



Genetic bases of adaptation in the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* during infection of the cauliflower host

Julien Luneau

► To cite this version:

Julien Luneau. Genetic bases of adaptation in the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* during infection of the cauliflower host. Symbiosis. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. English. ⟨NNT : 2021TOU30015⟩. ⟨tel-03934808⟩

HAL Id: tel-03934808

<https://theses.hal.science/tel-03934808v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Julien LUNEAU

Le 2 février 2021

**Bases génétiques de l'adaptation de la bactérie phytopathogène
Xanthomonas campestris pv. *campestris* aux environnements
colonisés pendant l'infection de son hôte le chou-fleur**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Interactions plantes-microorganismes**

Unité de recherche :

LIPME - Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement

Thèse dirigée par
Emmanuelle LAUBER et Alice BOULANGER

Jury

M. Joël POTHIER, Rapporteur

Mme Céline LAVIRE, Rapporteur

M. Jean-Philippe GALAUD, Examineur

Mme Emmanuelle LAUBER, Directrice de thèse

Remerciements

Tout d’abord, je tiens à remercier très chaleureusement mes directrices de thèse, Alice et Manue. Je me suis vraiment éclaté pendant ces trois ans de thèse et vous êtes certainement une des raisons principales. Dès le début, vous m’avez accordé votre confiance et considéré comme un collaborateur sur le projet. Vous avez toujours été disponibles quand j’en avais besoin et avez fait preuve d’une bienveillance sans faille. Vous avez toujours été à l’écoute de mes idées, de mes doutes et m’avez permis de suivre mes envies en explorant de nouvelles directions. Vous m’avez apporté un soutien inestimable à travers vos conseils avisés et votre expérience, dans la gestion du projet comme à la paillasse. Merci Manue pour ta gentillesse, ta patience, ta pédagogie et ton exemplarité. Merci Alice pour ton énergie, ta positivité, ton pragmatisme et surtout ton humour. Bref, ça aura été un vrai plaisir de travailler et d’apprendre à vos côtés. Vous êtes des mentors d’exception. La science est ce qu’elle est, avec des hauts et des bas, des succès et des échecs, mais grâce à vous cette thèse est, et restera, une expérience réussie.

Bien entendu, je tiens également à remercier l’ensemble de l’équipe SIX qui a contribué à créer un environnement de travail aussi accueillant et agréable. La convivialité et l’entraide sont au cœur de ce qui fait notre équipe et toutes les pauses café, les repas, les discussions (scientifiques ou non), les gâteaux et les anecdotes ont sans aucun doute embelli ces trois années de thèse. Merci Carine et Corinne pour votre franc-parler, votre générosité et votre bonne humeur à toute épreuve ! Merci Manuel, mon voisin de bureau pendant 3 ans, pour nos longues discussions, pour ton humour et pour tes memes de qualité ! Merci Caroline pour ton empathie, ton honnêteté et des bonnes doses de sarcasme ! Merci Noe pour ta sérénité, ton calme et ta joie de vivre quotidienne ! Merci Matthieu pour ta bienveillance, tes blagues plus qualitatives les unes que les autres, et ton partage des joies de la politique locale ! Merci Jean-Marc pour nos discussions scientifiques et pour ton dévouement à l’embellissement du patio cactus. Enfin, merci Laurent pour tous tes conseils, ton soutien et ta participation à nos débats occasionnellement houleux mais toujours intéressants auxquels j’ai pris plaisir à participer.

Je voudrais aussi remercier tous ceux qui ne font plus partie de l'équipe mais avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler : Aude, pour ta gentillesse et pour avoir été celle qui m'a initié au fabuleux monde des hydathodes ; Ivanna pour ta bonne humeur constante ; David pour les soirées et toutes ces fois où on a refait le monde. Merci également à Antoine, Jonas, Babil et tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans l'équipe et qui ont contribué à la bonne ambiance.

Un gros merci également à tous les amis du labo pour le soutien, les ragots, les soirées et tous les bons moments : Bryan, David, Léa, Claire, Anthony, Nargess, Ben etc. Merci aussi à tous les membres de l'AJS que j'ai eu l'occasion de rencontrer autour d'un café ou d'une bière. Merci à Julie qui aura été à mes côtés pendant la fin de cette thèse.

De manière plus large, je remercie également toute la communauté du LIPM pour l'environnement scientifique et humain qui a permis le bon déroulement de cette thèse. En particulier, un gros merci à l'équipe de la serre, Claudette, Fabrice, Marine, Anaïs sans qui je n'aurais pas eu les milliers de choux dont j'ai eu besoin pour ma thèse. Merci aussi aux Services communs du LIPM, aussi bien l'équipe de la Gestion que celle de la Laverie, qui assurent le bon fonctionnement du labo. Merci également à l'équipe de direction du LIPM, Claude, Stéphane et Fanny, pour tous leurs efforts de gestion et de coordination notamment en cette année 2020 si imprévisible.

Merci à Christophe Roux de m'avoir donné l'opportunité d'être membre du Conseil Scientifique de la Fédération de Recherche Agrobiosciences Interactions Biodiversité. J'ai beaucoup appris sur l'importance du travail fédératif, l'animation locale et les rouages des appels à projets. Merci également à Annie Ouin et Martina Rickauer pour l'opportunité d'enseigner en écologie et en phytopathologie à la prépa de l'INP et à l'ENSAT.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir sur mon projet de thèse. Merci aux membres de mon comité de thèse Erwan Gueguen, Delphine Capella et Caroline Baroukh pour le temps qu'ils m'ont accordé et leurs conseils avisés. Merci à l'Université Toulouse III Paul Sabatier et au Ministère de l'Éducation Supérieure, de la Recherche et de l'Innovation pour avoir financé cette thèse. Merci à la Société Française de Phytopathologie et au réseau européen du COST EuroXanth pour avoir financièrement contribué à ma participation à divers congrès

pendant ma thèse. Merci également aux membres du réseau FNX pour leur accueil et leur convivialité.

Je tiens évidemment à remercier tous mes amis d'avant la thèse qui m'ont régulièrement permis de déconnecter : Yann, Gaétan, Corentin, Paul, Antoine, Clément, Florian, Quentin, Pierre, Benjamin, Laurence, Vanessa... Et merci aux autres fous qui se sont embarqués dans la même galère que moi en faisant une thèse et avec qui ça fait du bien de partager : Fred, Sophie, Séverin, Justine, Alexis et *al.*

Je termine en remerciant ma famille, mes grands-parents, mes parents et mon frère et mon oncle pour leur soutien inconditionnel. En particulier, un gros merci à mes parents qui ont toujours été là pour moi, qui m'ont soutenu et accompagné dans tous mes choix et qui m'ont permis d'arriver où je suis aujourd'hui. Et bon courage à mon frère Baptiste qui se lance dans un doctorat de médecine.

Enfin, mes remerciements vont aux membres du jury Joël Pothier, Céline Lavire, Marc Valls, Matthieu Barret et Jean-Philippe Galaud pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit et lors de la soutenance.

Merci à tous !

Résumé

Les micro-organismes pathogènes ont un impact significatif sur les productions agricoles mondiales. En particulier, le genre *Xanthomonas* regroupe des bactéries pathogènes sur plus de 400 espèces végétales. Parmi elles, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, l'agent responsable de la nervation noire des Brassicacées, représente la principale menace à l'encontre de la production de choux, radis, navets, moutarde etc. De par son impact économique, *Xcc* est rapidement devenu un modèle pour l'étude des bactéries phytopathogènes. Les facteurs de virulence déployés par ces bactéries pendant l'infection de l'hôte ont ainsi été extensivement caractérisés mais plusieurs zones d'ombre persistent.

Dans la mesure où *Xcc* rentre dans les feuilles par les hydathodes, se propage de façon systémique en colonisant les vaisseaux du xylème et se multiplie dans le mésophylle, nous avons fait l'hypothèse que différentes stratégies infectieuses étaient mises en place par les bactéries dans chacun de ces environnements. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressé à la question de l'adaptation de *Xcc* 8004 à ces trois milieux rencontrés au cours du cycle infectieux, avec comme hôte modèle le chou-fleur commercial *Brassica oleracea* cv. *botrytis* var. Clovis F1. Par des approches de génomique fonctionnelle, nous avons ainsi pu décrire les réponses physiologiques de *Xcc* lors de l'infection des hydathodes et identifier les bases génétiques de la fitness bactérienne dans deux des trois environnements rencontrés (hydathodes et xylème).

L'étude du profil transcriptomique de *Xcc* lors de l'infection précoce (4 heures post-inoculation) et tardive (3 jours post-inoculation) des hydathodes de chou-fleur a mis en évidence une reprogrammation massive de l'expression de plus de 800 gènes. Un criblage RB-TnSeq a de son côté permis de montrer que près de 200 gènes sont requis pour la fitness de *Xcc* dans les hydathodes et la sève de xylème. De plus, nous avons pu démontrer qu'un nouvel effecteur de type III, appelé XopJ6, est reconnu par le chou-fleur Clovis F1 et que sa présence impacte la multiplication de *Xcc* dans certains tissus de l'hôte. Dans leur globalité, les résultats obtenus au cours de cette thèse exposent la capacité de *Xcc* à s'adapter à son environnement direct en déployant des stratégies aussi bien à l'échelle de la population, que de l'individu ou même du gène. Ce projet permet donc d'avoir une vision d'ensemble sur le comportement de *Xcc* au cours du cycle infectieux et s'intègre dans un effort de groupe visant à décrypter les interactions plante-pathogène.

Abstract

Crops are under constant threat from pathogenic microbes worldwide. In particular, the *Xanthomonas* genus encompasses bacterial pathogens capable of infecting over 400 plant species. Among them, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal agent of the Black rot disease of *Brassicaceae*, represents the major bacterial pathogen of cabbages, radish, mustard etc. Because of its economic impact, *Xcc* quickly became a model for the study of bacterial phytopathogens. Virulence factors involved in the infection and colonization of the host have thus been extensively characterized, but other aspects of the pathogenic lifestyle have been overlooked.

Xcc infects the leaves of its hosts via hydathodes pores, then spreads systemically by colonizing the xylem vessels and thrives in the mesophyll where it triggers disease symptoms. We hypothesized that the diversity of environments colonized in the plant is sustained by deploying different adaptive strategies. Therefore, during my PhD I focused on the identification of genetic bases underlying the adaptation of *Xcc* 8004 to the environments encountered during the infection cycle of its natural host, the commercial cauliflower *Brassica oleracea* cv. *botrytis* var. Clovis F1. Using functional genomics approaches, we described the physiological response of *Xcc* during hydathodes infection and investigated the genes required for bacterial fitness in two of the three infected tissues (hydathodes & xylem).

The study of *Xcc*'s transcriptomic profile during hydathodes early (4 hours post-inoculation) and late (3 days post-inoculation) infection revealed a massive reprogramming of the expression of more than 800 genes. On the other hand, an RB-TnSeq screening showed that nearly 200 genes directly contribute to *Xcc* fitness into hydathodes and xylem sap. We could also demonstrate that a novel type III effector, called XopJ6, is recognized by the cauliflower variety Clovis F1 and that its presence affects multiplication of *Xcc* into plant tissues. In all, the results generated during this PhD project expose the ability of *Xcc* to implement adaptive strategies at the level of the population, the individual cell and the single gene. This overview of the behavior and adaptation of *Xcc* during plant infection is part of an integrative group effort aiming at deciphering molecular plant-microbe interactions from both the host's and the pathogen's perspective.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	4
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des Figures	8
Liste des Tableaux	11
Liste des Annexes	12
List des Abréviations	13
Chapitre 1 Introduction générale	15
1.1 Les plantes et leur environnement en agronomie	17
1.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	21
1.2.1 Gamme d'hôte et problèmes agronomiques	21
1.2.2 Transmission par les graines et vie épiphyte	23
1.2.3 Entrée dans les feuilles par les pores de l'hydathode	25
1.2.4 Propagation systémique par le réseau du xylème	31
1.2.5 Colonisation locale et distante du mésophylle	33
1.2.6 Xcc : un bon modèle pour la recherche scientifique	34
1.2.7 « Fun fact » : Xcc, vous en voulez ? Vous en mangez !	35
1.3 Les mécanismes de l'adaptation de Xcc à son environnement	35
1.3.1 Perception de l'environnement par les systèmes à deux composants	37
1.3.2 Acquisition de nutriments par les transporteurs	39
1.3.3 Orientation par le chimiotactisme et la mobilité	41
1.3.4 Installation par formation de biofilms	42
1.3.5 Sécrétion de facteurs de virulence	43
1.3.5.1 Le système de sécrétion de type II	45
1.3.5.2 Le système de sécrétion de type III	47
1.3.6 Régulation du pouvoir pathogène	49
1.3.6.1 Le quorum sensing	51
1.3.6.2 Modulation intracellulaire par les régulateurs transcriptionnels et les seconds messagers	51
1.4 La génomique au service de la recherche sur Xcc	54
1.4.1 Le RNAseq : comprendre le comportement bactérien par l'étude du transcriptome	54
1.4.2 Le TnSeq : quantifier la contribution de chaque gène à la fitness bactérienne	57

Chapitre 2 Projet de thèse	61
Chapitre 3 Résultats	65
Partie 1. Transcriptome de Xcc dans l'hydathode : adaptations physiologiques et expression du pouvoir pathogène	67
3.1.1 Contexte	67
3.1.2 Contribution	67
3.1.3 Discussion & Perspectives	119
Partie 2. Identification des déterminants de la fitness de Xcc dans l'hydathode et la sève de xylème par RB-TnSeq	121
3.2.1 Contexte	121
3.2.2 Contribution	122
3.2.3 Discussion & Perspectives	166
3.2.4 Élaboration d'un test de compétition pour évaluer la fitness bactérienne au cours de l'infection.	170
Partie 3. XopJ6 : Identification d'une nouvelle source de résistance à Xcc chez le chou-fleur ?	181
3.3.1 Entre sérendipité et gros coup de chance : l'effecteur de type III XopJ6 sécrété par Xcc est reconnu par le chou-fleur Clovis F1	173
3.3.2 Un deuxième gros coup de chance : XopJ6 est l'orthologue de PopP2, un effecteur de <i>Rasltonia solanacearum</i> extensivement caractérisé	187
3.3.3 XopJ6 : facteur de virulence ou d'avirulence chez le chou-fleur ?	191
3.3.4 Discussion & Perspectives	195
Chapitre 4 Discussion générale	201
4.1 Conclusions : ce que nous ont appris ces travaux de thèse	203
4.2 Perspectives : maintenant quoi ?	205
4.2.1 La banque RB-TnSeq : un outil précieux pour comprendre l'écologie de Xcc	205
4.2.2 Combiner RNAseq et TnSeq pour produire une image haute définition de la physiologie de Xcc lors de l'infection	209
4.2.3 Quelques candidats à approfondir...	210
Chapitre 5 Matériel & Méthodes	213
5.1 Matériels biologiques	215
5.1.1 Les plantes	215
5.1.2 Les bactéries	215
5.1.2.1 Souches bactériennes & Milieux de culture	215
5.1.2.2 Clonages & Conjugaison	216
5.2 Test de HR	216
5.3 Tests de croissance <i>in planta</i>	217
5.4 Tests de compétition	217
Annexes	219
Bibliographie	223

Liste des Figures

Chapitre 1 Introduction générale

- Figure 1 Les plantes sont en interactions avec leur environnement biotique et abiotique
- Figure 2 Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont des phytopathogènes d'intérêt agronomique
- Figure 3 Cycle infectieux de *Xcc* et symptômes de la nervation noire des Brassicacées
- Figure 4 Structure anatomique et fonction de guttation des hydathodes chez le chou
- Figure 5 *Xcc* développe un comportement biotrophe puis nécrotrophe dans les hydathodes
- Figure 6 *Xcc* colonise abondamment les vaisseaux du xylème conduisant à une infection systémique
- Figure 7 *Xcc* infecte le mésophylle foliaire
- Figure 8 Les systèmes à deux composants perçoivent l'environnement et assurent la transduction du signal
- Figure 9 Les transporteurs actifs assurent l'import de nutriments dans la cellule
- Figure 10 Le flagelle et le pilus de type IV assurent la mobilité bactérienne
- Figure 11 *Xcc* déploie un arsenal de facteurs de virulence lors de l'infection
- Figure 12 Structure des systèmes de sécrétion chez *Xanthomonas*
- Figure 13 *Xanthomonas* utilise le T3SS pour injecter des effecteurs dans la cellule hôte et manipuler sa physiologie
- Figure 14 Le quorum sensing régule la dynamique de formation et de dispersion des biofilms
- Figure 15 Intégration des signaux et régulation du pouvoir pathogène chez *Xanthomonas*
- Figure 16 Principe du TnSeq
- Figure 17 Principe du RB-TnSeq

Chapitre 3 Résultats

Partie 1 Transcriptome de *Xcc* dans l'hydathode : adaptations physiologiques et expression du pouvoir pathogène

- Figure 1 *Xanthomonas campestris* undergoes a massive transcriptomic reprogramming during hydathodes infection
- Figure 2 *Xanthomonas* colonization of hydathodes

