–781.
- Yahalom, A., Kim, T.-H., Roy, B., Singer, R., Von Arnim, A.G., and Chamovitz, D.A.** (2007). Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation: eIF3e is regulated by the COP9 signalosome. *Plant J.* **53**: 300–311.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**: 2220–2236.
- Yi, M. and Valent, B.** (2013). Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 587–611.
- Yoo, S.-D. and Sheen, J.** (2008). MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Plant Signal. Behav.* **3**: 848–849.
- Yu, I.C., Parker, J., and Bent, A.F.** (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 7819–7824.
- Yun, B.-W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N.B.B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J.W., Kang, J.-G., Kwon, E., Spoel, S.H., Pallas, J.A., and Loake, G.J.** (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**: 264–268.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., and Lamb, C.** (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**: 2875–2886.
- Zelman, A.K., Dawe, A., Gehring, C., and Berkowitz, G.A.** (2012). Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Front. Plant Sci.* **3**: 95.
- Zhang, C., Czymmek, K.J., and Shapiro, A.D.** (2003). Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the Arabidopsis hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **16**: 962–972.
- Zhang, J. et al.** (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**: 290–301.
- Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrand, T.W.H., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G., and van Kan, J.A.L.** (2013). Fungal endopolygalacturonases are recognized as MAMPs by the Arabidopsis Receptor-Like Protein RBPG1. *Plant Physiol.*
- Zhao, Y., Blumer, S.E., and Sundin, G.W.** (2005). Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J. Bacteriol.* **187**: 8088–8103.

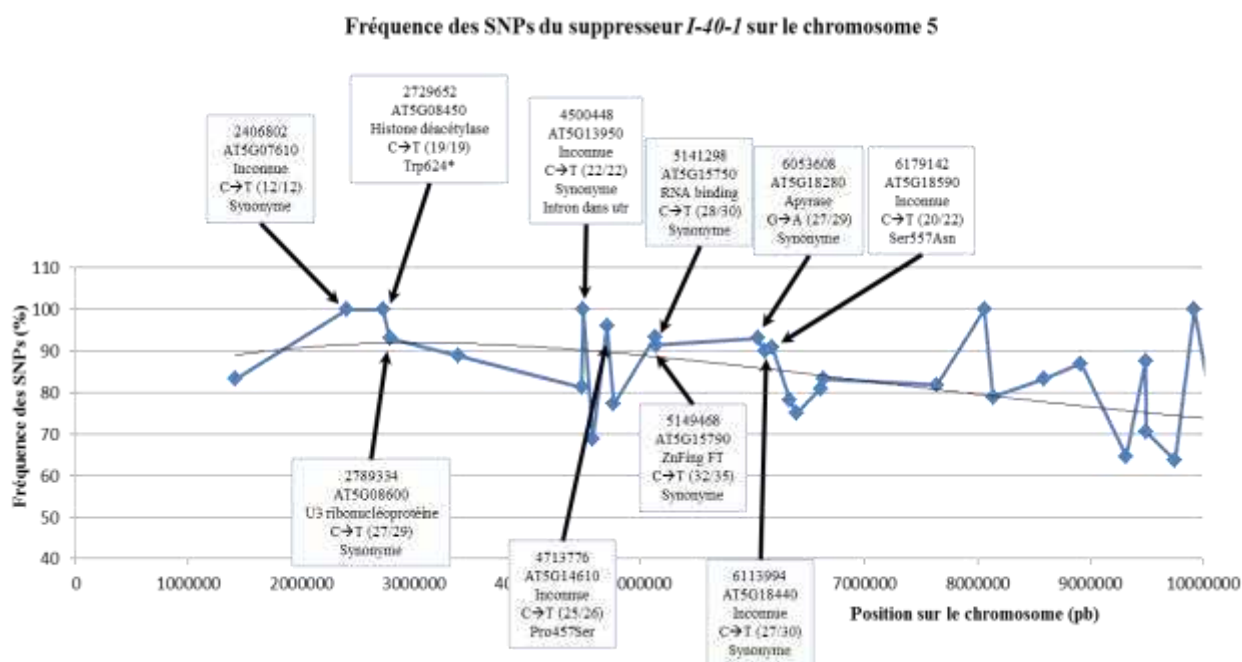
- Zhao, Y., He, S.-Y., and Sundin, G.W.** (2006). The *Erwinia amylovora* avrRpt2EA gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2EA is recognized by Arabidopsis RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**: 644–654.
- Zhao, Y., Sundin, G.W., and Wang, D.** (2009). Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Can. J. Microbiol.* **55**: 457–464.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**: 749–760.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H.** (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **24**: 265–273.

# **Annexes**



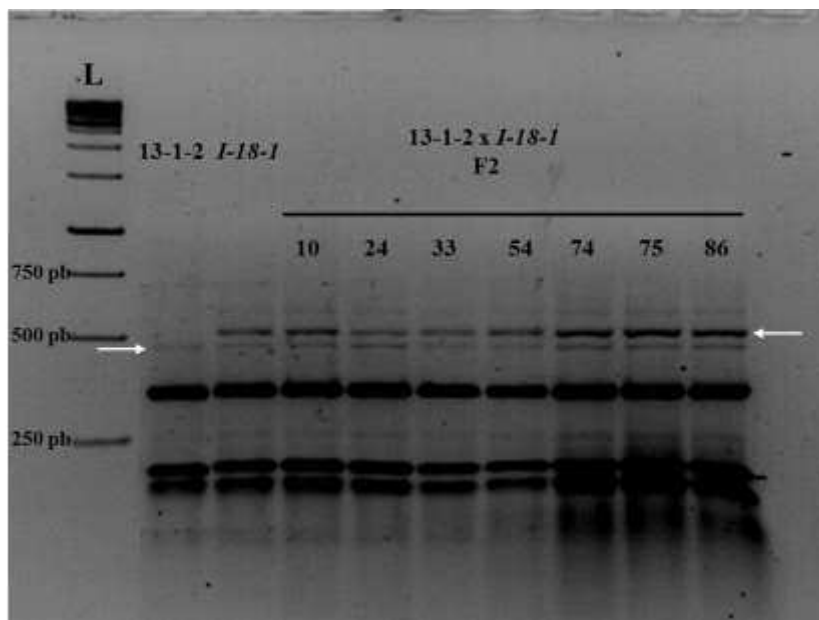
### Annexe 1: Analyses des SNPs présents sur les autres chromosomes des suppresseurs *I-18-1*, *I-40-1* et *II-36-1*

Les profils ont été effectués grâce à une recherche de SNPs non-stringente (30%) avec le logiciel CLC genomics. En ordonnées les fréquences d'apparition des SNPs dans les reads sont indiquées et en abscisse la position des SNPs est indiquée.