Figure 3	Schematic representation of <i>Xcc</i> main transcriptomic responses happening during the early steps of hydathode infection
Figure S1	Measure of hydathode population in the two conditions used for RNAseq
Figure S2	RNAseq samples clustering
Figure S3	Assessment of swimming motility in type IV pilus and flagellum mutants of <i>Xcc</i>
Figure S4	Evaluation of disease symptoms severity during infection of cauliflower leaves by <i>Xcc</i> mutants
Figure S5	Phenotypic characterization of <i>hrpG</i> mutants
Figure S6	Synteny of genes involved in two transport systems in <i>Xcc</i>
Figure S7	Growth of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> wild-type and mutant strains in MME minimal medium and MOKA rich medium.
Partie 2	Identification des déterminants de la fitness de <i>Xcc</i> dans l'hydathode et la sève de xylème par RB-TnSeq
Figure 1	An RB-TnSeq library of <i>Xcc</i> mutants to screen for fitness determinants <i>in vitro</i> and <i>in planta</i>
Figure 2	RB-TnSeq identifies over 180 genes contributing to <i>Xcc</i> fitness in hydathodes and xylem sap
Figure 3	Functional validation confirms the importance of selected candidate genes for <i>Xcc</i> fitness and pathogenicity
Figure 4	Mutation of <i>XC_3388</i> leads to a pleiotropic deregulation of biological processes in <i>Xcc</i>
Figure S1	Correlation between biological replicates of RB-TnSeq assays shows experimental reproducibility
Figure S2	RB-TnSeq results <i>in vitro</i>
Figure S3	Absence of correlation between <i>Xcc</i> RNAseq and RB-TnSeq data in hydathodes
Figure S4	Comparison of <i>Xcc</i> mutants fitness in plant-associated environments and <i>in vitro</i> conditions tested
Figure S5	Growth of the ΔXC_3388 mutant on diverse carbon sources identified by metabolic fingerprinting.
Partie 3	XopJ6 : Identification d'une nouvelle source de résistance totale à <i>Xcc</i> chez le chou-fleur ?
Figure 1	Symptômes de collapse observés en réponse à l'infiltration des souches de <i>Xcc</i> disponibles dans l'équipe
Figure 2	Les symptômes de collapse observés chez Clovis F1 sont obtenus exclusivement avec des souches portant XopJ6

- Figure 3 Arbre phylogénétique des 25 membres de la famille d'effecteurs bactériens YopJ
- Figure 4 XopJ6 est un facteur d'avirulence reconnu par la paire de récepteurs RRS1/RPS4 chez *Arabidopsis thaliana*
- Figure 5 La présence de XopJ6 chez *Xcc* entraîne un collapse rapide du mésophylle foliaire du chou-fleur Clovis F1
- Figure 6 XopJ6 limite la multiplication de *Xcc* dans les hydathodes du chou-fleur
- Figure 7 XopJ6 contribue à la multiplication de *Xcc* dans le mésophylle du chou-fleur
- Figure 8 XopJ6 ne semble pas être reconnu chez les autres Brassicacées d'intérêt testées

Chapitre 4 Discussion générale

- Figure 1 Goulots d'étranglements potentiellement rencontrés par *Xcc* lors de la colonisation du xylème

Liste des Tableaux

Chapitre 3 Résultats

Partie 1 Transcriptome de *Xcc* dans l'hydathode : adaptations physiologiques et expression du pouvoir pathogène

Table 1	GO terms of biological processes enriched among <i>Xcc</i> genes differentially expressed in hydathodes
Table 2	GO terms enrichment among <i>Xcc</i> genes belonging to the HrpG regulon
Table 3	Impact of transcriptomic data on the <i>de novo</i> annotation of the genome of <i>Xcc</i> strain 8004
Table S1	List of strains and vectors used in this study
Table S2	Sequences of oligonucleotides used for construction of deletion and complementation plasmids
Table S3	Séquences of oligonucleotides used for oligo-capture of plant RNAs
Table S4	List of DE genes
Table S5	Functional attribution of DE genes
Table S6	Properties of RNAseq libraries from <i>Xcc</i> strain 8004 wild-type and derivatives grown in vitro or harvested from cauliflower hydathodes

Partie 2 Identification des déterminants de la fitness de *Xcc* dans l'hydathode et la sève de xylème par RB-TnSeq

Table 1	List of genes selected for validation of the RB-TnSeq data
Table 2	Genes for which RB-TnSeq mutants displayed a gain of fitness during hydathodes infection
Table S1	List of essential genes in <i>Xcc</i> 8004
Table S2	172 genes contribute to <i>Xcc</i> fitness during hydathodes colonization
Table S3	Genes important for <i>Xcc</i> growth in xylem sap but not in hydathodes
Table S4	Genes contributing to <i>Xcc</i> fitness in both hydathodes and xylem
Table S5	Amino acid biosynthesis pathways are required for <i>Xcc</i> fitness in the host plant and <i>in vitro</i> media
Table S6	List of strains and plasmids used in this study
Table S7	List of oligos used in this study

Partie 3 XopJ6 : Identification de la première source de résistance totale à *Xcc* chez le chou-fleur ?

Table 1 Symptômes de collapse observés chez tous les mutants d'effecteurs de type III de *Xcc* 8004

Liste des Annexes

Annexe 1 Liste des souches et plasmides construits pour l'étude du coût de virulence et de l'hétérogénéité phénotypique chez *Xcc*

Annexe 2 Liste des oligos utilisés pour l'étude de l'hétérogénéité phénotypique chez *Xcc*

Liste des Abréviations

CFU	Colony-Forming Unit
cv.	cultivar
dpi	days post-inoculation
ET3	Effecteur de type III
EPS	Exopolysaccharides
GFP	Green Fluorescent Protein
GO	Gene Ontology
GUS	β -Glucuronidase
hpi	hours post-inoculation
HR	Hypersensitive Response
hrp	hypersensitive response and pathogenicity
LPS	Lipopolysaccharides
MCP	Methyl-accepting Chemotaxis Protein
OD₆₀₀	Optical Density (600 nm)
pv.	pathovar
T2SS	Type II Secretion System
T3SS	Type III Secretion System
TBDT	TonB-Dependent Transporter
TCS	Two-Components System
WT	Wild type
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xop	<i>Xanthomonas</i> outer protein

Chapitre 1

Introduction
Générale

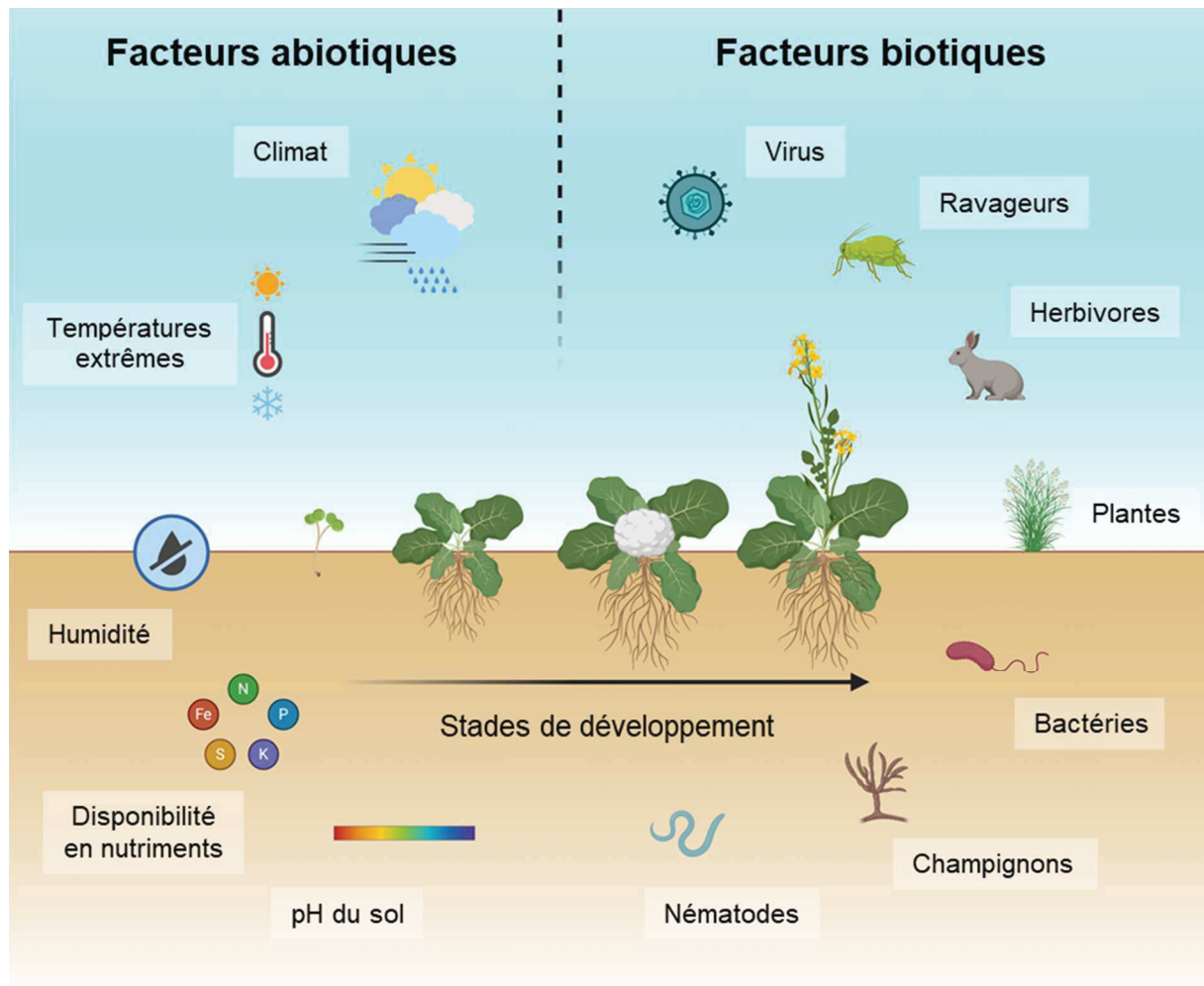


Figure 1 | Les plantes sont en interactions avec leur environnement biotique et abiotique. Les facteurs abiotiques comme les épisodes de températures extrêmes, de sécheresse et de carence en nutriments sont source de stress pour les plantes. Les plantes subissent aussi des stress biotiques comme les attaques de ravageurs, d'herbivores, de microorganismes pathogènes (bactéries, virus, champignons) ou par compétition avec d'autres plantes. L'ensemble de ces interactions impose des stress sur la plante avec des conséquences variées selon le stade de développement.

1.1 Les plantes et leur environnement en agronomie

L'agriculture est au cœur de notre société. En particulier, les productions végétales, qu'elles soient destinées à l'élevage ou à l'homme, sont le socle de notre alimentation. Les systèmes de production associés aux plantes cultivées sont donc en constante évolution pour assurer des récoltes en quantité et en qualité suffisantes. Cependant les systèmes monocultureux intensifs mis en place depuis les années 1950 avec la Révolution verte montrent des signes de faiblesse. L'utilisation massive d'intrant fertilisants et phytosanitaires a eu un impact néfaste sur l'environnement et la santé humaine. Une nouvelle approche des agrosystèmes, plus holistique, a donc dû être développée pour réévaluer la place des plantes dans leur environnement de culture et envisager une agriculture plus durable. Il s'agit alors de s'intéresser à la plante à la fois en tant qu'organisme individuel mais également comme membre d'un écosystème complexe où elle est soumise à divers stress biotiques et abiotiques (**Figure 1**). Les stress abiotiques peuvent être causés par des températures extrêmes, l'absence ou l'excès d'eau, la salinité ou encore les radiations. De leur côté, les stress biotiques se caractérisent par une interaction néfaste entre la plante et d'autres organismes vivants comme les bactéries, champignons, oomycètes, virus, nématodes, animaux ou même d'autres plantes. Dans la mesure où les plantes sont des organismes sessiles, elles sont constamment exposées à ces stress auxquels elles ne peuvent échapper. Lorsqu'il s'agit de plantes cultivées, ces stress peuvent se traduire par des pertes significatives de rendements, comme l'a d'ailleurs souligné une évaluation récente qui estime que les dommages causés par les stress biotiques peuvent détériorer jusqu'à 40% des récoltes (Savary et al., 2019).

Cependant, tous les micro-organismes associés aux plantes ne sont pas pathogènes. Il existe en effet des communautés microbiennes très diversifiées, appelées microbiote, qui vivent en association proche avec leur hôte végétal, que ce soit au niveau racinaire ou aérien (Hassani et al., 2019; Fitzpatrick et al., 2020). Certains micro-organismes ont même un effet positif sur leur hôte. C'est par exemple le cas des bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* ou des champignons mycorhiziens à arbuscule qui vont, en interaction avec les racines de leur hôte fournir, respectivement, l'azote ou le phosphate nécessaire à leur croissance. En retour, les plantes fournissent des produits issus de la photosynthèse au partenaire symbiotique favorisant ainsi leur multiplication (Smith and Smith, 2011; Udvardi and Poole, 2013).

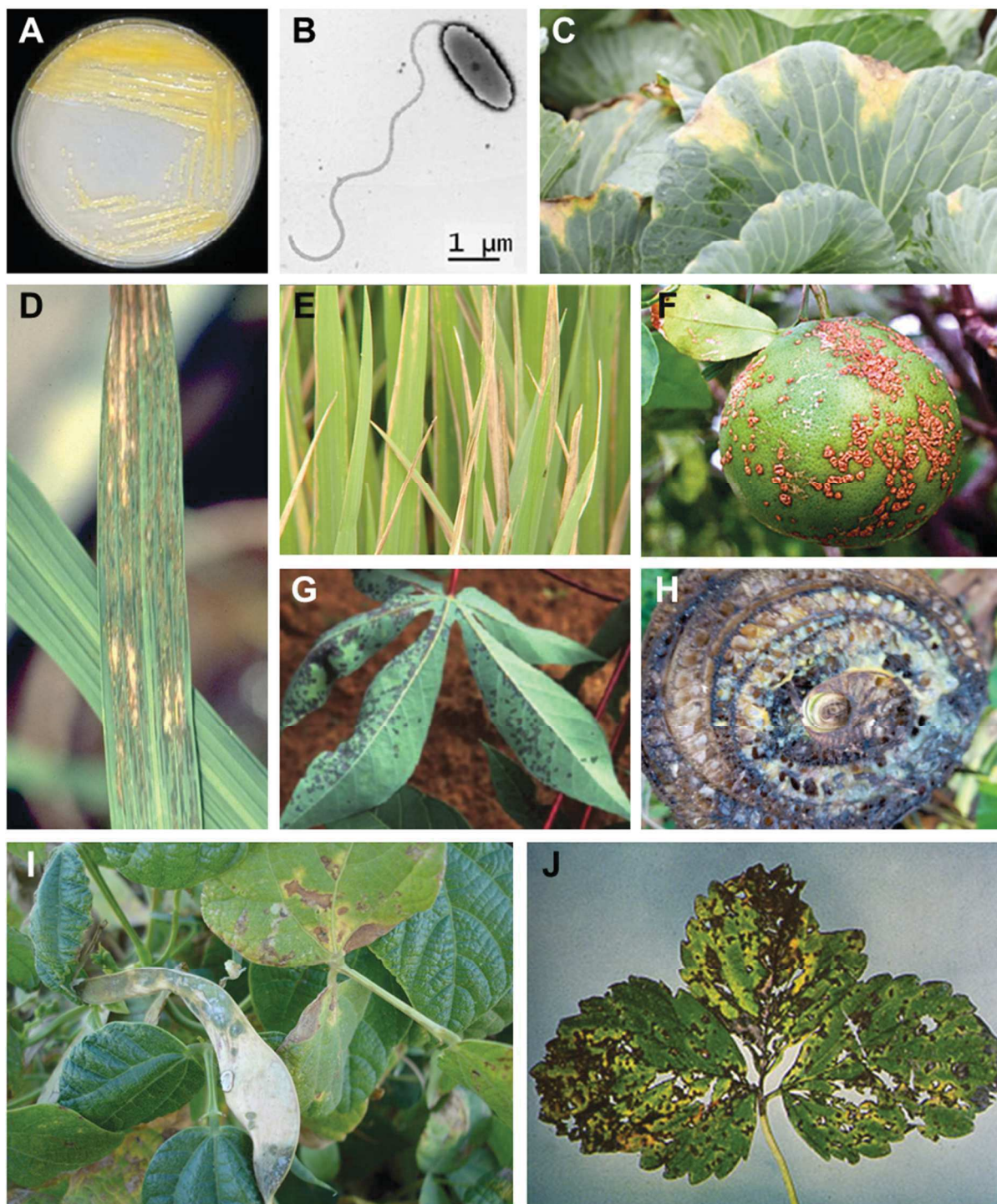


Figure 2 | Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont des phytopathogènes d'intérêt agronomique majeur. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* **A)** cultivé sur milieu riche et **B)** observé en microscopie électronique. Exemples de symptômes causés par les *Xanthomonas* : **C)** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur le chou, **D)** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* et **E)** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur le riz, **F)** *Xanthomonas citri* pv. *citri* sur les agrumes, **G)** *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* sur le manioc, **H)** *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* sur la banane, **I)** *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* sur le haricot et **J)** *Xanthomonas fragariae* sur la fraise. Photos A) & B) adaptées de Vicente & Holub, 2013 ; C) An et al., 2019 ; G) Mansfield et al., 2012 ; Le reste des photos sont issues de <https://gd.eppo.int>, courtoisie de D) T.W. Mew, IRRI, Los Baños (PH), H) M. M. Shimwela, Tanzania Agricultural Research Institute, Maruku, Tanzania, I) Ebrahim Osdaghi, J) U. Mazzucchi, Università di Bologna (IT).

Dans la nature, malgré la présence abondante d'agents pathogènes, la maladie reste un événement rare. L'infection se déclenche seulement lorsque les conditions adaptées à la maladie sont réunies : un agent pathogène virulent est présent sur un hôte sensible dans un environnement favorable. Dans la mesure où les systèmes culturaux actuels sont basés sur des cultures uniques à grande échelle, un agent pathogène peut rapidement devenir très dommageable si les conditions environnementales le permettent. Actuellement, plusieurs méthodes de lutte sont déployées pour limiter les épidémies comme (i) la mise en place de programmes de sélection variétale pour la production de cultures naturellement résistantes aux pathogènes et (ii) l'utilisation de traitements phytosanitaires biocides qui ciblent l'agent pathogène pour ralentir fortement sa croissance ou conduire à sa mort. Cependant, les maladies bactériennes restent particulièrement compliquées à contrôler. Ceci est principalement dû à l'interdiction en Europe d'utiliser des antibiotiques sur les productions végétales afin de limiter la propagation d'antibiorésistances chez les pathogènes animaux et humains. De plus, même si la lutte génétique est efficace, trouver des sources de résistances contre un agent pathogène reste un processus long et ardu. La meilleure approche reste alors d'appliquer des méthodes de prophylaxie pour limiter l'arrivée des agents pathogènes et leur propagation pendant la saison culturale. Malheureusement, les techniques préventives ne sont parfois pas suffisantes et les épidémies non traitées peuvent avoir des conséquences déplorables. Il est donc crucial d'identifier d'autres leviers d'action pour répondre aux enjeux associés à la santé des plantes. La première étape consiste alors à étudier les interactions entre les agents pathogènes et leurs hôtes pour comprendre comment l'infection démarre et identifier les facteurs qui participent au développement de la maladie.