## Annexe 2: Candidats potentiels présents dans la zone du pic de SNPs du suppresseur *I-40-1*

Dans l'ordre affiché dans les cadres: La première information correspond à la position sur le chromosome, ensuite est affiché le numéro du gène dans lequel le SNP est présent. En troisième position est présentée la fonction du gène. En quatrième position est présenté le type de SNPs avec (), le nombre de reads présentant le SNP et en dernière position la modification induite par le SNP. Trp: Tryptophane, Pro: Proline, Ser: Sérine, Asn: Asparagine, utr: Untranslated region, \*: Stop.



### Annexe 3: Exemple de confirmation par CAPS de la mutation dans le gène de la glycolate oxydase du suppresseur *I-18-1*

La portion d'ADN qui entoure la mutation a été amplifiée par PCR. La réaction de PCR digérée par l'enzyme de restriction *MwoI* qui reconnaît le site de restriction GCNNNNN<sup>^</sup>NNGC. Le profil de digestion de la lignée 13-1-2 comme témoin négatif, du suppresseur *I-18-1* et de quelques F2 est présenté. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les 100 F2 issues du croisement 13-1-2 x *I-18-1*. Les flèches blanches indiquent les bandes discriminant la présence ou l'absence de la mutation. -: Mix PCR sans matrice et L: Ladder,



♂ \ ♀	DspA/E	M	-	<i>m</i>	DspA/E	<i>m</i>	-	M
DspA/E	M	DspA/E S M DspA/E S M	- S M DspA/E S M	- <i>m</i> DspA/E S M	DspA/E S <i>m</i> DspA/E S M	- S M DspA/E S M	- M DspA/E S M	M
-	<i>m</i>	DspA/E S M - S <i>m</i>	- R <i>m</i> - R <i>m</i>	- <i>m</i> - <i>m</i>	DspA/E I <i>m</i> - I <i>m</i>	- R M - R <i>m</i>	- M - <i>m</i>	M
DspA/E	<i>m</i>	DspA/E S M DspA/E S <i>m</i>	- I <i>m</i> DspA/E I <i>m</i>	- <i>m</i> DspA/E I <i>m</i>	DspA/E I <i>m</i> DspA/E I <i>m</i>	- S M DspA/E S <i>m</i>	- M DspA/E S <i>m</i>	M
-	M	DspA/E S M - S M	- R <i>m</i> - R M	- <i>m</i> - M	DspA/E S <i>m</i> - S M	- R M - R M	- M - M	M

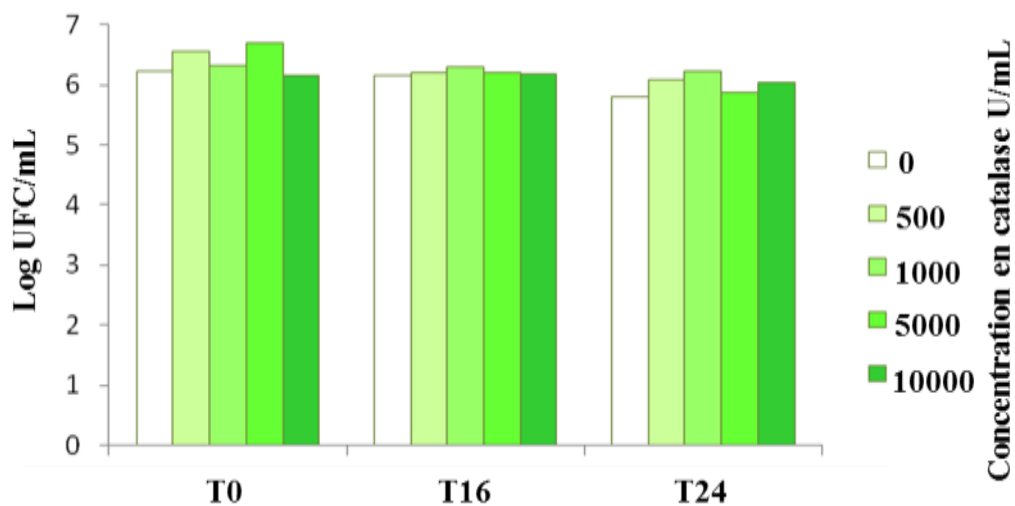
#### Annexe 4: Hypothèse de l'effet de mutations sur la toxicité de DspA/E

Chaque case correspond à un individu. Les lettres indiquent le phénotype de l'individu de la case. (R): L'individu germe quel que soit la condition. (S): L'individu ne germe pas lorsqu'il est semé sur estradiol. (I): Le résultat est incertain, cela dépend de l'effet de la mutation sur la toxicité de DspA/E. (M) : allèle sauvage du gène ; (*m*) : allèle mutant du gène.

		Ea vs Eau	
		6hpi	24hpi
<b>Induits par les FAO</b>			
At4g01250	WRKY22 transcription factor	4,27	2,96
At5g24110	WRKY30 transcription factor	3,84	
At5g13080	WRKY75 transcription factor	3,75	2,94
At2g46400	WRKY46 transcription factor	3,71	2,68
At4g02380	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein	3,66	2,16
At1g74710	isochorismate synthase 1 (ICS1)	3,48	2,68
At2g47730	glutathione S-transferase 6 (GST6)	3,40	
At5g20230	plastocyanin-like domain-containing protein	3,36	3,65
At3g52430	phytoalexin-deficient 4 protein (PAD4)	3,23	3,25
At1g80840	WRKY40 transcription factor	3,08	2,25
At3g19010	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	2,54	1,28
At4g31800	WRKY18 transcription factor	2,42	2,45
At1g62300	WRKY6 transcription factor	2,27	1,81
At4g39030	enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)	2,22	2,62
At5g03630	monodehydroascorbate reductase, putative	2,01	1,43
At5g05730	anthranilate synthase, alpha subunit, component I-1 (ASA1)	1,99	1,90
At1g72520	lipoxygenase, putative	1,98	1,47
At2g23320	WRKY15 family transcription factor	1,95	1,47
At3g48090	disease resistance protein (EDS1)	1,94	1,20
At2g24850	aminotransferase, putative	1,85	2,91
At2g30250	WRKY25 family transcription factor	1,70	2,01
At5g14930	SAG101	1,63	1,76
At2g40740	WRKY55 transcription factor	1,58	1,85
At2g04400	indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS)	1,57	1,38
At3g04580	ethylene receptor, putative (EIN4)	1,54	0,78
At1g01480	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 / ACC synthase 2 (ACS2)(ACC1)	1,23	2,32
At4g23810	WRKY53 family transcription factor	1,04	1,35
At5g51070	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (ClpD), (ERD1)	1,03	1,59
At3g01970	WRKY45 transcription factor	0,93	1,92
At1g20630	catalase 1		1,75
At1g32350	alternative oxidase, putative		0,97
At4g28420	aminotransferase, putative		
At2g40940	ethylene response sensor / ethylene-responsive sensor (ERS)		
At2g06050	12-oxophytodienoate reductase (OPR3) / delayed dehiscence1 (DDE1)		
At3g09940	monodehydroascorbate reductase, putative		
At4g11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 / ACC synthase 6 (ACS6)		
At3g10980	expressed protein		
At5g03730	serine/threonine protein kinase (CTR1)		
At5g07100	WRKY26 (WRKYDNA-binding protein 26); transcription factor		
At3g10980	expressed protein		
At3g22400	lipoxygenase, putative		
At2g30590	WRKY21		
At1g63940	monodehydroascorbate reductase, putative		
At1g11790	prephenate dehydratase family protein		
<b>Réprimés par les FAO</b>			
At2g25080	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, chloroplast / PHGPx (GPX1)	-1,52	nd
At2g28000	RuBisCO subunit binding-protein alpha subunit, chloroplast	-0,93	-2,04
At1g01420	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0,90	-0,85
At3g51240	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)		-2,13
At4g31870	glutathione peroxidase, putative		-1,83
At5g15950	adenosylmethionine decarboxylase family protein		
At4g35090	catalase 2		
At2g29450	glutathione S-transferase (103-1A)		
AtCg00490	large subunit of RUBISCO		
At5g53120	spermidine synthase, putative / putrescine aminopropyltransferase, putative		1,04
At2g25000	WRKY60	-1,12	1,05

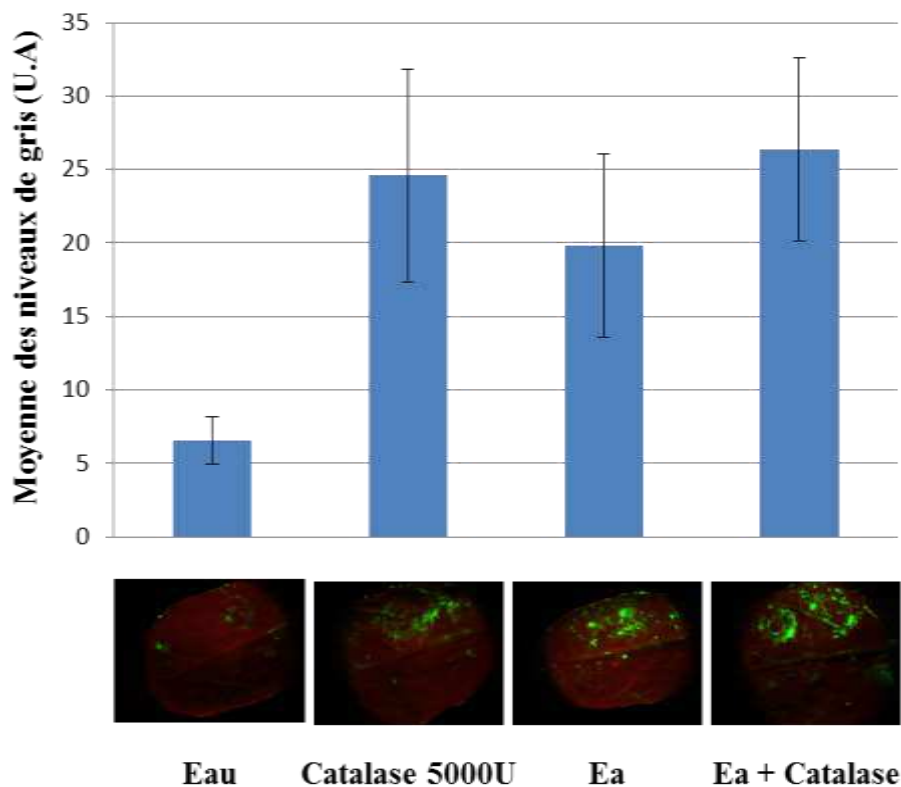
## Annexe 5: Liste des gènes du transcriptome d'*A. thaliana* en réponse à *E.amylovora* décrits comme modulés par l' $H_2O_2$ et l' $O_2^-$

La liste de gènes modulés par les FAOs provient de la publication de Tosti *et al.*, 2006. Cette liste de gènes a été comparée aux données transcriptomiques d'*A. thaliana* infectée par *E. amylovora*, effectuées à l'URGV d'Evry (<http://www.versailles.inra.fr/urgv/>)



### Annexe 6: La catalase n'a pas d'effet sur *E. amylovora*

Des suspensions bactériennes préparées avec les concentrations de catalase indiquées ont été diluées en série, puis déposées sur milieu LB. Les colonies bactériennes formées ont ensuite été comptées.



### Annexe 7: La catalase induit la formation d'un stress oxydatif

Des feuilles de l'écotype Col-0 âgées de 5 semaines ont été infiltrées avec de l'eau ou de la catalase à 5000U ou inoculées avec la souche sauvage d'*E. amylovora* avec ou sans catalase 5000U. Les feuilles ont ensuite été prélevées 16 heures post-inoculation et infiltrées sous-vide avec le DCFH-DA. Les observations sont faites sous une loupe binoculaire avec filtre GFP.