1.2 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

1.2.1 Gamme d'hôte et problèmes agronomiques

Le genre *Xanthomonas* rassemble une diversité importante de bactéries associées aux plantes. Il tire son nom de la pigmentation jaune (*xanthos* en grec) qui caractérise ces bactéries (**Figure 2**). Le genre *Xanthomonas* est subdivisé en 27 espèces, dont la majorité sont connues

A

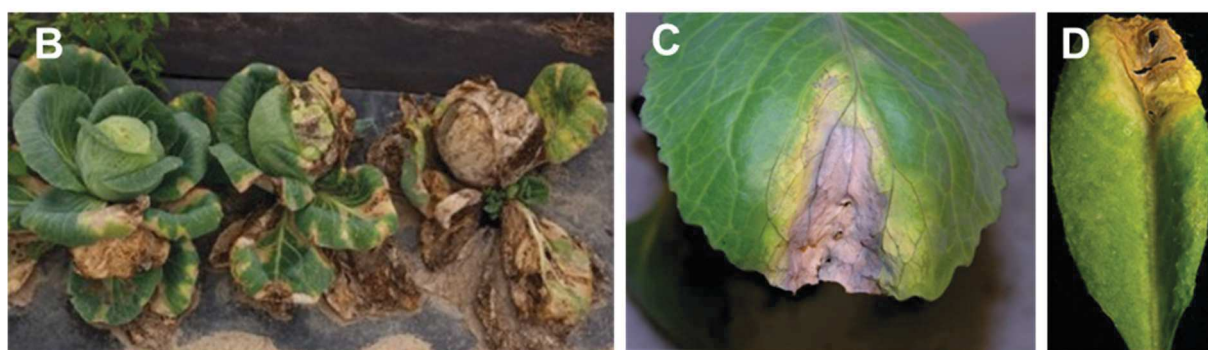
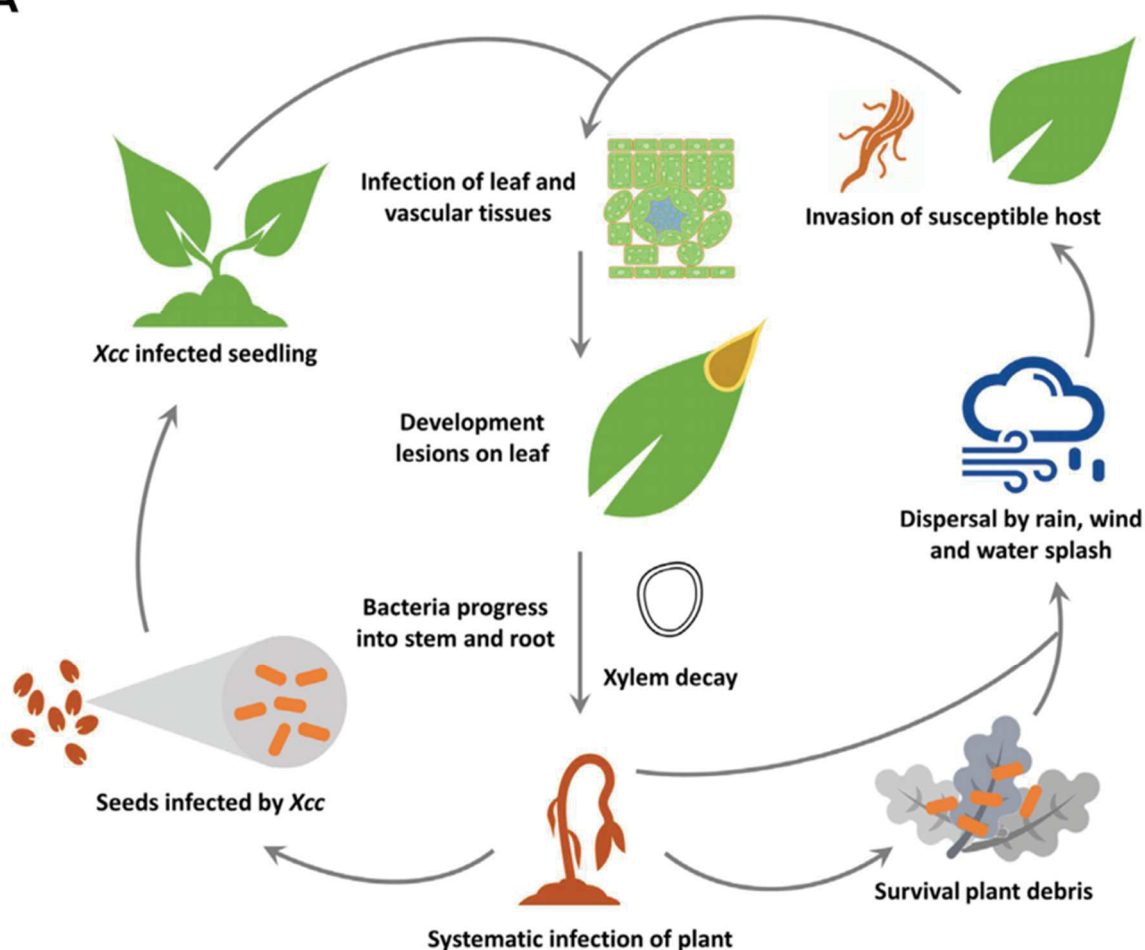


Figure 3 | Cycle infectieux de *Xcc* et symptômes de la nervation noire des brassicacées. **A)** Représentation du cycle infectieux de *Xcc*. L'infection a lieu lors de la transmission du pathogène par la graine d'une plante infectée à sa descendance ou par dispersion via éclaboussures sur une plante infectée ou des débris végétaux contaminés. Après entrée dans les tissus foliaires et vascularisation, l'infection conduit aux symptômes de la nervation noire et parfois même à la mort de la plante (An et al., 2019). **B)** Exemple des dégâts que peut causer *Xcc* sur des choux au champ (Photo : courtoisie de Zoe Dubrow, Cornell University). Les symptômes classiques de la nervation noire des brassicacées **C)** sur chou-fleur et **D)** sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* se caractérisent, comme sur ces photos d'infection en conditions de laboratoire, par une chlorose puis une nécrose en forme de V émanant de la marge de la feuille (Meyer et al., 2005).

pour être des phytopathogènes responsables de dégâts importants sur près de 400 espèces végétales (An et al., 2019). Bien entendu, on retrouve parmi cette large gamme d'hôtes de nombreuses cultures d'importance mondiale comme le riz, la tomate, les agrumes, la banane, le manioc, les choux ou encore le haricot (**Figure 2** ; Ryan *et al.*, 2011). Plusieurs espèces de *Xanthomonas* ont à ce titre été identifiées comme faisant partie du Top 10 des bactéries phytopathogènes d'importance scientifique et économique majeure (Mansfield et al., 2012). Parmi elles, *Xanthomonas campestris* est une espèce qui englobe toutes les *Xanthomonas* spécifiquement responsables de maladies sur les plantes de la famille des Brassicacées (Vicente and Holub, 2013). La famille botanique des Brassicacées (ou Crucifères) comprend plusieurs cultures d'intérêt agronomique comme le colza (*Brassica napus*), les choux (*Brassica oleracea*), les radis (*Raphanus sativus*), les navets (*Brassica rapa*) ou encore les moutardes (*Brassica juncea* et *Brassica nigra*). De son côté, l'espèce *X. campestris* est actuellement divisée en trois pathovars : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, l'agent responsable de la nervation noire des Brassicacées, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*, l'agent de la tache foliaire bactérienne des Brassicacées et *Xanthomonas campestris* pv. *incanae*, l'agent de la brûlure bactérienne des Brassicacées (Vicente and Holub, 2013; Roux et al., 2015).

Présente sur tous les continents, la nervation noire est considérée comme la maladie bactérienne des Brassicacées la plus dommageable à l'échelle mondiale avec des réductions de rendements de l'ordre de 10 à 50% (Bradbury, 1986; Singh et al., 2011; Vicente and Holub, 2013). La maladie doit son nom aux symptômes caractéristiques observables sur les feuilles infectées. Typiquement, des lésions chlorotiques et nécrotiques en forme de V émanent de la marge des feuilles et mettent en évidence la coloration foncée des veines nécrosées par le passage de la bactérie (**Figure 3** ; Vicente and Holub, 2013). Cependant, les symptômes et leur intensité dépendent de l'hôte, son âge et des conditions environnementales au moment de l'infection. Comme la plupart des maladies bactériennes, des conditions chaudes (entre 25°C et 30°C ici) et humides favorisent la multiplication de *Xcc* et accentuent la sévérité des symptômes. A l'heure actuelle, les souches pathogènes de *Xcc* sont réparties en 9 races. Cette classification en races, originellement proposée par Kamoun *et al.* (1992), se base sur les réactions de différentes espèces de Brassicacées à l'infection. Les déterminants de la répartition des souches dans chacune des races ne sont actuellement pas complètement élucidés, mais il est supposé que des combinaisons de résistances gène-pour-gène soient le

facteur prépondérant (Vicente and Holub, 2013). Aucun gène de résistance totale n'a pour l'instant été identifié pour lutter contre l'ensemble de ces races. L'espèce *Brassica oleracea* (qui inclut chou, chou-fleur, brocoli, chou de Bruxelles et kale) est celle qui est la plus fortement impactée par *Xcc* sur le plan économique. Plusieurs QTLs (Loci de caractères quantitatifs, *Quantitative Trait Loci* en anglais) porteurs de résistances partielles ont pu y être identifiés mais leur mise en place sur le plan agronomique s'est avérée peu satisfaisante (Vicente and Holub, 2013). A l'heure actuelle, la lutte génétique n'est donc pas considérée comme une méthode de contrôle viable contre la nervation noire sur ces cultivars.

1.2.2 Transmission par les graines et vie épiphyte

Comme beaucoup de *Xanthomonas*, *Xcc* est principalement transmis verticalement, c'est-à-dire par la graine, d'une plante infectée à sa descendance (An et al., 2019). Les données disponibles concernant l'infection de la graine par *Xcc* sont assez rares. On sait cependant que les bactéries sont capables d'infecter plusieurs tissus de la graine. En effet, le tégument de la graine est généralement porteur des bactéries, mais des études ont rapporté la présence de *Xcc* dans les parties internes, y compris au niveau de l'embryon. Au-delà des dégâts engendrés par la maladie, ce mode de transmission par la graine est la cause majeure des préoccupations de l'industrie semencière puisqu'il est essentiel de garantir la qualité sanitaire du matériel végétal lors de la commercialisation. Dans la mesure où dans des conditions favorables, trois graines infectées sur 10 000 peuvent être suffisantes pour déclencher une épidémie au champ, la réglementation impose que les lots de graines vendus présentent moins d'une graine infectée par *Xcc* sur 30 000 (Celetti, 2011). Des tests de contrôle qualité sont donc fréquemment réalisés par macération des graines et étalement sur un milieu de culture. Au vu du seuil de détection imposé et du caractère destructif du test, le volume de graines qui est consommé pour ces vérifications, et donc non utilisé comme semences, représente un poids financier non-négligeable. A titre indicatif, 1 ha de chou-fleur représente environ 10 000 plantes. Malheureusement, il existe très peu de méthodes de traitements des graines suffisamment performantes pour assurer l'élimination de *Xcc*. Si nécessaire, une stérilisation chimique par incubation dans un bain de javel ou un traitement thermique dans l'eau à 50°C pendant 15 à

30 min peuvent être réalisés (Celetti, 2011). Cependant, ces traitements abîment la graine et affectent généralement le taux de germination sans garantir l'éradication des pathogènes.

Les pratiques culturales peuvent également constituer un facteur aggravant de la contamination par les graines. Pour ce qui est du chou-fleur, les producteurs peuvent choisir de se procurer des graines qu'ils sèmeront eux-mêmes, ou choisir d'acheter des jeunes plants qu'ils transplanteront dans leur champ. Cette étape de production des plants peut alors être problématique. En effet, les plateaux de graines sont mis à germer à haute densité, sous serre, dans des conditions de chaleur et d'humidité importantes. En cas de contamination des graines, les conditions sont alors très propices au développement de la maladie. De plus, l'arrosage des plantules est généralement réalisé par aspersion. L'éclaboussement généré sur des feuilles contaminées favorise alors la propagation des bactéries de proche en proche dans la nurserie.

De la même manière, en plein champ, le vent et les éclaboussures dues à la pluie sont les principaux moteurs de l'amplification de l'épidémie (An et al., 2019). Les insectes, l'irrigation et les outils agricoles peuvent aussi contribuer à la dispersion de *Xcc*, mais leur impact reste plus limité (Wolf and Zouwen, 2010; Krauthausen et al., 2011; An et al., 2019). La capacité de *Xcc* à survivre en dehors de l'hôte est alors primordiale. Le mode de vie épiphyte adopté par *Xcc* est cependant considéré comme stressant, puisqu'il expose les bactéries aux rayonnements ultraviolets, à la dessiccation, à des carences en ressources nutritives et à la compétition avec d'autres microorganismes (An et al., 2019). Les études qui se sont intéressées à la durée de vie des *Xanthomonas* dans l'environnement ont montré qu'ils sont capables de se maintenir pendant une période allant de quelques semaines à près de deux ans (Kocks et al., 1998; Wolf and Zouwen, 2010). Dans la mesure où les résidus de cultures contaminés et les traces de pathogènes dans le sol peuvent constituer une source d'inoculum secondaire, il est recommandé de mettre en œuvre des rotations culturales avec un retour des Brassicacées tous les trois ans dans les régions contaminées (Celetti, 2011). Les Brassicacées sauvages en bordures de champs peuvent également constituer un réservoir qu'il est important de surveiller (Williams, 1980). Les études du microbiote associé aux plantes identifient régulièrement les *Xanthomonas* comme membre de la phyllosphère. Alors que leur présence au niveau de la rhizosphère est généralement peu abondante (< 1%), les organes aériens comme les fruits, les

fleurs et les feuilles accueillent des communautés dont la composition en *Xanthomonas* peut atteindre 40 %, même si leur fréquence reste très variable selon les hôtes, les saisons et la situation géographique (Vorholt, 2012; Ottesen et al., 2013; An et al., 2019). Au-delà de pouvoir survivre dans la phyllosphère, les *Xanthomonas*, dont *Xcc*, sont capables de se multiplier à la surface des feuilles en absorbant divers composés disponibles comme des sucres ou des acides organiques (Déjean et al., 2013). La colonisation de la surface foliaire par *Xcc* est donc une étape cruciale qui conditionne l'infection avant même l'entrée dans la plante hôte et l'amorçage de la phase endophyte pathogène.

1.2.3 Entrée dans les feuilles par les pores de l'hydathode

De nombreux microorganismes pathogènes infectent leur hôte par les feuilles. La présence d'un épiderme et d'une cuticule constitue une première barrière physique qui protège les plantes des stress biotiques et abiotiques. Cependant, certains organismes filamenteux comme les champignons ou les oomycètes peuvent forcer l'entrée dans les feuilles par action mécanique localisée et sécrétion d'un cocktail d'enzymes de dégradation (Faulkner and Robatzek, 2012). Pour d'autres pathogènes, et notamment les bactéries, les blessures représentent un mode d'accès opportun, mais l'entrée naturelle à l'intérieur de l'organe foliaire se fait généralement par des pores présents en surface. Deux types de pores existent au niveau de la feuille : les stomates et les hydathodes. Les stomates sont répartis sur les faces inférieures et supérieures de la feuille. Ils contrôlent les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère, permettant notamment l'absorption du dioxyde de carbone (CO₂) nécessaire à la photosynthèse et le relargage de dioxygène (O₂). Ils sont également le lieu de l'évapotranspiration chez les plantes, processus qui permet, par évaporation de l'eau foliaire, de mettre en dépression le système vasculaire du xylème et ainsi de maintenir un flux de sève brute (porteuse de minéraux et nutriments) des racines vers les feuilles. Les stomates se composent de deux cellules de garde qui assurent l'ouverture et la fermeture des pores par modulation de leur turgescence. La chambre sous-stomatique, localisée directement sous le pore, constitue un espace gazeux qui fournit une interface entre l'apoplasme liquide et l'environnement atmosphérique extérieur.

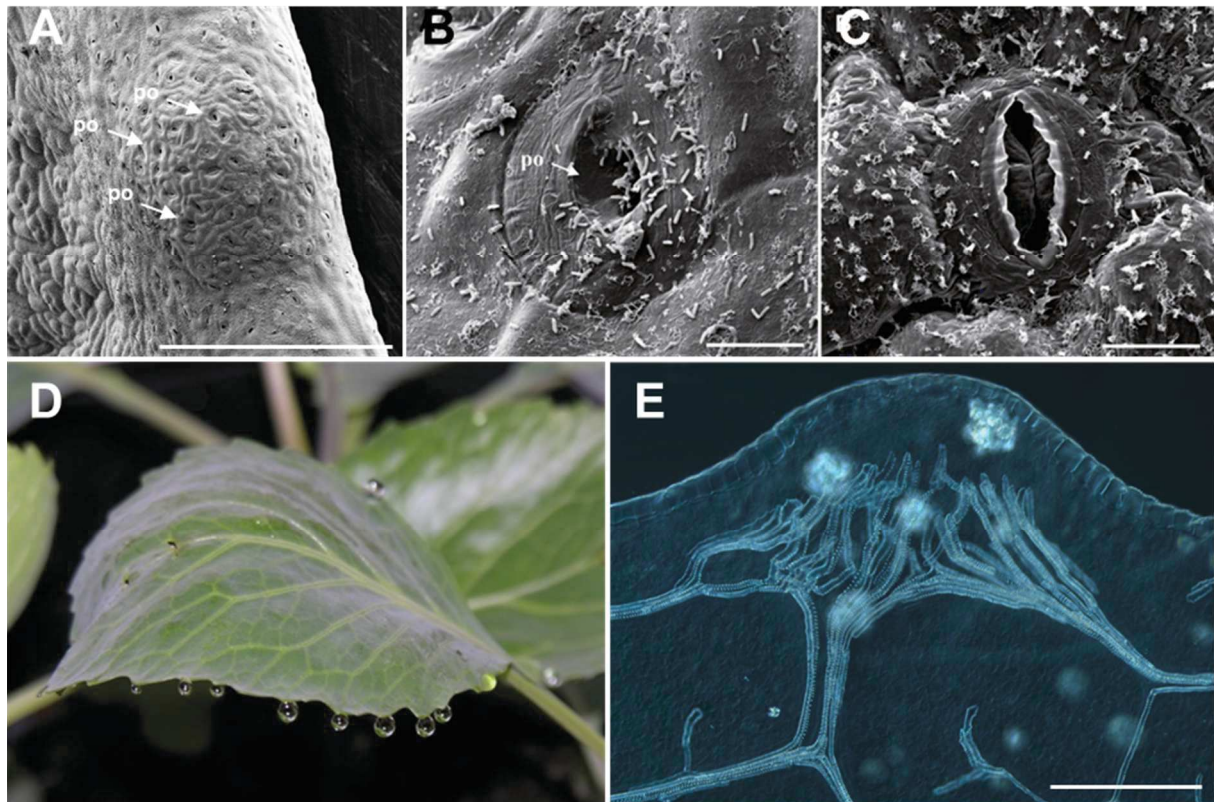


Figure 4 | Structure anatomique et fonction de guttation des hydathodes chez le chou. **A)** Hydathodes de chou-fleur vus en microscopie électronique (barre d'échelle = 500 μm). Surface **B)** d'un pore de l'hydathodes et **C)** d'un stomate de chou-fleur après inoculation par trempage transitoire dans une suspension de *Xcc* (barre d'échelle = 10 μm). La structure externe a l'air similaire avec un pore et deux cellules de garde. Noter l'abondance de bactéries au niveau du pore de l'hydathode mais absentes du stomate. **D)** Photo d'une feuille de chou-fleur présentant des gouttelettes de guttation au niveau des hydathodes (Photo : Alice Boulanger, LIPM). **E)** Observation en Normarsky d'un hydathode clarifié. Noter les ramifications et l'abondance de terminaisons des vaisseaux du xylème dans l'hydathode (barre d'échelle = 200 μm). po : pore de l'hydathode. Les images A), B), C) et E) sont issues de Cerutti et al., 2017.

Les pores de l'hydathode sont structurellement proches des stomates (**Figure 4**). Ils présentent également deux cellules de gardes qui contrôlent l'ouverture et donc l'accès à une chambre sous-jacente. Cependant, contrairement aux stomates, les pores de l'hydathode sont aqueux et non gazeux. En effet, l'hydathode est l'organe foliaire responsable de la guttation. Dans des conditions où l'évapo-transpiration est faible ou impossible du fait de la fermeture des stomates, comme la nuit ou lorsque l'humidité atmosphérique est élevée, la guttation permet de maintenir les flux de sève brute dans la plante. La pression racinaire qui participe habituellement au maintien du flux d'eau et de nutriments vers les feuilles conduit à une mise en surpression de la feuille qui ne peut pas évacuer l'excédent d'eau. L'ouverture des pores de l'hydathode permet donc de relâcher la pression. Du fait de la position des hydathodes en bordure de feuilles, la guttation se traduit par l'apparition de gouttelettes visibles à l'œil nu sur la tranche ou à la pointe de la feuille (**Figure 4**). Les fluides de guttation qui composent ces gouttelettes sont donc dérivés de la sève brute acheminée par le xylème (Cerutti et al., 2019). Chez les Brassicacées, la structure de l'hydathode est telle que l'arrivée des vaisseaux du xylème forme une arborescence qui se répartit au sein d'un tissu caractéristique : l'épithème (**Figure 4**). L'épithème est un tissu parenchymateux composé de petites cellules aux parois fines, lâchement connectées entre elles, qui semble adapté au flux de liquide vers les pores. De nombreuses études font état d'une forte activité métabolique chez les cellules de l'épithème visible notamment par une forte expression des gènes codant des transporteurs de phosphate, de nitrate, de sulfate, de potassium, de sucres et d'acides aminés (Cerutti et al., 2019). La comparaison des métabolites présents dans la sève de xylème et dans les fluides de guttation a montré une déplétion de nombreux composants dans les fluides de guttation, suggérant ainsi une activité de filtration par l'épithème qui pourrait permettre à la plante de limiter les pertes de nutriments lors de la guttation (Cerutti et al., 2019).

Le faible nombre de pathogènes capables d'entrer par ces pores est surprenant et suggère que les microorganismes sont incapables de rentrer dans les hydathodes et/ou incapables d'y survivre et de s'y multiplier. Contrairement aux stomates qui peuvent se fermer rapidement en présence d'un pathogène, Cerutti *et al.* (2017) ont montré que les pores de l'hydathode ne peuvent pas entièrement se fermer. Ils ont en effet observé une fermeture partielle des pores en réaction à la présence de *Xcc*, mais l'ouverture résiduelle reste suffisante

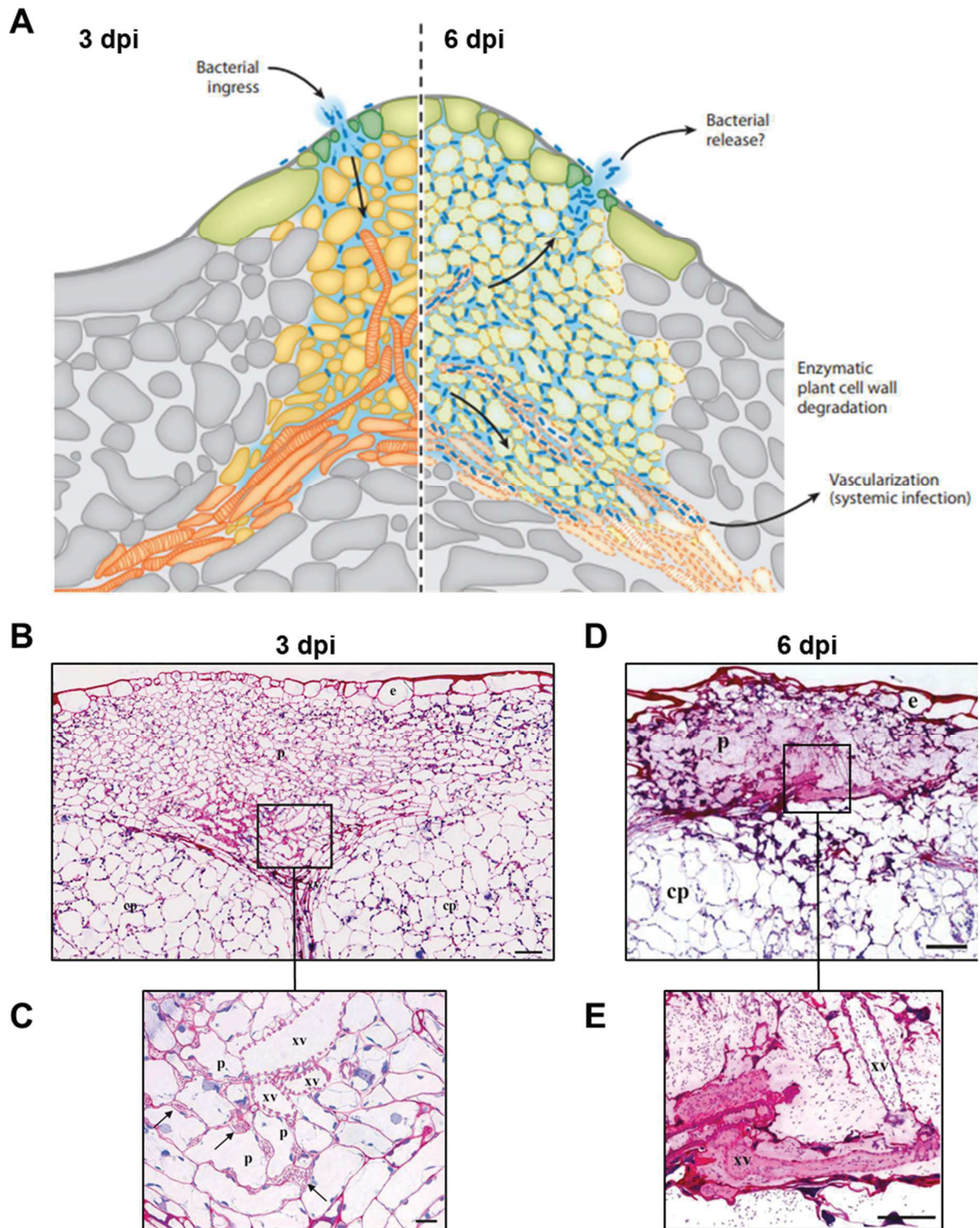


Figure 5 | *Xcc* développe un comportement biotrophe puis nécrotrophe dans les hydathodes. **A)** Représentation schématisée d'un hydathode infecté à 3 et 6 jours post-inoculation par *Xcc*. L'épiderme est en vert clair, les pores sont en vert foncé, l'épithème est en jaune, les vaisseaux du xylème sont en orange et les bactéries sont en bleu (adapté de Cerutti et al., 2019). **B)** Vue d'ensemble d'un hydathode de chou-fleur 3 jours après inoculation : les bactéries occupent les espaces intercellulaires mais les tissus ne semblent pas endommagés (barre d'échelle = 50 μ m). **C)** Grossissement de la zone encadrée en B) (barre d'échelle = 10 μ m). **D)** Vue d'ensemble d'un hydathode de chou-fleur 6 jours après inoculation montrant des tissus complètement dégradés (barre d'échelle = 50 μ m). **E)** Grossissement de la zone encadrée en D) (barre d'échelle = 20 μ m). p : parenchyme ; cp : parenchyme cortical ; xv : vaisseaux du xylème ; e : épiderme (Cerutti et al., 2017).

pour permettre l'entrée des bactéries. Il n'y a donc pas de barrière physique témoignant d'une immunité pré-invasive au niveau des hydathodes. Au cours de cette étude, les auteurs ont cependant pu montrer que les hydathodes déclenchent une réponse immunitaire post-invasive à l'encontre des bactéries. Ces réactions de défense peuvent limiter la multiplication de l'agent pathogène mais *Xcc* possède de son côté les armes nécessaires pour les réprimer et assurer l'infection. Les données expérimentales disponibles chez le chou-fleur en conditions de laboratoire indiquent que *Xcc* reste confiné dans les hydathodes et s'y multiplie pendant 6 jours. De façon intéressante, *Xcc* développe un comportement biotrophe au cours des premiers jours de l'infection : les bactéries occupent les espaces intercellulaires de l'épithème mais les cellules de l'hôte ne montrent aucun signe de dégradation (**Figure 5**). La stratégie de *Xcc* change lorsque la population atteint une forte densité pour adopter un comportement de pathogène nécrotrophe. Après 6 jours d'infection, les hydathodes nécrosent et présentent une coloration brune visible à l'œil nu témoignant de la destruction complète des tissus (**Figure 5**; Cerutti *et al.*, 2017).

1.2.4 Propagation systémique par le réseau du xylème

Après avoir colonisé puis dégradé l'hydathode, *Xcc* exploite la structure anatomique de la feuille pour rejoindre le xylème. En effet, la base de l'épithème est abondamment irriguée par des terminaisons de vaisseaux du xylème (**Figure 5**). Cette proximité entre pores de l'hydathode et réseau vasculaire permet à *Xcc*, après dégradation de la paroi des vaisseaux, d'accéder à un nouvel environnement au sein de la plante. Le xylème est l'organe responsable de l'acheminement de la sève brute des racines vers les parties aériennes photosynthétiques de la plante (Brodersen *et al.*, 2019). Il est constitué de cellules mortes dont les parois rigidifiées par le dépôt de lignine assurent le soutien mécanique. Ces faisceaux forment ainsi de véritables conduits biologiques, adaptés au flux de sève, mais constituant également un chemin privilégié pour la propagation de *Xcc*. La vascularisation est l'un des traits caractéristiques de *Xcc* et lui permet de rapidement se propager dans la feuille puis dans la tige et ainsi développer une infection systémique. Historiquement, le xylème était considéré comme un environnement pauvre en nutriment, très dilué, dans lequel se trouvait uniquement des ions minéraux et

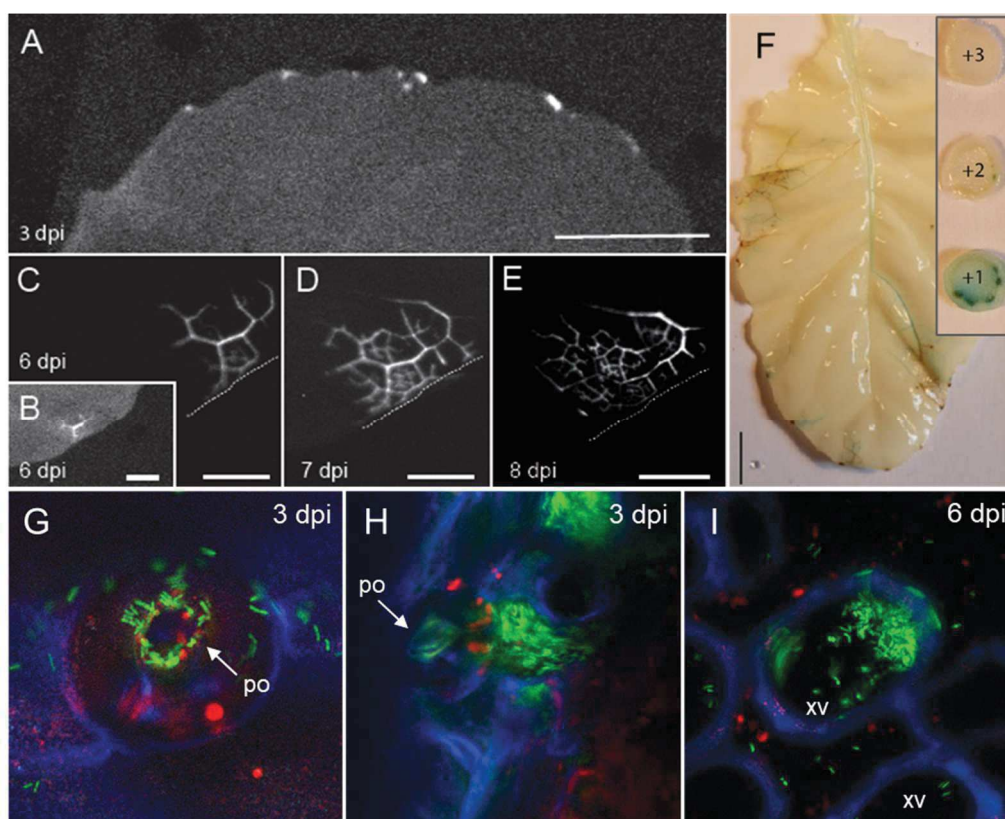


Figure 6 | *Xcc* colonise abondamment les vaisseaux du xylème conduisant à une infection systémique. Dynamique de l'infection d'une feuille de chou-fleur par la souche *Xcc* LMG568::*lux* suivi par bioluminescence : **A)** *Xcc* est confiné dans les hydathodes à 3 jours post-inoculation (dpi) puis se propage progressivement dans le réseau du xylème à 6 dpi (**B & C**), 7 dpi (**D**) et 8 dpi (**E**). **F)** *Xcc* se déplace dans les vaisseaux et est retrouvé dans la tige au niveau de l'inter-nœud au-dessus de la feuille inoculée (+1) ainsi que dans les vaisseaux et les hydathodes de la feuille du nœud +1. Inoculation réalisée avec la souche *Xcc* 8004::*GUS*-GFP visible en bleu dans les tissus grâce à la coloration *GUS*. Par microscopie confocale, on localise *Xcc* **G)** en surface des hydathodes et **H)** sous les pores à 3dpi et **I)** dans les vaisseaux du xylème de la feuille à 6 dpi. po : pore de l'hydathode ; xv : vaisseaux du xylème. Toutes les images sont issues de Cerutti et al., 2017.