Feuilles infectées par des bactéries						
	1	2	3	4	5	6
Eau	+	+++	+	+++	+	+
Ea	+++	+	+++	+	+	+
<i>dspA/E</i>	+	+++	++	+	+	+

Plantules transgéniques exprimant DspA/E seul						
	1	2	3	4	5	6
7-2-1	+	+++	+	+++	+	+++
13-1-2	+++	+	+++	+	+++	+
Supps.	A: +	+++	+	+++	+	+++
	B: +++	+	+++	+	+++	+

1: Accumulés lors de l'infection par la bactérie de manière DspA/E-dépendante et par DspA/E seul:  
**Lysine, Stigmastérol, Pipecolate**

2: Réprimés par la bactérie de manière DspA/E-dépendante et par DspA/E seul:  
**Fumarate, Myo-inositol**

3: Accumulés lors de l'infection par la bactérie et par DspA/E seul. DspA/E n'est pas le seul inducteur:  
**Sucrose, fructose, maltose, Salicylate, Glycosylsalicylate**

4: Réprimés par la bactérie et par DspA/E seul. DspA/E n'est pas le seul suppresseur:  
**Homosérine, Déhydroascorbate**

5: Non-modulés par la bactérie. Accumulés suite à l'expression de DspA/E:  
**Anhydroglucose, Spermidine, Pyruvate, glutarate, Oleic acid, Linoleic acid, Ecosaonate, Sérine, A-aminoaldipate**

6: Non-modulés par la bactérie. Réprimés suite à l'expression de DspA/E:  
**Galactosylglycérol, Galactose, Digalactosylglycérol, Urate, Threonate-lactone, Threonate, Glycérate, Galactonate, Erythronate, Citrate, Phytol-2, Glycine, GABA**

A: Perte d'induction/répression chez les suppresseurs (comme 7-2-1).  
B: Pas de perte d'induction/répression chez tous les suppresseurs (comme 13-1-2).

## Annexe 8: Métabolites modulés en réponse à *E. amylovora* dépendant ou non de DspA/E dans les suppresseurs et Col-0

Des feuilles de plantes âgées de 5 semaines (cadre bleu) ou des plantules de 10 à 12 jours (cadre vert) ont été traitées par la souche sauvage d'*E. amylovora*, de l'eau ou le mutant bactérien de DspA/E (*dspA/E*) pour les plantes et par de l'eau ou de l'estradiol pour les plantules. Les prélèvements ont été effectués à 24 heures post-induction ou inoculation. Les métabolites sont classés par catégories (de 1 à 6). Le niveau relatif d'induction d'un métabolite est indiqué par des signes +. (+): Peu ou pas présent; (++) : légèrement induit; (+++): Très induit. Mock : Eau ; Ea : *E. amylovora* ; Supps: Suppresseurs.



Oligo	Référence	Sequence 5'-3'	Nombre de bases
5G08450-I40-1-F	AT5G08450	GGAGGTGTAGTCTAACAAATA	21
5G08450-I40-1-R	AT5G08450	TTAAGTTGTGGAAAGAATATG	21
5G13950-I40-1-F	AT5G13950	CACAGAGAAGAAAAAGAAAAA	21
5G13950-I40-1-R	AT5G13950	AAGGAAATCTCAAAAGAAAAA	21
5G14610-I40-1-F	AT5G14610	ACTGAATGATATCCTTGAAAT	21
5G14610-I40-1-R	AT5G14610	GCTTCTATAATTCTGATGGTT	21
5G18590-I40-1-F	AT5G18590	GCTCTGTTCTCTAGAGATTGT	21
5G18590-I40-1-R	AT5G18590	GCTCTGAAACATATCCTTTAG	21
5'UTRGOX1-F	AT3G14420	CTACGAGATTAAGAACGATAA	20
5'UTRGOX1-R	AT3G14420	CTGAGTTAGCTACCTCTTGTTG	20
AOS-F	AT5G42650	ATGCCGTCAACGGAACCTAAC	20
AOS-R	AT5G42650	CCTCCGCTAATCGGTTATGA	20
AT2G40750-F	AT2G40750	TTGGCTACCACACATGCACT	20
AT2G40750-R	AT2G40750	CCTGTCGAAGAGCCCTCATA	20
AT2G46400-F	AT2G46400	TTGAGAACGGTGTGTGGAAA	20
AT2G46400-R	AT2G46400	CAACCAATCCTGTCCGAAAT	20
AT3G14415A-LP	AT3G14415	CACTTTTCCGAGTGTCTTTTG	21
AT3G14415A-LP	AT3G14415	CACTTTTCCGAGTGTCTTTTG	21
AT3G14415A-RP	AT3G14415	GCAGTAGGAGCAACCATGATC	21
AT3G14415A-RP	AT3G14415	GCAGTAGGAGCAACCATGATC	21
AT3G22370-F	AT3G22370	TCGTGATGTTGTGATGGTTG	20
AT3G22370-R	AT3G22370	TTCAAAGAAAGCCGAATCCA	20
AT3G52430-F	AT3G52430	CAACTCTTAGCCGAGCCACT	20
AT3G52430-R	AT3G52430	GCCTCATCCAACCCTCTTT	20
AT3G56400-F	AT3G56400	GAGGACGCATTTTCTTGGAG	20
AT3G56400-R	AT3G56400	TTGCTCTTGGGAGTTCTGTC	20
AT5G08450A-LP	AT5G08450	ATTACCAAATGCCGTCTTTG	21
AT5G08450A-RP	AT5G08450	AGAACCATCTGACAAACGGTG	21
AT5G08450B-LP	AT5G08450	CTCTGGCCTCTCCAGCTTTAG	21
AT5G08450B-RP	AT5G08450	TTAATTGATGTTTCCGCTGG	21
AT5G13950A-LP	AT5G13950	TCCGTAGTACCAGACGCAAC	21
AT5G13950A-RP	AT5G13950	GCAGGTGTCACAGCTTTAACC	21
AT5G13950B-LP	AT5G13950	AGAGTGGTGATATGGCACCAG	21
AT5G13950B-RP	AT5G13950	AACTCTGAGAAGGCTCGGATC	21
AT5G14610A-LP	AT5G14610	GTGATGGTCTTTGTCAATGGG	21
AT5G14610A-RP	AT5G14610	ATTCATACCTCCCGCAGAAG	21
AT5G14610B-LP	AT5G14610	TGAGTAATGGACTTGTTCGCC	22
AT5G14610B-RP	AT5G14610	TTGCAAATACTGGAGGGTTTG	21
AT5G18590A-LP	AT5G18590	CAATCAGCCTCTGTGAAGAGG	21
AT5G18590A-RP	AT5G18590	GCTTCCTCTTAATTGCACGTG	21
AT5G18590B-LP	AT5G18590	ATCCACCTTGTGGATGTGAC	21
AT5G18590B-RP	AT5G18590	AGGCCATTGCTTGGTAATTG	20
AiFLS-F	AT5G08640	AGAAGCTATCGGAGACGTTATTAGG	25
AiFLS-R	AT5G08640	GGTAAGCTGTAATCCTTGAAAGCAA	25
AthCHIB-F	AT3G12500	TGTCTCTGCTAGAGGTTTCTIACT	25
AthCHIB-R	AT3G12500	ATCAAGATTACCACCAGGATTAACA	25
AthHEL-F	AT3G04720	GAAGATCAGACTTAGCATAACCATCA	26
AthHEL-R	AT3G04720	ATCGGTGTCTATTGATGAACATT	25
AtMYB30-F	AT3G28910	GGACGCAAGAAACATCTACAAC	22