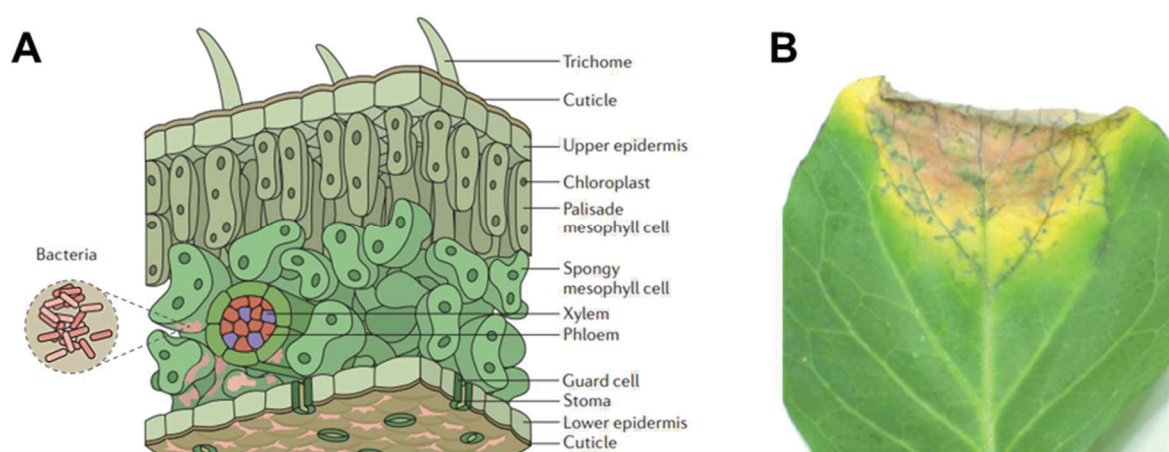


Figure 7 | *Xcc* infecte le mésophylle foliaire. A) Schéma représentatif d'une coupe transversale de feuille. Le mésophylle correspond à la zone centrale contenue entre l'épiderme supérieur et l'épiderme inférieur, c'est-à-dire à la fois le parenchyme palissadique et le parenchyme lacuneux (adapté de Vorholt, 2012). **B)** Symptômes typiques de la nervation noire des brassicacées causée par *Xcc* : chlorose et nécrose en forme de V émanant de la marge de la feuille. Des points de nécrose sont visibles le long des nervures là où *Xcc* ressort des vaisseaux et colonise le mésophylle du chou (Mansfield et al., 2012).

quelques acides aminés. On sait maintenant que la sève brute, bien que diluée, possède une composition complexe. On y retrouve en effet, en plus des acides aminés et ions minéraux, des acides organiques et parfois même des sucres simples. Chez le chou, des acides organiques comme le citrate et le succinate sont ainsi présents et accessibles pour la nutrition des pathogènes vasculaires comme *Xcc* (Dugé de Bernonville et al., 2014). Il est également important de noter que la sève est en flux constant dans le xylème, ce qui maintient l'approvisionnement et le renouvellement des ressources dans ce milieu. Dans ce contexte, il n'est donc pas étonnant d'observer des densités très élevées de populations bactériennes qui peuvent même parfois aboutir à une obstruction des vaisseaux (**Figure 6**). De manière similaire aux hydathodes, l'infection des vaisseaux du xylème par *Xcc* finit par se traduire par une nécrose des tissus environnants. Le noircissement des veines qui en découle est l'un des symptômes emblématiques d'une infection par *Xcc* et est à l'origine du nom à la maladie qu'il engendre : la nervation noire des Brassicacées (**Figure 7**).

Chez *Xcc*, la vascularisation est aussi importante pour la dissémination du pathogène dans l'environnement. En effet, la propagation systémique de l'infection donne accès aux organes floraux et donc aux graines qui représentent le mode de transmission privilégié par *Xcc*. De plus, *Xcc* est capable de rejoindre les hydathodes des feuilles supérieures au point d'entrée initial et de s'y multiplier (**Figure 6** ; Cerutti *et al.*, 2017). Il est ainsi envisagé que la guttation au niveau des hydathodes infectés puisse permettre la dissémination de proche en proche d'une feuille infectée à une autre ou d'une plante infectée à une autre. Ce type d'infection secondaire pourrait alors aggraver la dynamique épidémiologique au cours de la saison culturale.

1.2.5 Colonisation locale et distante du mésophylle

Lors de la dégradation de l'hydathode, une partie des bactéries n'accède pas aux vaisseaux du xylème mais se propage dans les tissus foliaires environnants. *Xcc* colonise alors abondamment le mésophylle de son hôte. Ce tissu, constitué du parenchyme palissadique et du parenchyme lacuneux, est essentiel pour la plante puisqu'il est le lieu de la photosynthèse (**Figure 7**). Contrairement aux hydathodes ou au xylème, le mésophylle est considéré comme

un environnement riche pour les bactéries phytopathogènes qui s'y multiplient très rapidement. L'apparition des symptômes sur les plantes infectées est généralement corrélée à l'arrivée de *Xcc* dans le mésophylle. Classiquement, on observe d'abord une chlorose d'un jaune vif qui se transforme rapidement en une nécrose foncée. La progression en parallèle de *Xcc* dans les veines, des hydathodes vers le pétiole, et dans le mésophylle aboutit aux symptômes caractéristiques en forme de V émanant de la marge des feuilles. Cela dit, l'infection du mésophylle se produit également lorsque les bactéries vasculaires s'échappent du xylème, formant ainsi des foyers secondaires distants du point d'inoculum primaire. A terme, les tissus sont intégralement décomposés par le passage de *Xcc* et présentent un aspect de pourriture noire, autre nom donné à cette maladie (*black rot disease* ; **Figure 3**).

1.2.6 *Xcc* : un bon modèle pour la recherche scientifique

Au-delà de son importance agronomique, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est actuellement l'un des phytopathogènes bactériens modèles pour la recherche scientifique. Ce succès est dû à plusieurs facteurs : c'est en premier lieu une bactérie facilement cultivable, à croissance rapide et manipulable par les techniques de génie génétique. *Xcc* présente également l'avantage d'être naturellement pathogène d'*Arabidopsis thaliana* (l'arabette des dames), une Brassicacée mondialement utilisée comme plante modèle en biologie végétale, ce qui a très tôt facilité son adoption au sein de la communauté des interactions plante-pathogène. Dans la mesure où à la fois *Xcc* et *A. thaliana* sont des modèles depuis plusieurs dizaines d'années, beaucoup de ressources et de données expérimentales sont désormais disponibles et fournissent une base solide pour développer des recherches innovantes. En termes de questions biologiques, *Xcc* est également intéressant puisqu'il infecte une gamme d'hôte assez variée et colonise plusieurs compartiments au sein de la plante pendant son cycle infectieux. Il permet donc d'adresser des questions sur les bases génétiques de la spécificité d'hôte et sur les déterminants moléculaires de l'adaptation à son environnement (Ryan et al., 2011; Jacques et al., 2016; An et al., 2019). Dans la mesure où le genre *Xanthomonas* regroupe une grande diversité de bactéries associées aux plantes, et notamment plusieurs pathogènes d'importance mondiale, *Xcc* est aussi un modèle pertinent pour les études phylogénétiques qui s'intéressent à la co-évolution des systèmes hôtes-microorganismes.

1.2.7 « Fun fact » : *Xcc* vous en voulez ? Vous en mangez !

Au-delà de l'intérêt porté à *Xcc* sur le plan scientifique et agronomique, il est intéressant de noter que l'industrie agro-alimentaire exploite les propriétés de ce microorganisme. En effet, *Xcc* est aujourd'hui un outil bio-industriel qui sert à la production d'un polymère aux propriétés intéressantes : la gomme de xanthane. Cet exopolysaccharide produit naturellement par *Xcc* possède des capacités épaississantes et gélifiantes utiles dans la formulation de nombreux produits agro-alimentaires, et ce d'autant plus qu'il est stable dans une large gamme de température et de pH. Sans danger pour la santé, cet additif alimentaire connu sous le code E415, entre notamment dans la composition de sauces, desserts, produits laitiers, crèmes glacées ou encore des préparations sans gluten.

En réalité, le xanthane possède des applications diverses et variées : il peut être utilisé dans la formulation de dentifrices, shampoing et produits cosmétiques par exemple, ou comme additif dans les fluides de forage employés sur les plateformes pétrolières. Toutes applications confondues, la production de xanthane pèse près de 90 000 tonnes et 400 millions de dollars par an dans le monde (dont 65 % pour l'agro-alimentaire et 15% pour l'industrie pétrolière ; Petri, 2015 ; Lopes *et al.*, 2015). *Xcc* est donc bien une bactérie d'intérêt agronomique, scientifique, économique et industriel.

1.3 Les mécanismes de réponses adaptatives de *Xcc* à son environnement

Dans un environnement changeant, pour les bactéries comme pour les autres organismes, l'adaptation est souvent la clé de la survie. Du fait de son cycle de vie, *Xcc* doit alterner entre vie épiphyte, vie endophyte et vie libre, indépendante de l'hôte. Au cours de chacune de ces phases, *Xcc* doit percevoir son environnement et réagir en déclenchant les réponses adaptatives nécessaires. Ce comportement se traduit à l'échelle cellulaire par l'utilisation d'une variété d'outils moléculaires.

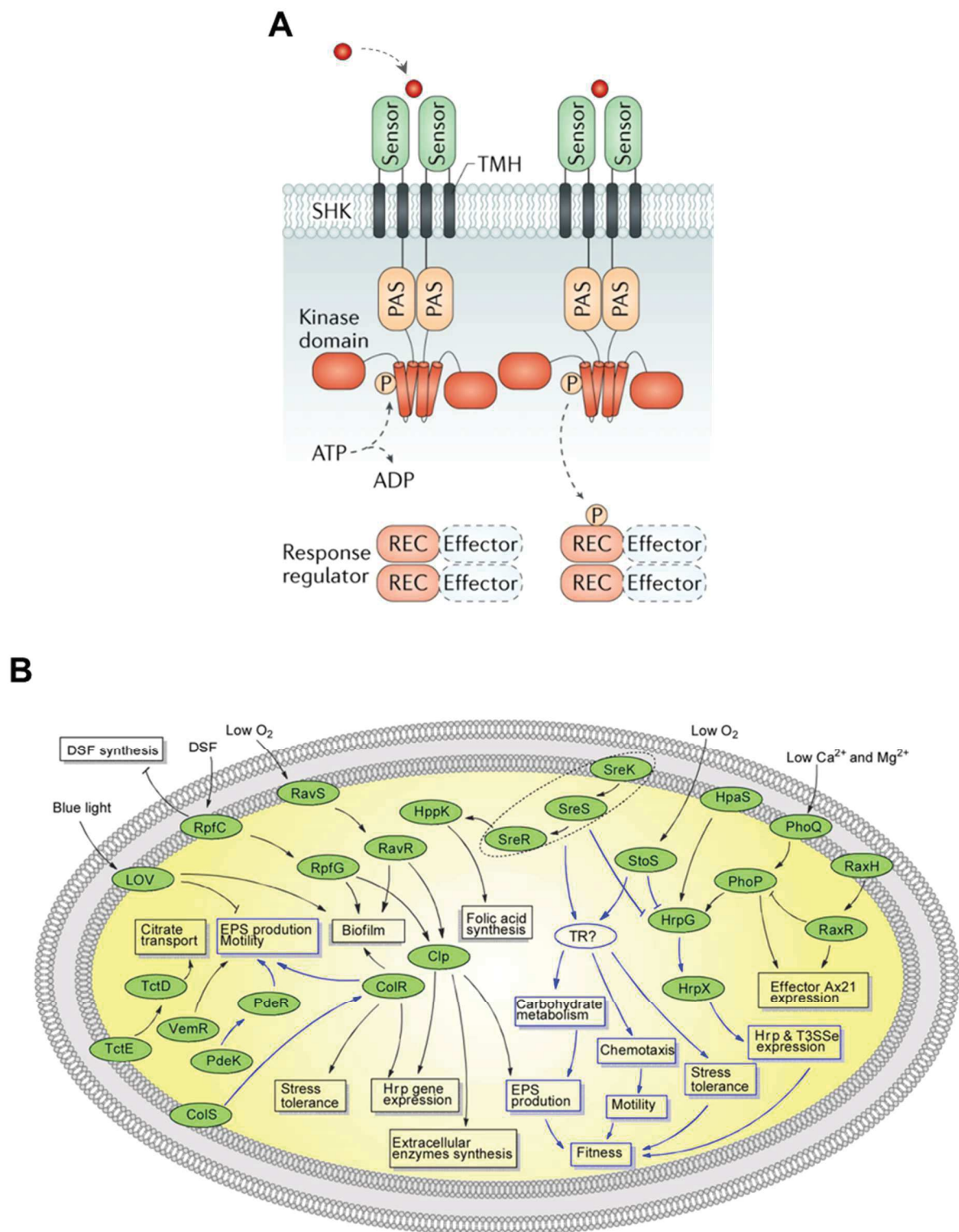


Figure 8 | Les systèmes à deux composants perçoivent l'environnement et assurent la transduction du signal. A) Schéma fonctionnel d'un système à deux-composants (TCS) typique. Lors de la fixation du substrat sur le domaine de ligand extracellulaire du capteur, le domaine kinase intracellulaire s'autophosphoryle sur un résidu histidine en hydrolysant l'ATP. L'activation du capteur histidine kinase entraîne le transfert du groupe phosphoryl sur le régulateur de réponse qui s'active à son tour (adapté de Jacob-Dubuisson et al., 2018). **B)** Modèle de régulation de la physiologie bactérienne par les TCS connus et caractérisés chez les *Xanthomonas* (Pandey et al., 2016).

1.3.1 Perception de l'environnement par les systèmes à deux composants

La première étape essentielle à l'adaptation à l'environnement est la perception des signaux extérieurs. Les systèmes à deux composants (TCS), constitués d'un senseur histidine kinase et d'un régulateur de réponse, représentent le mécanisme principal de perception de l'environnement chez les procaryotes. Classiquement, la détection d'un stimulus par le senseur histidine kinase transmembranaire entraîne, par autophosphorylation puis transfert du groupe phosphoryl sur le régulateur de réponse associé, la transduction du message au niveau intracellulaire. L'activation du régulateur de réponse cytoplasmique se traduit alors par la modulation de l'expression des gènes ou des processus physiologiques sous son contrôle (**Figure 8** ; Francis and Porter, 2019; Qian, Han and He, 2008).

Chez *Xcc*, l'exploration du génome a mis en évidence la présence de plus de 50 TCS (Qian et al., 2008b). Des études de caractérisation fonctionnelle approfondies ont permis d'élucider le rôle biologique de plusieurs d'entre eux (**Figure 8** ; Pandey *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). On retrouve ainsi le couple RpfC/RpfG responsable de la communication cellule à cellule (voir 1.3.6 ; Slater *et al.*, 2000), le couple RavS/RavR senseur de la concentration en oxygène (He et al., 2009; Cheng et al., 2019) ou encore le couple PcrK/PcrR capable de détecter la présence d'hormones végétales, les cytokinines (Wang et al., 2017). Il existe cependant des régulateurs de réponses prédits comme membres d'un TCS qui ne sont affiliés à aucun senseur connu mais dont on connaît le rôle biologique comme XibR (aussi connu sous le nom XerR ou XmbR) qui contrôle la réponse à la biodisponibilité en fer (Wang et al., 2011; Yaryura et al., 2015; Pandey et al., 2016). La délétion de chacun de ces TCS aboutit à une réduction significative de la virulence de *Xcc*, montrant bien l'importance de ces systèmes pour l'adaptation à l'environnement, en particulier au cours de l'infection. Malheureusement, la complexité des réseaux de régulation intracellulaire rend l'étude de la contribution de chacun de ces TCS assez ardue. Cela dit, il est clair qu'ensembles les TCS garantissent l'intégration d'une multitude de signaux et assurent une régulation fine des réponses physiologiques de la cellule bactérienne.

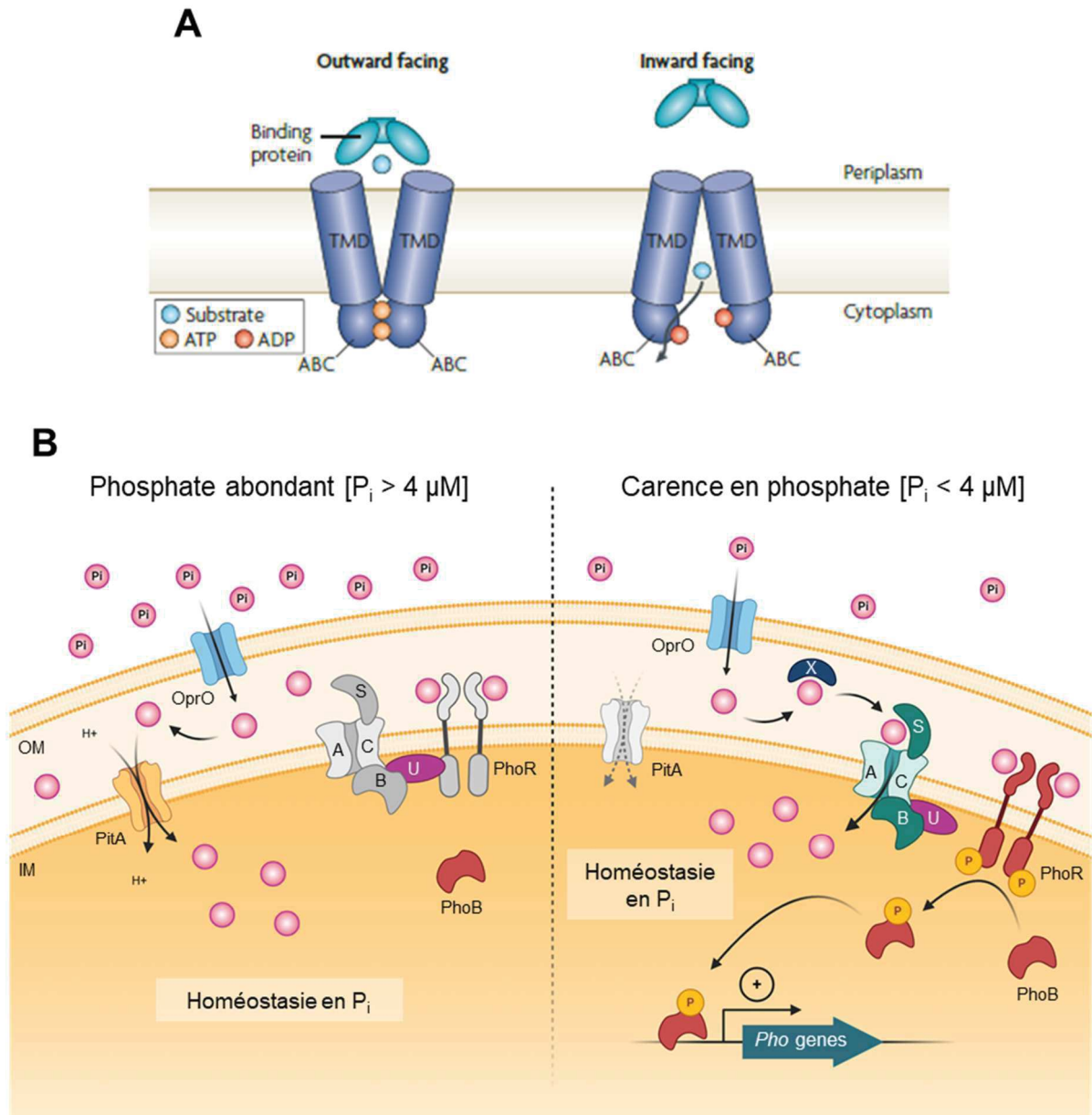


Figure 9 | Les transporteurs actifs assurent l'import de nutriments dans la cellule. A) Modèle dynamique d'un transporteur ABC. Le substrat est pris en charge par la protéine de liaison au niveau périplasmique et acheminé au niveau des deux domaines transmembranaires. L'hydrolyse de l'ATP au niveau des sous-unités ABC fournit l'énergie pour changer la conformation du complexe et permet le relargage cytoplasmique du substrat (Rees et al., 2009). **B)** Modèle du système d'import du phosphate et de sa régulation chez *Xanthomonas*. Le phosphate inorganique (P_i) est importé dans le périplasme grâce à la porine OprO. Lorsque le phosphate est abondant ($[P_i] > 4 \mu M$), l'absorption du phosphate est assurée par le transporteur basse affinité PitA. Dans ces conditions, les système haute-affinité PstSCAB n'est pas nécessaire : la transduction du signal par le TCS PhoBR est bloquée par l'interaction directe entre PhoU et le senseur PhoR qui empêche l'autophosphorylation par le domaine histidine kinase. En situation de carence en phosphate ($[P_i] < 4 \mu M$), l'acquisition du phosphate par PitA n'est plus suffisante et le système PstSCAB prend le relais. La protéine PhoX prend en charge le phosphate inorganique périplasmique et l'achemine jusqu'au transporteur ABC formé par le système Pst. Dans cette situation, PhoR est libérée et assure le phospho-relais auprès du régulateur de réponse PhoB qui agit comme facteur de transcription en activant directement l'expression des gènes sous son contrôle, dont l'opéron *pstSCAB*. La dualité des systèmes d'import Pit / Pst permet aux bactéries de s'adapter aux concentrations du milieu environnant et de maintenir l'homéostasie du phosphate au niveau intracellulaire. OM : membrane externe ; IM : Membrane interne ; P_i : phosphate inorganique ; X : PhoX ; U : PhoU ; A : PstA ; B : PstB ; C : PstC ; S : PstS.

1.3.2 Acquisition de nutriments par les transporteurs

Au-delà des TCS qui gèrent les flux d'informations de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur, plusieurs familles de transporteurs assurent l'import de nutriments au bénéfice de la bactérie. Le nombre et la diversité des transporteurs chez les bactéries est d'ailleurs considéré comme un bon indicateur de leur niche écologique (Blanvillain et al., 2007). Parmi ces transporteurs, on retrouve par exemple les porines, des complexes protéiques permettant, par formation d'un canal transmembranaire, l'import passif mais sélectif de diverses molécules hydrophiles de petite taille (Vergalli et al., 2020). Par opposition à cette diffusion passive des solutés, plusieurs familles de transporteurs actifs haute-affinité assurent l'absorption dans la cellule de composés environnants contre leur gradient de concentration. On trouve ainsi par exemple des systèmes ABC (*ATP-Binding Cassette*) qui exploitent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour importer des substrats pouvant être de tailles très variées, mais toujours de façon ligand-dépendante (Rees et al., 2009). De manière assez intéressante, dans certains cas comme pour l'acquisition du phosphate, les bactéries combinent transport passif et transport actif : le passage à travers la membrane externe par diffusion simple est assuré par une porine puis l'absorption du périplasme vers le cytoplasme est effectuée par un système ABC (**Figure 9**). Cependant, dans le cas du phosphate, on observe également une alternance entre porine (système *pit*) et transporteur ABC (système *pst*) pour la seconde étape selon la concentration en phosphate dans le milieu : en condition non-limitante ($P_i > 4 \mu M$), l'import par la porine PitA est suffisant pour satisfaire les besoins physiologiques de la cellule, mais il devient inefficace en situation de carence ($P_i < 4 \mu M$) où la présence du transporteur haute-affinité PstSCAB devient nécessaire (**Figure 9**; Lamarche *et al.*, 2008; Hsieh and Wanner, 2010; Pegos *et al.*, 2014).

Par ailleurs, chez *Xcc*, une large gamme de plus de 70 Transporteurs TonB-Dépendants (TBDT) assurent l'acquisition de substrats comme les complexes fer-sidérophore, des vitamines ou encore des sucres simples et complexes comme le saccharose, le xylane ou le *N*-Acétylglucosamine (**Figure 9**; Blanvillain *et al.*, 2007; Déjean *et al.*, 2013; Boulanger *et al.*, 2014). De manière similaire aux TCS, l'inactivation des gènes codant ces TBDT peut conduire

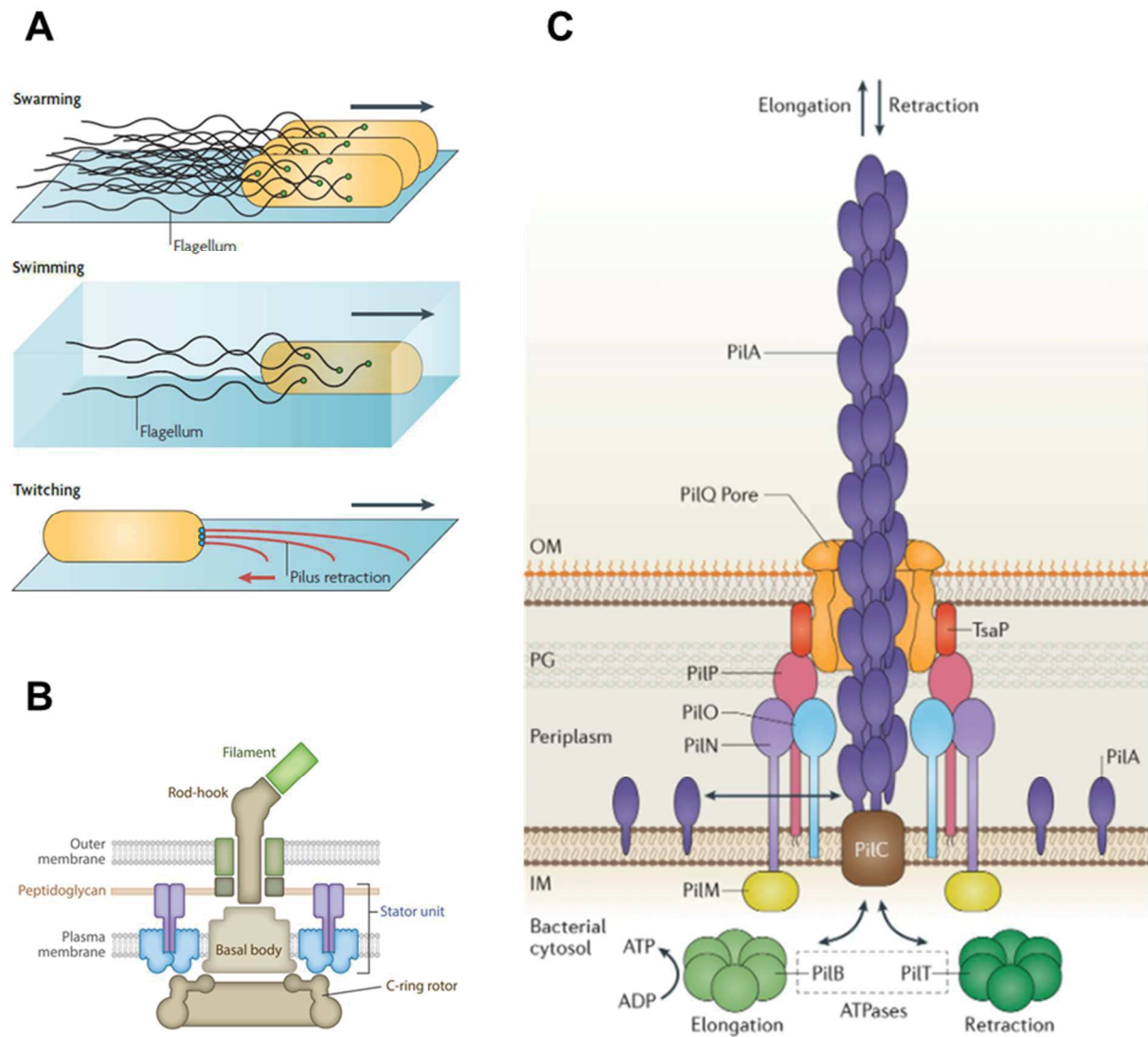


Figure 10 | Le flagelle et le pilus de Type IV assurent la mobilité bactérienne. A) Les bactéries se déplacent par mobilité flagellaire sur les surfaces (swarming) et en milieu liquide (swimming) ou par l'intermédiaire du pilus de type IV (twitching). Adapté de Kearns et al., 2010. **B)** Structure moléculaire de la machinerie flagellaire. Le corps basal et le stator sont implantés dans la membrane interne et stabilisent le rotor cytoplasmique pour mettre en rotation l'appendice. Le filament (tronqué ici) est une structure filamentaire en hélice qui sert de propulseur à la cellule (Subramanian et al., 2019). **C)** Structure moléculaire du pilus de type IV. L'élongation du pilus est assurée par PilB qui incorpore les pilines via l'hydrolyse de l'ATP et PilT assure la rétraction par dépolymérisation. (Hospenthal et al., 2017).

à un défaut de croissance et de pouvoir pathogène lors de l'infection et met donc en évidence leur importance pour la fitness de *Xcc*. De plus, il est intéressant de noter que la perception des substrats, leur absorption et la régulation du métabolisme associé sont généralement étroitement liées, facilitant ainsi la mise en place d'une réponse adaptative rapide et ciblée.

1.3.3 Orientation par le chimiotactisme et la mobilité

Plusieurs mécanismes permettent aux bactéries de se déplacer. Le pilus de type IV assure une mobilité sur les surfaces, appelée *twitching*. Les bactéries rampent alors grâce à la mise en place successive d'une élongation du pilus par polymérisation de pilines, de l'attachement à la surface par la pointe du pilus puis de la rétraction du pilus par dépolymérisation (**Figure 10** ; Kearns, 2010). De son côté, le flagelle assure une mobilité par propulsion qui s'apparente à de la nage en milieu liquide (mobilité par *swimming*) ou en surface (mobilité par *swarming*). Le flagelle est un complexe protéique transmembranaire qui s'actionne par mise en mouvement d'un long appendice flexible sous l'action d'un rotor motorisé (**Figure 10** ; Subramanian and Kearns, 2019). Il permet aux bactéries de se déplacer selon des gradients de concentrations de substrats présents dans l'environnement, aussi bien pour accéder à un milieu plus riche en nutriments que pour fuir des composés toxiques. Ce phénomène appelé chimiotactisme se base sur une reconnaissance des substrats par des récepteurs MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*) qui transmettent l'information par un phospho-relais proche de celui des TCS. La transduction du signal auprès du flagelle permet ensuite d'assurer l'orientation et le déplacement.

Certains *Xanthomonas*, mais pas tous, sont capables d'effectuer la mobilité flagellaire (Indiana, 2014). L'hypothèse généralement avancée concernant le rôle biologique de la mobilité est qu'elle serait nécessaire pour trouver un hôte et y entrer. Bien que validée chez d'autres bactéries phytopathogènes comme *Ralstonia solanacearum*, très peu de preuves sont disponibles pour valider cette hypothèse chez les différents *Xanthomonas* (Tans-Kersten et al., 2001; Moreira et al., 2015; An et al., 2019). Cela dit, chez le pathogène du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, il a été démontré que le récepteur Mcp2 peut percevoir certains composés dérivés de la sève de xylème et contribue à l'entrée dans l'hydathode (Verma et al., 2018). On

pourrait ainsi envisager qu'un mécanisme similaire soit présent chez *Xcc*, même si aucune étude ne l'a pour l'instant démontré. Le seul élément de réponse actuellement disponible chez *Xcc* est la présence d'un MCP appelé Hsb1 (*Host Specificity in Brassicas 1*), codé par le gène *XCC0324* dans la souche ATCC33913, dont un allèle spécifique de l'espèce *Xanthomonas campestris* permet de détecter des composés végétaux (L-phenylalanine et sinigrine) et semble améliorer l'entrée par les blessures chez les brassicacées (Indiana, 2014).

1.3.4 Installation par formation de biofilms

Comme on l'a vu précédemment, les différentes phases du cycle de vie de *Xcc* conduisent à la colonisation de plusieurs environnements, aussi bien sur la plante que dans la plante. L'adhésion des bactéries aux tissus de l'hôte est alors cruciale pour l'initiation de l'infection. L'attachement se produit en premier lieu grâce à des protéines ancrées dans la membrane externe, les adhésines, qui reconnaissent et se lient à des récepteurs de surface chez l'hôte (glycolipides, protéoglycanes). L'importance des adhésines dans le pouvoir pathogène de *Xcc* n'a que très peu été étudié, mais il a été démontré chez d'autres *Xanthomonas* que les adhésines fimbriae (complexes protéiques filamenteux comme le pilus de type IV) et non-fimbriae (auto-transporteur) jouent un rôle dans la virulence bactérienne (Gottig et al., 2009; Büttner and Bonas, 2010). Suite à cette sédentarisation, les bactéries se multiplient et se structurent en biofilm. Le biofilm est un agglomérat de bactéries associées à une surface et implantées dans une matrice extracellulaire protectrice. Cette matrice extracellulaire est principalement composée d'exopolysaccharides (EPS) sécrétés par les bactéries, mais on trouve également de l'ADN extracellulaire, des protéines et des lipides (Castiblanco and Sundin, 2016). Dans le cas de *Xcc*, cet EPS est le xanthane. Synthétisé par les gènes *gum*, le xanthane est composé d'un squelette de β -1,4-D-glucose sur lequel sont branchés des chaînes latérales de tri-saccharides d'acide glucuronique et de mannose (Chou et al., 1997; Katzen et al., 1998; Qian et al., 2005). Connus comme facteurs de virulence majeur, les EPS fournissent un environnement protecteur aux bactéries (i) en limitant la dessiccation et obstruant les rayonnements UV mutagènes au cours de la phase épiphyte et (ii) en bloquant la diffusion de composés antibactériens comme les espèces réactives de l'oxygène et les antibiotiques libérés

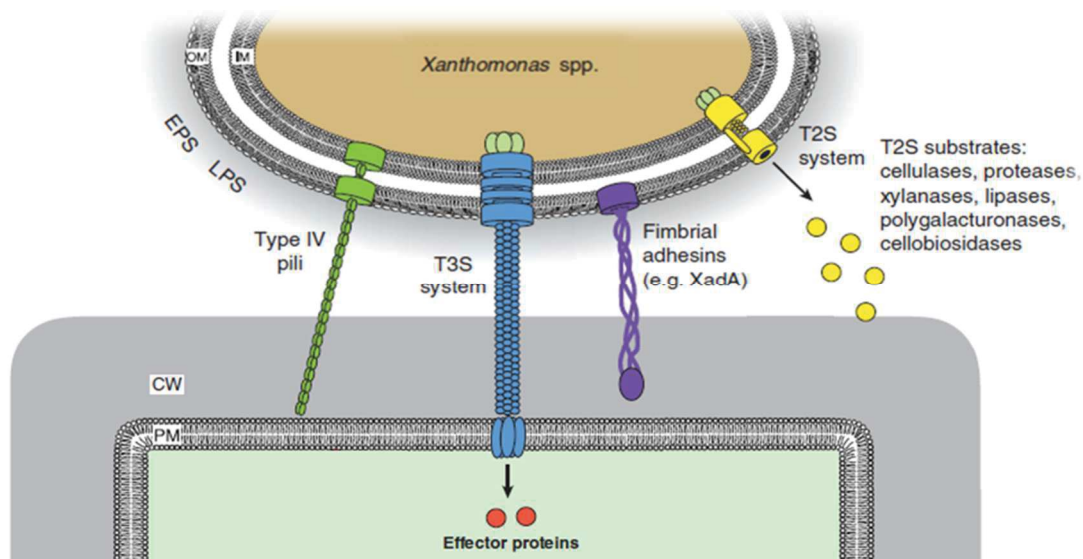


Figure 11 | *Xcc* déploie un arsenal de facteurs de virulence lors de l'infection. Les adhésines (fimbriae & pilus de Type IV) contribuent à l'adhésion des bactéries et constitue le biofilm avec les EPS et LPS. *Xcc* est également capable de sécréter des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire et des protéines effectrices via le T2SS et le T3SS respectivement. Le CWDE perturbe la paroi cellulaire végétale et les protéines effectrices, une fois transférées dans le cytoplasme végétal, sont capables de moduler la physiologie végétale et de bloquer les défenses végétales. EPS: exopolysaccharide, LPS: lipopolysaccharide, T2S: Système de sécrétion de type II, T3S: Système de sécrétion de type III, OM: membrane externe, IM: membrane interne. CW: paroi cellulaire et PM: membrane plasmique. Adapté de Büttner et Bonas, 2010.