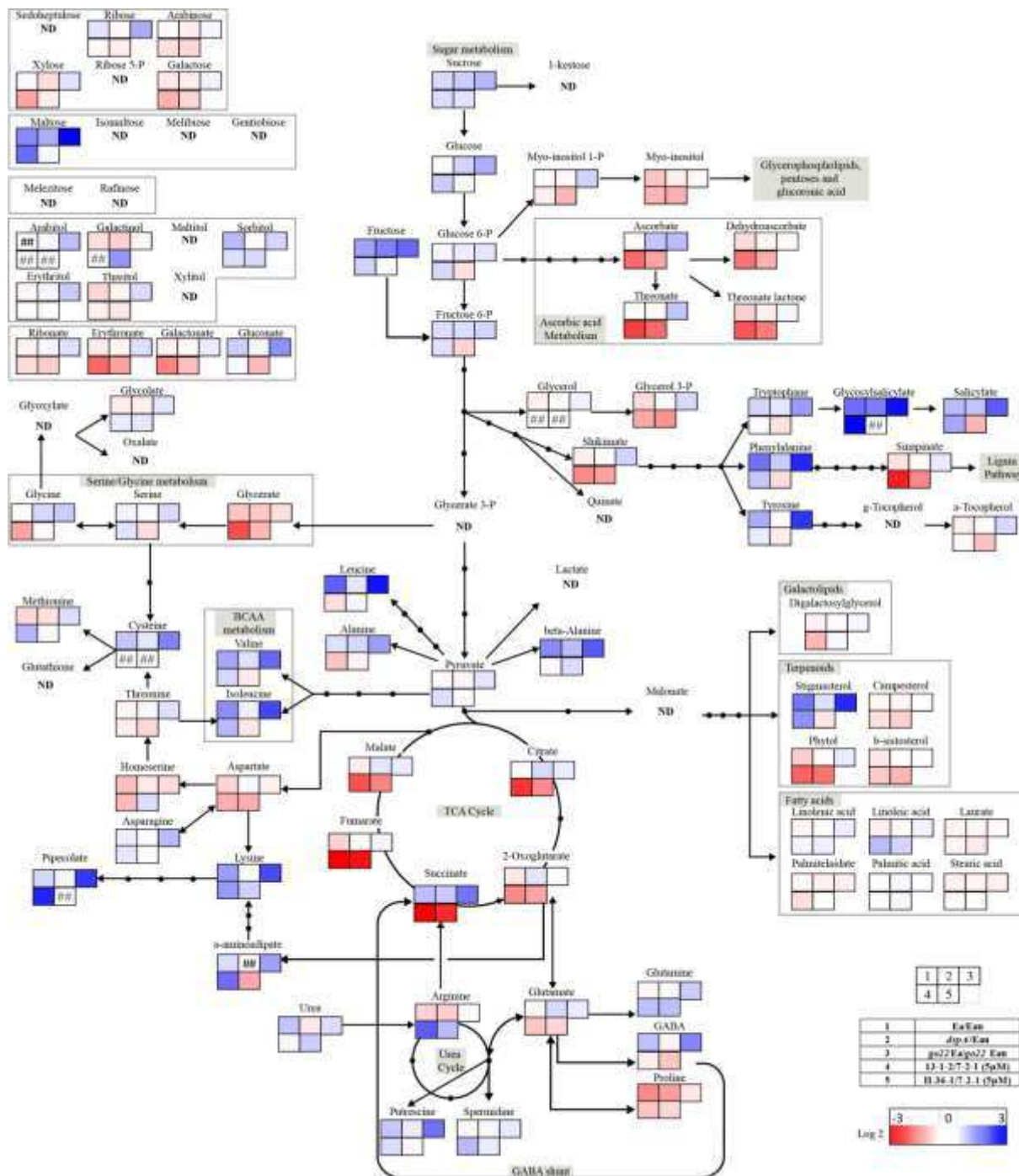
## Annexe 9: Tableau des oligonucléotides utilisés dans cette étude

AtMYB30-R	AT3G28910	GCACACTCCTCCCATCATC	20
CAPS2761900-F	CAPS	AGTTTTGTGGTTCTAATCAA	20
CAPS2761900-R	CAPS	TTATCAAGCCCTAAGAGTATT	20
CAPS4183338-F	CAPS	ATTACTGGCAACAAGATAAAT	20
CAPS4183338-R	CAPS	TTGAAAACATAGTCTTTGCTA	20
CAPS5067745-F	CAPS	AATCTTTTGTGTTGGAGTCTA	20
CAPS5067745-R	CAPS	TTCAACACTCTCTCTCATTTA	20
CAPS5279849-F	CAPS	AAATCATAAGGTGATGGGTAT	20
CAPS5279849-R	CAPS	GTGCTTGATTAAACTTCATT	20
CAPS5280755-F	CAPS	AATTATGGATAAAGAGTGTGG	20
CAPS5280755-R	CAPS	CCTCTAIGTCCTTCTCACTTT	20
CAPS5284521-F	CAPS	ATAGACTCAACCCGACTACTA	20
CAPS5284521-R	CAPS	TAGCTGTIAGTGATATTCGTG	20
CAPS5285951-F	CAPS	ACTCTTTCTTTGTACTCTCGA	20
CAPS5285951-R	CAPS	ATAGATTTGAAATTTGGTGTG	20
CAPS6639698-F	CAPS	AACTAAACCAAATAAACCAG	20
CAPS6639698-R	CAPS	CTTGTCAATCAAATAGTCAAC	20
CAPS8095757-F	CAPS	ATAATCAGGTAGGCATAAAAT	20
CAPS8095757-R	CAPS	TCTIAGTGGTAAATTTTCGTTT	20
CYPA19-II18-1-F	AT3G20100	AAACCATACTTAAACACCATT	21
CYPA19-II18-1-R	AT3G20100	AACCTTTTCTCCATTGATTCT	21
CYPA20-II36-1-F	AT3G20110	GTAGTTAATGCTTATGCTGTG	21
CYPA20-II36-1-R	AT3G20110	GGAAGAAAAAAGAATTAACGA	21
DR3732	AT5G47910	AACTCCGAAATCTCGTCCATTA	22
DspA 2156-R	DspA/E	GATAAGCTGTCCATCCAGG	20
DspA 5283-F	DspA/E	GTCAGTCCGTCAGCAAAA	20
DspA 5361B-F	DspA/E	AAATACGGCCAGGATCAGAA	20
DspA F5	DspA/E	CGCTCTAGAATGCCTCAGCATGCGCTC	27
DspA R6b	DspA/E	GCGTTAGAGCTCGGATTGCAGTTTACTCTC	30
DspA-5283F	DspA/E	CAGTCAGTCCGTCAGCAAAA	20
DspA-5361F	DspA/E	CATGGAGCGCAACATCGGAA	20
DspA-5443F	DspA/E	ATAGCTCAGGCTAATCCGC	20
DspA-5443F	DspA/E	ATAGCTCAGGCTAATCCGCA	20
DspA-6776F	DspA/E	ATGAGCTGCCTGCCTGGCTTTATC	24
DspA-7717R	DspA/E	ACACGCTGGCGCTGCTGAAC	20
DspAF1	DspA/E	CGCTCTAGAATGGAATTAATACTACTG	27
DspAR3	DspA/E	CGCGAGCTCTTACTTATGGCGCCGGGAGT	30
DspAR4	DspA/E	GCGGAGCTCTTAATCAAGAATCTCATGCGG	30
DspA-R5-PAF	DspA/E	GCGTTAGAGCTCACCCTGGTACCCACCGC	30
DspAR7	DspA/E	CGCTTAGAGCTCATGAGCGCGGGTGG	27
DspA-RT-F	DspA/E	CCTGTGGGGCATGGTGTTC	21
DspA-RT-R	DspA/E	CTGGTGTGAGCAGCGCTGATAC	21
dSpm11	T-DNA	GGTGCAGCAAAAACCCACTTTTACTTC	28
EDS1-F	AT3G48090	GAAGAAGCAGGAGCAGTCGT	20
EDS1-R	AT3G48090	CTACAGCCATTTCACAGA	20
EDS5-F	AT4G39030	GGGAACAGATGAAAAGAGATAGTGAA	25
EDS5-R	AT4G39030	ATTAGTCCACAAACCAATCCAATAA	25
EF1 qPCR F	AT5G60390	CGTACCCTAGCCGCTTAC	20
EF1 qPCR R	AT5G60390	CCCATGGTTAGAGACTGTCAAACA	24
EF1-L	AT5G60390	TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA	24