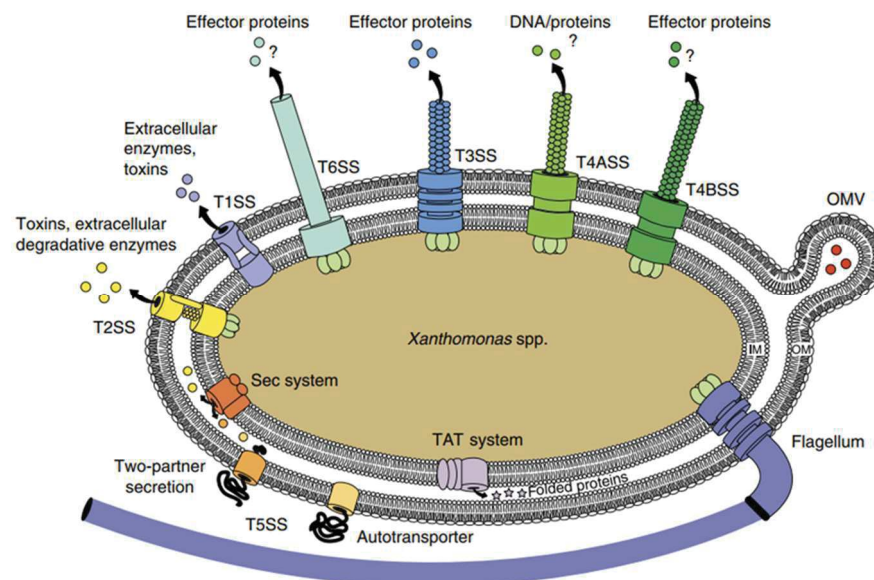


Figure 12 | Structure des systèmes de sécrétion chez *Xanthomonas*. Les *Xanthomonas* possèdent six types de systèmes de sécrétion pour l'export de molécules vers le milieu extracellulaire. Le T2SS et le T5SS sécrètent des protéines après import dans le périplasme par les systèmes Sec ou TAT alors que le T3SS, le T4SS et le T6SS assurent la translocation de protéines dans la cellule hôte. Vésicules de la membrane externe (OMV); membrane interne (IM); membrane externe (OM). D'après Büttner & Bonas, 2010.

par l'hôte en réponse à l'infection. Leur implication dans le pouvoir pathogène est également dû à leur capacité à boucher les vaisseaux du xylème et à bloquer les réponses basales de la plante par chélation du Ca^{2+} apoplastique (Yun et al., 2006; Aslam et al., 2008). D'autres polysaccharides, les LPS (lipopolysaccharides), font également partie intégrante de l'enveloppe bactérienne et de la structure du biofilm. Leur rôle dans la virulence a été clairement établi, mais leur présence peut aussi être délétère puisqu'ils peuvent être détectés par la plante et déclencher des réponses immunitaires (Dow et al., 2000). Finalement, lors de la colonisation des tissus, la formation de biofilms entraîne l'émergence de micro-colonies associées aux cellules végétales et constituent les principaux foyers d'infection.

1.3.5 Sécrétion de facteurs de virulence

Pour des raisons d'intérêt scientifique et agronomique, la phase endophyte pathogène de *Xcc* lors de l'infection de l'hôte est celle qui a été la mieux étudiée. Les facteurs de virulence impliqués dans le développement de la maladie ont donc été les premiers à être identifiés (**Figure 11**). En particulier, les divers systèmes de sécrétion sont très vite apparus comme importants, et parfois indispensables, au bon développement de l'infection. Les bactéries du genre *Xanthomonas* possèdent six systèmes de sécrétion (**Figure 12**) mais seulement cinq sont présents chez *Xcc* (Qian et al., 2005; Büttner and Bonas, 2010). Ces systèmes assurent l'export d'une large gamme de molécules (adhésines, toxines, enzymes, effecteurs) à travers les deux membranes de l'enveloppe bactérienne, du cytoplasme vers le milieu extérieur (Gerlach and Hensel, 2007). En ce qui concerne les systèmes de sécrétion de type I, IV et V, très peu d'informations sont disponibles chez *Xcc* et leur implication dans le pouvoir pathogène semble être minimale. En revanche, les systèmes de sécrétion de type II et de type III sont des déterminants majeurs du pouvoir pathogène et leur contribution a été disséquée en détails (**Figure 11**).

1.3.5.1 Le Système de Sécrétion de type II

Le Système de Sécrétion de type 2 (T2SS) est un assemblage complexe de 12 sous-unités protéiques qui fonctionne sur le principe d'un nano-piston moléculaire (Sandkvist, 2001; Gerlach and Hensel, 2007). Le T2SS est ancré dans la membrane interne où l'hydrolyse de l'ATP assure l'assemblage et le désassemblage d'un pseudo-pilus qui éjecte les substrats à travers un pore dans la membrane externe. La particularité du T2SS est qu'il ne sécrète que des composés présents dans le périplasme de la bactérie. Les substrats sont donc dans un premier temps, adressés au système de transport Sec via une séquence signal dans leur région N-terminale pour être transloqués du cytoplasme vers le périplasme. Ce n'est seulement qu'après excision du peptide signal et un changement de conformation de la protéine dans le compartiment périplasmique que l'export par le T2SS est effectué.

Xcc possède deux sets de gènes codant le T2SS, les gènes *xcs* et *xps*. Cependant, seulement le T2SS codé par *xps* est important pour la virulence, le rôle des gènes *xcs* restant encore très énigmatique. Le T2SS joue un rôle prépondérant dans l'infection de par son rôle de sécrétion d'enzymes hydrolytiques extracellulaires très variées. Parmi ces enzymes de dégradation de la paroi végétale se trouvent notamment des cellulases, polygalacturonases, xylanases et proteases (Ryan et al., 2011). L'activité de ces enzymes génère des produits de dégradation, et en particulier des sucres, qui peuvent être assimilés par *Xcc* et utilisés pour sa croissance. De plus, la dégradation de la paroi favorise le déplacement bactérien dans les tissus de l'hôte. Une étude récente a d'ailleurs mis en évidence que la présence d'une unique cellobiohydrolase (CbsA) est responsable de la vascularisation chez les *Xanthomonas* (Gluck-Thaler et al., 2020). Cependant, les produits de dégradation libérés par ces enzymes peuvent être reconnus par la plante hôte et ainsi activer des réponses immunitaires fortes à l'encontre du pathogène, faisant du T2SS une arme à double tranchant.

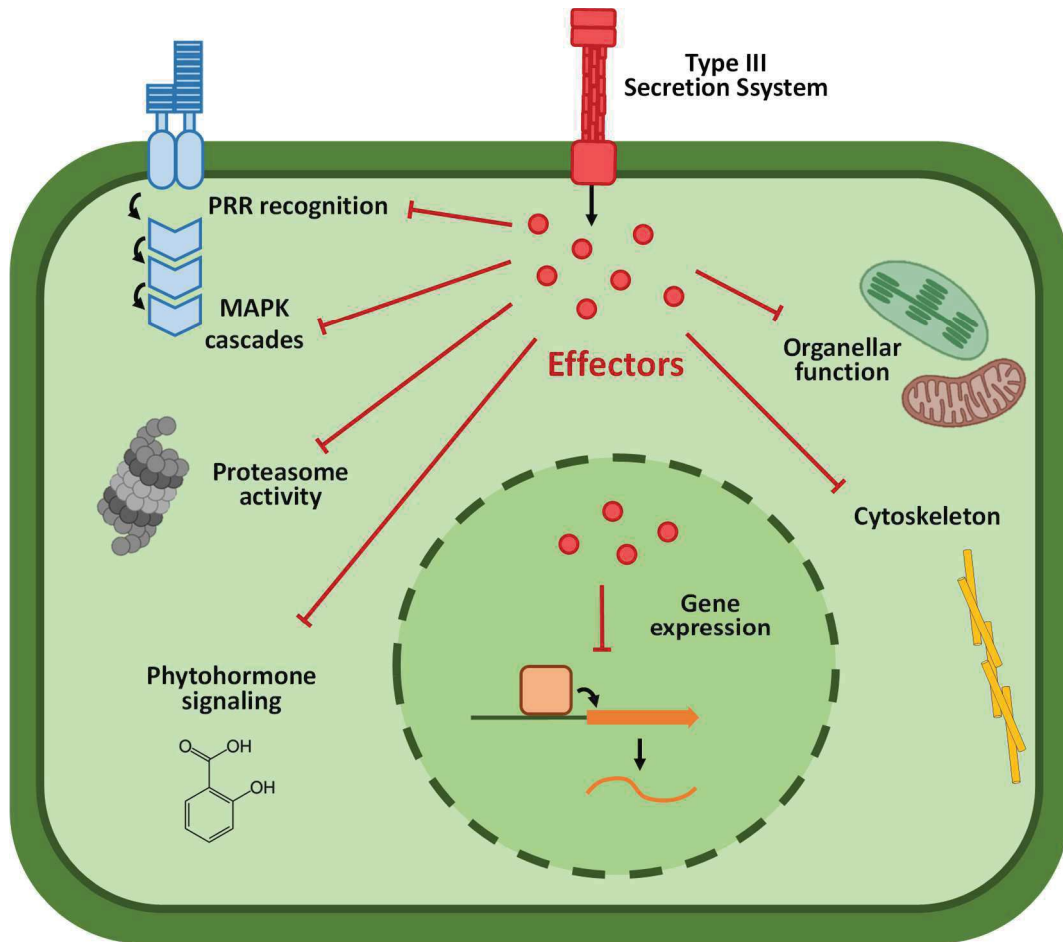


Figure 13 | *Xanthomonas* utilise le T3SS pour injecter des effecteurs dans la cellule hôte et manipuler sa physiologie. L'injection d'effecteurs par le T3SS conduit à la modulation de plusieurs processus biologiques au sein de la cellule de l'hôte. Bien que les cibles de la plupart des effecteurs restent inconnues, certains altèrent la signalisation et la mise en place des réponses immunitaires, les mécanismes de recyclage tels que l'autophagie ou le protéasome, la modulation de l'expression génique, la synthèse des protéines, le trafic vésiculaire, l'homéostasie des phytohormones ou encore la dynamique du cytosquelette. Figure adaptée de la thèse de Manuel Gonzalez-Fuente.

1.3.5.2 Le Système de Sécrétion de type III

Le Système de Sécrétion de type III (T3SS) est de loin le plus étudié (Arlat et al., 1991; Büttner and Bonas, 2010; Timilsina et al., 2020). Il constitue en effet un outil indispensable pour l'initiation et le bon déroulement de l'infection par *Xcc*. Le T3SS, codé par les 25 gènes du cluster *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), se présente sous la forme d'une seringue moléculaire capable d'injecter des protéines, appelées effecteurs, directement dans la cellule hôte. Il s'agit d'une machinerie assez complexe qui traverse non seulement les deux membranes bactériennes mais qui, par allongement d'un pilus (appelé aiguille) et formation d'un pore dans la membrane de l'hôte, assure une passerelle directe mais très sélective entre le cytoplasme du pathogène et celui de la plante (**Figure 11**). Une fois transloqués, les effecteurs vont affecter la physiologie de la cellule végétale et ainsi perturber la mise en place des défenses immunitaires et détourner le métabolisme de l'hôte à l'avantage de la bactérie (**Figure 13**). Le rôle de chacun des effecteurs et leur mode d'action sont aujourd'hui loin d'être élucidés mais il est clair que leur effet est additif et que c'est leur action collective qui aboutit à une infection réussie (Arroyo-Velez et al., in press). L'expression du T3SS et du cortège d'effecteurs associés est finement régulée par le duo de régulateurs transcriptionnels HrpG / HrpX. Bien que les signaux conduisant à l'activation de HrpG ne soient pas connus, il est démontré que HrpG active l'expression de HrpX qui, à son tour, va induire l'expression des gènes du cluster *hrp* et des gènes codant les effecteurs (Wengelnik et al., 1999; Noël et al., 2001). La fixation de HrpX est ciblée vers les promoteurs de ces gènes grâce à la présence d'un motif en amont des gènes appelé PIP-Box (*Plant-Inducible Promoter* ; Koebnik et al., 2006). Alors que la mutation d'effecteurs individuellement a généralement peu d'effet, l'inactivation du T3SS ou de l'un des deux régulateurs HrpG / HrpX rend *Xcc* avirulent. Ce phénotype fait du T3SS un des facteurs de virulence, si ce n'est le facteur de virulence, le plus important pour le cycle infectieux de *Xcc*.

Avec le temps, la co-évolution de l'hôte et du pathogène a donné lieu à une course à l'armement (Jones and Dangl, 2006; Timilsina et al., 2020; Zhou and Zhang, 2020). Ainsi, les plantes ont vu émerger des mécanismes de reconnaissance des effecteurs pour contrer les assauts des agents pathogènes comme *Xcc*. Les réactions immunitaires activées peuvent alors

conduire à la mise en place d'une mort cellulaire programmée, rapide et localisée, appelée réaction hypersensible, qui va contenir l'infection (Balint-Kurti, 2019). C'est d'ailleurs ce type de résistance totale qui est activement recherchée dans le cadre des programmes de sélection variétale en agriculture pour lutter contre les maladies. Cependant, parmi la trentaine d'effecteurs connus chez *Xcc*, un seul a été caractérisé comme étant un facteur d'avirulence chez les brassicacées : XopAC (Xu et al., 2008; Guy et al., 2013b; Wang et al., 2015a).

1.3.6 Régulation du pouvoir pathogène

La diversité de mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaire que l'on vient de détailler, aussi bien pour la perception des signaux que pour la mise en place d'une réponse adaptative, requiert l'existence d'une organisation intracellulaire de gestion des flux d'informations. En effet, le phénotype final de chaque cellule (l'ensemble des traits et caractéristiques observables) est conditionné par l'existence d'un réseau sous-jacent d'intégration des données et de régulation fine des processus physiologiques de la cellule. Ce phénotype bactérien conditionne ce que l'on appelle la fitness. Bien qu'il n'existe pas de définition universelle de ce qu'est la fitness, on la définit ici comme le niveau de compétitivité d'un organisme relativement aux autres organismes présents dans le même environnement (Sæther and Engen, 2015). En pratique, le niveau de multiplication ou de reproduction d'un organisme est utilisé comme proxy de sa fitness. Dans la mesure où les processus biologiques ont un coût énergétique, que ce soit la production des acteurs moléculaires et/ou pour leur activité, leur régulation est cruciale pour maintenir un bon niveau de multiplication. Il est effectivement coûteux pour une bactérie de développer le programme infectieux et de produire tous les facteurs de virulence lorsqu'il n'y en a pas besoin (Sturm et al., 2011). L'intégration des signaux au sein d'un réseau de régulation représente donc un composant majeur de la fitness, en particulier au cours de l'infection.

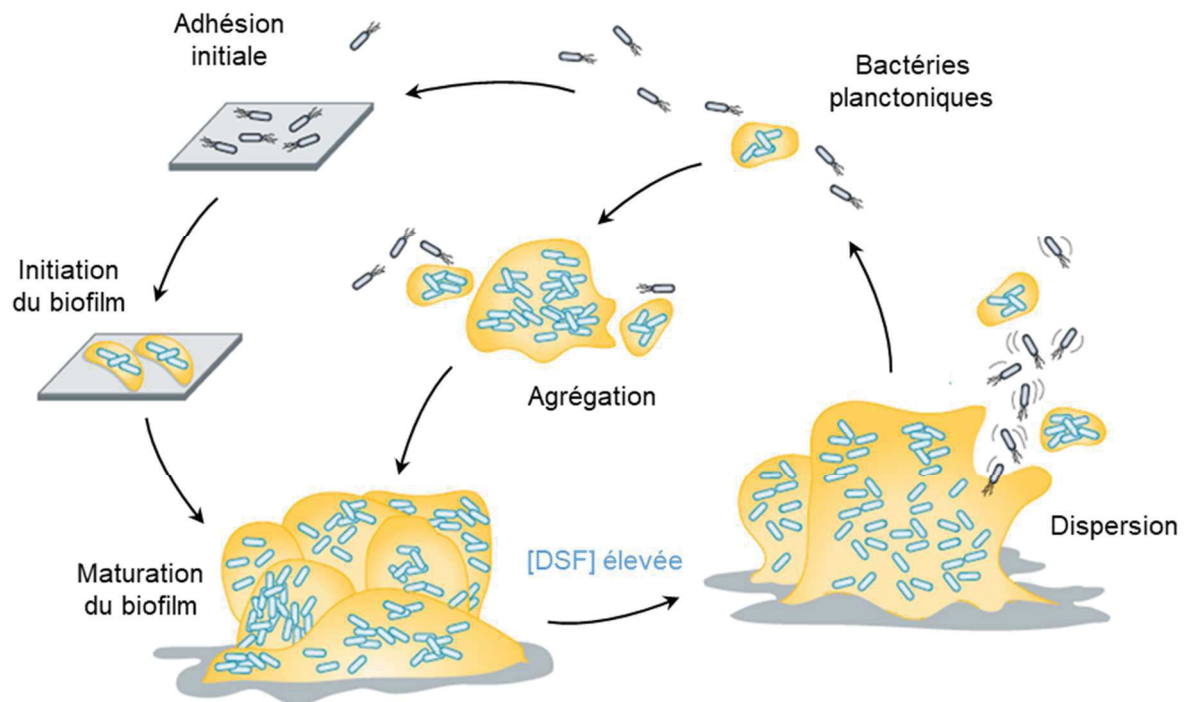


Figure 14 | Le quorum sensing régule la dynamique de formation et de dispersion des biofilms. La formation de biofilm est initiée par l'adhésion de bactéries à une surface. La production de la matrice extracellulaire, en particulier la sécrétion d'EPS, contrôlée par le DSF conduit à l'établissement d'un biofilm dense, protecteur des bactéries. Après croissance de la population bactérienne, l'accumulation du DSF conduit à la dispersion du biofilm par expression d'enzymes de dégradation et une réactivation de la mobilité. Adapté de Rumbaugh & Sauer, 2020.