EF1-U	AT5G60390	ATGCCCCAGGACATCGTGATTTCAT	25
Egfp142-R	GFP	TGAACTTCAGGGTCAGCTTG	20
eGFP591-F	GFP	CGACAACCACTACCTGAGCA	20
eGFP-591-F	GFP	CGACAACCACTACCTGAGCA	20
ERF1-F	AT3G23240	ATTCTATCGGATCTTCTCCAGATTC	25
ERF1-R	AT3G23240	CCTAATCTTTCACCAAGTCCCACT	24
FBR11B2	FBR11	GGACTTGAGTAGAAGCTCTGA	21
FBR11F2	FBR11	ATTGCGCCTCTGGATGAGAT	20
FMO-F	AT1G19250	CGTATTCGAAGCCTCGGATTCAGTC	25
FMO-R	AT1G19250	GGTATTCTTGGAACGTCGCCGATT	25
Fmyb30	AT3G28910	AGGAGGAGTGAAGAAAGGGC	20
GFP-759F	GFP	CAICGCTTCTATCGCCTT	19
GOX1Exon113UTR-F	AT3G14420	ACGATAATCAGATGAATTAC	20
GOX1Exon113UTR-R	AT3G14420	TCATCTACTACTCTCACTTGG	20
GOX1Exon1-F	AT3G14420	CACAAGAGGTAGCTAACTCAG	20
GOX1Exon1-R	AT3G14420	AACCAATAACAAACAGTATTT	20
GOX1Exon2-F	AT3G14420	AAATACTGTTTGTATTTGGTT	20
GOX1Exon2-R	AT3G14420	ACAAGCCTTAGTCTTTGTCTC	20
GOX1Exon34-F	AT3G14420	GAGACAAAGACTAAGGCTTGT	20
GOX1Exon34-R	AT3G14420	ACAACAAGCTCTTGAGATAAC	20
GOX1Exon56-F	AT3G14420	GTTATCTCAAGAGCTTGTGT	20
GOX1Exon56-R	AT3G14420	CACTCAGGAAAGGTAACATA	20
GOX1Exon78-F	AT3G14420	TATGTTTACCTTCTCTGAGTG	20
GOX1Exon78-R	AT3G14420	ATTATAGTTGACCTGGTTAGG	20
GOX1Exon910-F	AT3G14420	CCTAACCAGGTCAACTATAAT	20
GOX1Exon910-R	AT3G14420	GTAAATTCATCTGATTATCGT	20
GOX5UTR-F	AT3G14415	TTGTGAACGATAATATGAAAG	20
GOX5UTR-R	AT3G14415	CATAICAATTTTGTTCACATC	20
GOXexon11-F	AT3G14415	AGAAAAGTTGCTTAAAAACAGT	21
GOXexon11-R	AT3G14415	GTTTCTGTTCTCTGTTTTTTT	21
GOXexon3/4-F	AT3G14415	AAGACTGAGGCTTACTCTAAT	21
GOXexon3/4-R	AT3G14415	CTACTCAGAACAATCATAACG	21
GOXexon5/6-F	AT3G14415	CGTTATGATTGTTCTGAGTAG	21
GOXexon5/6-R	AT3G14415	GATCATTGACACTATTCAGAC	21
GOXexon7/8-F	AT3G14415	TCCTAAACTTGTATGTTTCC	21
GOXexon7/8-R	AT3G14415	TGTCAGGTATTCTATGACAC	21
GOXexon9/10-F	AT3G14415	GTGTCATAGAAATACCTGACA	21
GOXexon9/10-R	AT3G14415	ACTGTTTTTAAGCAACTTTCT	21
GOX-II8-1-F	AT3G14415	TTACAGATTACTACATCAACG	21
GOX-II8-1-R	AT3G14415	TCTCTAGAAATGACTGTTTCA	21
GOX-II36-1-F	AT3G14415	GATGGAACAAAATTGATATG	21
GOX-II36-1-R	AT3G14415	TTCGAGTCTAATCAACTCTTA	21
ICS1-F	AT1G74710	AGTGCATCTGATCGTAATCTGGTT	25
ICS1-R	AT1G74710	TAAGGGGTGAACCTTTCTGGTTAAT	25
JAR1-F	AT2G46370	AACTTTCGACATGAACAGAGTCATT	25
JAR1-R	AT2G46370	CAATGTGTTCTCCATTAATTCATCA	25
Lba1	T-DNA	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	22
Lba1	T-DNA	GGTTCACGTAGTGGGCCATCG	21
Lbb1.3	T-DNA	ATTTTGCCGATTCGGAAC	19
Lbb2	T-DNA	CATCAAACAGGATTTTCGCC	20

LOH1 lo+	AT1G13580	TTCAAGGAACACATCGCTCG	20
LOH1 up	AT1G13580	TGACAGATTCGCTTCGAGG	20
LOH2 lo+	AT3G19260	TGAAGGGCTAGGATGATTGC	20
LOH2 up	AT3G19261	GTCGATGGAGGTCGGCATTTC	22
Loh3 lo+	AT1G13580	TCAGTCTTCGTGCTCATCTTCG	22
Loh3 lo2+	AT1G13580	GGTCCTTCGATTGGATGCTTG	21
Loh3 Up	AT1G13580	GTGACTTACAATGAGCCTTGG	21
LOX2-F	AT3G45140	TTGAACAAGAAGGTAACACAGTGAA	25
LOX2-R	AT3G45140	ACCAACATCGTTGTACACATCATAG	25
LOX4-F	AT1G72520	CGAGGGCTTGCTTAGATACG	20
LOX4-R	AT1G72520	TGAGATCAGCAGGGAGACCT	20
L-TDNA-F	T-DNA	CAGAGACCCTTGTGTGGATT	20
L-TDNA-R	T-DNA	AACTGCTAGACCTATCAAAG	20
MYB30-463AS	AT3G28910	GCCTTTCCCATTTGGCCTCTTG	20
NahG-337R	NahG	ACATAGGGCGTCGATGAAATC	21
NahG-70F	NahG	CTGGAACTCTGCCGCTACTC	20
NHO1-F	AT1G80460	ATGGAGATACTGGAAAGTGTGAAAG	25
NHO1-R	AT1G80460	CAGATCTCTCCAATCACTTCTGAAT	25
OPR1-F	AT1G76680	GGTTTCAGCCAAATGGAAA	20
OPR1-R	AT1G76680	TCCACTTGGAACCTCTTTGG	20
Pac161-3144	AT3G28910	GTTGGATTGATGTGATATCTCC	21
Pac161-8409	AT3G28910	ATATTGACCATCATACTCATTGC	23
PAD3-F	AT3G26830	ATATGAAGAAGAAGCAAGAGAACGA	25
PAD3-R	AT3G26830	AGAAGTAAAGCAAATCAACAATGC	25
PDF1.2a-F	AT2G26020	TTTGCTTCCATCATCACCCTIATCTT	26
PDF1.2a-R	AT2G26020	ACACTTGTGTGCTGGGAAGA	20
pER165R	Vecteur DspA/E	CGTCAGTGGAGATGGATC	20
pER37R	Vecteur DspA/E	TTCCCCCTTCAGTTTAAA	20
pER8 1222B-F	Vecteur	GACAGGGAGCTGGTTCACAT	20
pER8-1222A-F	Vecteur DspA/E	AGCCCCCCATACTCTATTC	21
pER8-1222C-F	Vecteur DspA/E	CTTGCTCTTGGACAGGAACC	20
pER8-4123-F	Vecteur DspA/E	TCGCAAGACCCTTCCCTA	20
pER8-4328-R	Vecteur DspA/E	GTGTGTGGCCAAATGAAACTG	20
pER8RB-F	Vecteur DspA/E	CGTCAGTGGAGATGGATC	20
PR1 qPCR F	AT2G14610	TCTTCCCTCGAAAGCTCAAGAT	22
PR1 qPCR R	AT2G14610	GTGGCTGTTGTGAACCCTTA	21
PR1-F	AT2G14610	CTGGCTAATCTCGATTTTAAATCG	24
PR1-F	AT2G14610	CTGGCTAATCTCGATTTTAAATCG	24
PR1-R	AT2G14610	TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG	24
PR1-R	AT2G14610	TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG	24
PR5-F	AT1G75040	ATGGCAAATATCTCCAGTATCACA	25
PR5-R	AT1G75040	ATGTCGGGGCAAGCCGCGTTGAGG	24
PropDspAFd	DspA/E	CGCTCTAGAATGCTGAAAGGA	21
qDspA-R	DspA/E	TGGTATCTGTCCCCTCAAGGA	20
RT myb3	AT3G28910	ATCAACAATCTGTCCACCAG	20
RT rbohD for	AT5G47910	CTACTGGGTGACTAGGGAACAAGG	24
RT rbohD rev	AT5G47910	TTAAATCTAGAAGTTCTCTTTGTGGAA	26
SAIL 319 E03-F	AT2G40750	GCTGGTGTGTGTTCTCTTGCTC	21
SAIL 319 E03-R	AT2G40750	TTCTTGATCTTTTGATCCCG	21
VSP1-F	AT5G24780	CCTCTCACTTTCCTACTCTTGCTC	25
VSP1-R	AT5G24780	GAGTATGAGATGCTTCCATTTTGT	25
VSP2-F	AT5G24770	TGCATCTTTACCAAAACATCATAGA	25
VSP2-R	AT5G24770	ATGTGTATCCTTCTTCACGAGAC	25
WRKY51-F	AT5G64810	TGGAGGAAGTATGGCAAGAAA	21
WRKY51-R	AT5G64810	CGAAGAAGAGAGTGTGGTTCC	22
WRKY70-F	AT3G56400	AAAGTTATGAACCAACTCGTTGAAG	25
WRKY70-R	AT3G56400	GAATTTGGCATTAAGAATCTCCTT	25



Annexe 10: Voies métaboliques modulées en réponse à *E. amylovora* et à DspA/E chez *A. thaliana*



# Recherche de suppresseurs de la toxicité induite chez *Arabidopsis thaliana* par l'effecteur de type 3 DspA/E et étude du stress oxydant au cours de l'infection

## Résumé :

La bactérie *Erwinia amylovora* est responsable de la maladie du feu bactérien des *Maleae* (pommier, poirier...). Le pouvoir pathogène de cette bactérie dépend d'une seringue moléculaire appelé système de sécrétion de type 3 (SSTT). Ce SSTT permet à la bactérie d'injecter des effecteurs dans les cellules de la plante. Parmi les effecteurs injectés, DspA/E est l'effecteur indispensable au pouvoir pathogène d'*E. amylovora*. Cet effecteur est à lui seul capable de provoquer la mort des cellules chez le pommier et le tabac et permet à la bactérie de se multiplier de manière transitoire chez *A. thaliana*.

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre la fonction de DspA/E dans la cellule végétale et d'identifier des facteurs végétaux impliqués dans la toxicité de DspA/E. Afin de répondre à cette question, des plantes transgéniques exprimant DspA/E sous contrôle d'un promoteur inductible à l'estradiol ont été construites.

Dans un premier temps, la caractérisation phénotypique des lignées exprimant DspA/E a été effectuée. Les résultats obtenus montrent que DspA/E est toxique lorsqu'il est exprimé *in planta* (il provoque la mort des cellules, inhibe la germination, la croissance racinaire et la traduction) et permet la multiplication *in planta* d'un mutant *dspA/E*.

Un crible de mutants suppresseurs de la toxicité de l'effecteur DspA/E a été effectué sur une lignée transgénique exprimant DspA/E dans le but d'identifier un ou plusieurs gènes impliqués dans la toxicité de DspA/E. Ce crible suppresseur a permis d'identifier un candidat potentiel impliqué dans la photo-respiration, la glycolate oxydase 2 (GOX2). L'analyse fonctionnelle réalisée sur le mutant *gox2-2* a permis de montrer que le gène *GOX2* est un régulateur positif des réponses de défense d'*A. thaliana* en réponse à l'infection par *E. amylovora*.

Enfin, la caractérisation du stress oxydant a permis de montrer que plusieurs formes actives de l'oxygène ( $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$ ) s'accumulent au cours de l'interaction entre *A. thaliana* et *E. amylovora*. Ceci a permis également de comprendre le rôle de DspA/E sur ce stress oxydant. Nos résultats suggèrent que la glycolate oxydase 2 participerait à l'induction du stress oxydant en perturbant le métabolisme des sucres.

**Mots clés:** *Arabidopsis thaliana*, *Erwinia amylovora*, DspA/E, glycolate oxydase 2, stress oxydant

## Abstract :

The bacterium *E. amylovora* is responsible for the fire blight disease of *Maleae* (apple, pear...). The pathogenicity of this bacterium relies on a molecular syringe, the type three secretion system (TTSS). This TTSS allows the bacterium to inject effector proteins into the plant cell. Among these effectors, DspA/E is essential for the pathogenicity of *E. amylovora*. This effector can provoke cell death on apple and tobacco and allows the bacterium to multiply transiently in *A. thaliana*.

The purpose of the thesis was to understand the function of DspA/E in the plant cell and to identify plant factors involved in the toxicity of DspA/E. To answer this question, transgenic plants which express DspA/E under an estradiol-inducible promoter were built.

At first, phenotypical characterization of DspA/E transgenic lines was performed. Our results showed that DspA/E is toxic when expressed *in planta* (it provokes cell death, inhibits germination, root growth and translation) and allows *in planta* multiplication of *dspA/E* bacterial mutant.

A screening for suppressor mutants of DspA/E toxicity was performed on a DspA/E transgenic line in order to identify one or several genes involved in the toxicity of DspA/E. This screening allowed us to identify a potential candidate involved in photorespiration, the glycolate oxidase 2 (GOX2). Functional analysis performed on the *gox2-2* mutant allowed us to show that the *GOX2* gene is a positive regulator of *A. thaliana* responses against *E. amylovora*.

Finally, characterization of oxidative stress allowed us to show that several reactive oxygen species ( $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$ ) accumulate during *A. thaliana* and *E. amylovora* interaction. This allowed us to understand the role of DspA/E in the oxidative stress. Our results suggest that the glycolate oxidase 2 could be involved in the induction of the oxidative stress by disrupting sugar metabolism.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Erwinia amylovora*, DspA/E, glycolate oxidase 2, oxidative stress