1.3.6.1 Le Quorum sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un mécanisme bactérien par lequel les individus peuvent évaluer la densité de la population. Le QS est régulé par la production et la perception d'un messager moléculaire appelé DSF (*Diffusible Signal Factor*). Chez *Xcc*, le DSF prend la forme d'acide gras cis-2-insaturés dont la synthèse et la perception sont assurés par les gènes codés dans le cluster *rpf* (*regulation of pathogenicity factors* ; Ryan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017). Le QS joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène (i) en favorisant la production de facteurs de virulence comme les EPS et certaines enzymes extracellulaires, (ii) en activant les systèmes d'acquisition du fer et (iii) en permettant la synchronisation locale du comportement des bactéries. Ainsi, lorsque la population bactérienne atteint une forte densité et que l'auto-inducteur DSF s'accumule massivement dans le milieu environnant, les bactéries activent collectivement un programme cellulaire de dispersion du biofilm, notamment via la sécrétion d'enzymes extracellulaires et l'activation de la mobilité (**Figure 14** ; Ryan *et al.*, 2015; An *et al.*, 2019). Du fait de la pléiotropie des voies modulées par le QS au cours de l'infection, il est communément considéré comme un master-régulateur de l'adaptation et du pouvoir pathogène chez *Xcc*.

1.3.6.2 Modulation intracellulaire par les régulateurs transcriptionnels et les seconds messagers

La régulation du pouvoir pathogène, et plus largement de l'adaptation, dépend de la cascade de réactions intracellulaires qui intervient après la détection des signaux environnementaux. On a vu dans le cas des TCS que c'est l'activation du régulateur de réponse (RR) par le senseur histidine kinase qui déclenche la réponse physiologique. Cependant l'activité du RR peut être multiple. En effet, certains RR contiennent des domaines d'interaction avec le second messager nucléotidique di-GMP cyclique (c-di-GMP). L'activité du RR va alors perturber l'équilibre cellulaire, soit en catalysant la synthèse de c-di-GMP grâce

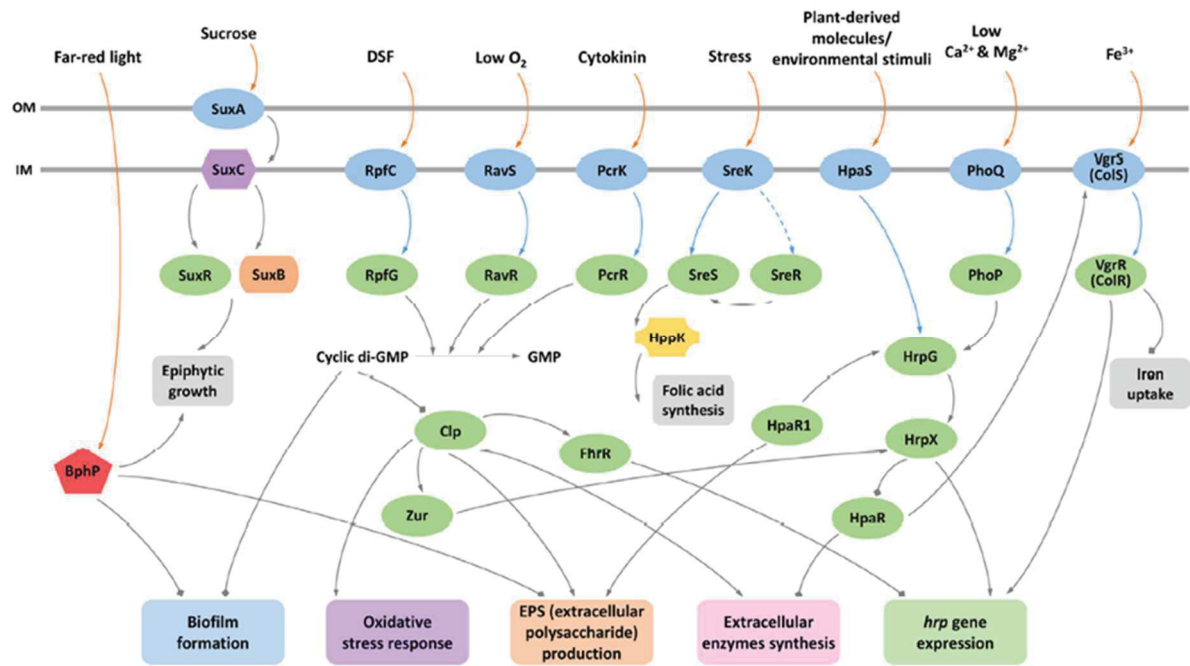


Figure 15 | Intégration des signaux et régulation du pouvoir pathogène chez *Xanthomonas*. *Xanthomonas* utilise plusieurs systèmes pour relier la détection de divers signaux environnementaux à la régulation des réponses appropriées. Le génome de *Xcc* code de nombreux systèmes à deux composants ainsi que d'autres systèmes supposément impliqués dans la perception de l'environnement et la régulation. Dans un nombre relativement restreint de cas, les signaux qui activent ces voies ont été identifiés comme par exemple le signal DSF du quorum sensing, la concentration en oxygène, le fer et autres ions métalliques, les cytokinines ou autres molécules d'origine végétale comme le saccharose, et la lumière. En plus des TCS, plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans les voies de signalisation en aval qui conduisent à l'activation de fonctions associées à la virulence et à d'autres adaptations environnementales. Ceux-ci incluent la protéine Clp qui répond à la concentration en di-GMP cyclique et les régulateurs Zur, FhrR, PhoP, HpaR, HrpX, HrpG et HpaR1. Bien que VgrR soit impliqué dans l'absorption du fer, il contribue également à la régulation de la sécrétion par le T3SS. Les protéines senseur sont en bleu et les protéines de régulation sont en vert. D'après An et al., 2019.

à un domaine GGDEF, soit en catalysant l'hydrolyse du c-di-GMP avec un domaine EAL ou HD-GYP (Hengge, 2009; Hengge et al., 2019). Dans la mesure où d'autres régulateurs intracellulaires sont sensibles aux niveaux de c-di-GMP, l'abondance du second messager est un signal direct d'activation ou de répression des voies en aval. Le c-di-GMP se trouve ainsi être un point de convergence de plusieurs voies évoquées précédemment comme le QS ou les couples de TCS RavS/RavR et PcrK/PcrR, pour lesquels l'activation du RR RpfG, RavR et PcrR respectivement induit la dégradation du c-di-GMP (**Figure 15** ; Ryan *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). Dans ces cas-là, le régulateur transcriptionnel Clp, naturellement inhibé par le c-di-GMP, est activé et prend le relais de l'information en allant se fixer aux promoteurs des gènes cibles et en augmentant leur niveau d'expression (An et al., 2019). Par ailleurs, certains RR sont eux même des régulateurs transcriptionnels et vont dès leur activation aller se fixer sur les promoteurs des gènes cibles et modifier leur profil de transcription. On retrouve par exemple dans cette catégorie le master-régulateur du T3SS HrpG et le régulateur de l'import du fer ColR (Wengelnik et al., 1999; Zhang et al., 2008; Wang et al., 2016). Bien entendu, par effet rebond, certains des gènes activés par les régulateurs transcriptionnels sont eux-mêmes des régulateurs qui vont moduler les processus physiologiques de la cellule sous leur contrôle.

Au bilan, les mécanismes déployés par *Xcc* pour se repérer dans son environnement et mettre en place les réponses adaptatives appropriées sont multiples et lui assurent une fitness optimale aussi bien dans l'hôte qu'en dehors. Cependant, la dynamique de recrutement de tous ces mécanismes, notamment au cours de l'infection, reste encore mal connue. Par ailleurs, près d'un tiers des gènes codant identifiés dans les génomes bactériens ne sont associés à aucune fonction et leur rôle biologique reste énigmatique (Price et al., 2018). Pour étudier ces gènes et comprendre quand et comment ils interviennent dans le fonctionnement cellulaire, il est alors nécessaire de développer des approches à grande échelle qui étendent l'analyse au-delà de chaque gène individuellement. C'est ce que propose la génomique en s'intéressant simultanément au comportement de tous les gènes bactériens.

1.4 La génomique au service de la recherche sur *Xcc*

Avec le développement des technologies de séquençage nouvelle génération (NGS) et la diminution constante des coûts de séquençage durant les dix dernières années, l'accès aux génomes bactériens a été fortement facilité. L'exploitation des ressources génomiques est donc maintenant au cœur de la recherche sur *Xcc*. Dans la mesure où *Xcc* est un pathogène présent à l'échelle mondiale, la diversité des souches isolées et des hôtes infectés en fait un modèle d'étude intéressant pour des approches de génomiques comparatives. En particulier, il permet d'adresser les questions liées à l'identification des déterminants génétiques de la spécificité d'hôte (notamment à l'échelle du genre *Xanthomonas*) et de la spécificité de tissus colonisés au cours de l'infection (Jacques et al., 2016). A l'heure actuelle, les génomes d'une cinquantaine de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ont été séquencés.

Cependant, malgré l'opportunité que représentent ces ressources génomiques, les études bioinformatiques *in silico* ne peuvent qu'informer sur la présence ou l'absence de déterminants génétiques sans adresser leur importance pour l'infection. Plusieurs approches de génomique fonctionnelle ont donc été développées pour combler ce manque et explorer à grande échelle la contribution de chacun des gènes *in vivo*.

1.4.1 Le RNAseq : comprendre le comportement bactérien par l'étude du transcriptome

La transcriptomique est l'analyse simultanée du niveau d'expression de l'intégralité des gènes. Cette méthode se base sur l'extraction de tous les ARN bactériens et de leur séquençage à haut-débit. Actuellement, la méthode privilégiée est le séquençage aléatoire du transcriptome entier (*whole transcriptome shotgun sequencing* en anglais ; ci-après RNAseq). Cette méthode permet, sans *a priori*, de quantifier le nombre de copies de chacun des transcrits de la cellule. On peut ainsi capturer les ARN messagers, les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert et les petits ARN et avoir une photo à un instant précis de leur niveau d'expression. Dans la mesure où l'expression d'un gène constitue la première étape pour la mise en place du trait phénotypique qu'il contrôle, le RNAseq saisit à tout instant le comportement bactérien et les réponses adaptatives implémentées, y compris dans un environnement changeant.

Typiquement, les études s'attachent à comparer les niveaux d'expression des gènes dans au moins deux conditions différentes. Il est en effet nécessaire d'avoir une condition de référence pour déterminer si le niveau d'expression observé est biologiquement différent et donc représentatif d'une quelconque adaptation.

L'utilisation du RNAseq chez *Xcc* a cependant été pour l'instant principalement limitée à des études *in vitro* orientées vers la compréhension du rôle d'un gène dans la physiologie cellulaire. En comparant le transcriptome d'un mutant délété d'un gène d'intérêt avec celui de la souche sauvage, on met facilement en évidence le groupe de gènes sous son contrôle et donc par extension les fonctions biologiques dans lequel ce gène est impliqué. Bien que biaisé, la réalisation d'une étude *in vitro* est expérimentalement plus facile et techniquement beaucoup moins contraignante qu'une étude *in planta*. En effet, même si étudier le comportement bactérien au cours de l'infection semble beaucoup plus pertinent, il n'en reste pas moins compliqué : lors de l'extraction d'ARN, les transcrits bactériens sont dilués parmi les transcrits de la plante qui sont eux bien plus abondants. Le signal bactérien alors obtenu lors du séquençage n'est pas toujours assez robuste pour pouvoir dégager une quantification satisfaisante du niveau d'expression de chacun des gènes. Au contraire, en condition *in vitro*, seuls les ARN bactériens sont présents et la qualité du séquençage des échantillons est donc bien meilleure. Pour étudier les stratégies infectieuses, il est clair que le challenge réside alors dans la réduction des contaminations d'ARN d'origine végétale (eucaryote et chloroplastique) dans l'échantillon pour gagner en profondeur lors du séquençage des ARN bactériens. Pour cette raison, le nombre d'études s'intéressant au transcriptome des *Xanthomonas* lors de l'infection reste encore très limité (Lee et al., 2017; Li et al., 2019; Liao et al., 2019; Gétaz et al., 2020).

Par ailleurs, les données de transcriptomique peuvent aider à annoter précisément les génomes. En effet, les algorithmes de prédiction des séquences codantes ne se basent que sur la séquence du génome et des motifs identifiés dans d'autres systèmes biologiques. L'apport de données fonctionnelles permet alors de confirmer avec précision l'existence et la longueur des transcrits dans le génome, mais également de mettre en évidence l'existence de nouveaux gènes manqués par les prédictions *in silico*.

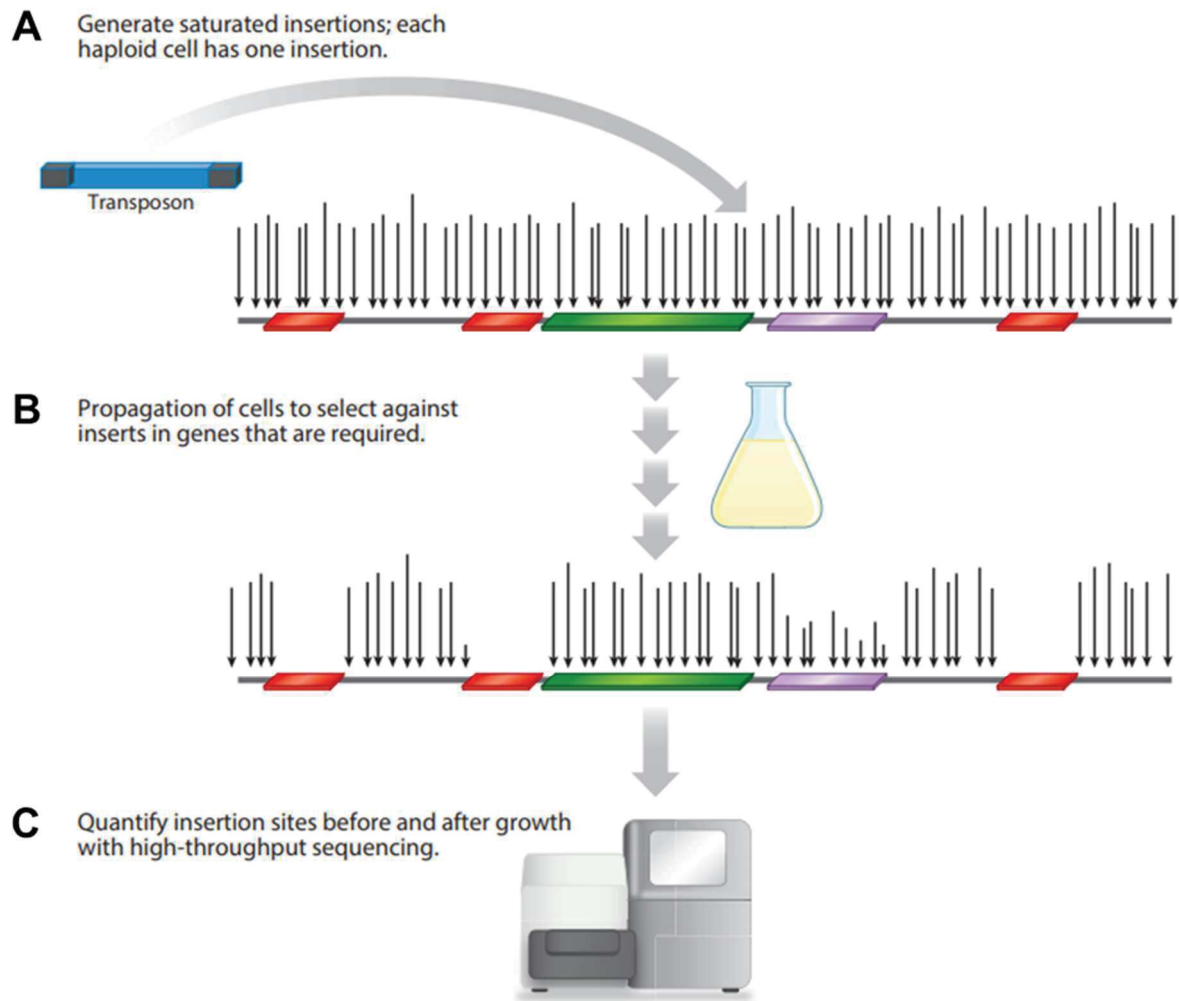


Figure 16 | Principe du TnSeq. A) Génération d'une banque de mutants par insertion aléatoire de transposon dans le génome. Chaque bactérie reçoit un événement d'insertion de manière à saturer complètement et uniformément le génome à l'échelle de la population. Les flèches indiquent les sites d'insertion et leur longueur indique le nombre de reads lors du séquençage. Les cadres ouverts de lecture sont représentés par des rectangles de couleur selon leur importance (rouge : essentiel ; vert : non-essentiel ; violet : important). **B)** Une fois la banque générée, les mutants sont cultivés dans les conditions d'intérêt. Les gènes importants pour la croissance dans ce milieu sont retrouvés moins fréquemment selon leur contribution à la fitness bactérienne. **C)** Le nombre de reads pour chaque insertion est évalué par séquençage haut-débit. L'abondance relative des mutants est mesurée avant et après chaque expérience (van Opijnen & Levin, 2020).

Les approches de transcriptomique possèdent plusieurs limitations biologiques et techniques : (i) le niveau d'expression d'un gène n'informe pas directement de son importance pour la cellule, (ii) l'information obtenue témoigne du transcriptome moyen de l'ensemble de la population et (iii) les études *in vivo* sont compliquées à réaliser. Pour combler ces failles, une approche complémentaire de génomique fonctionnelle a été développée : le TnSeq.

1.4.2 Le TnSeq : quantifier la contribution de chaque gène à la fitness bactérienne

Le TnSeq est le nom donné à une méthode de mutagenèse par insertion de transposon combinée à du séquençage haut-débit. Au cours des dix dernières années, plusieurs approches similaires ont vu le jour (Cain et al., 2020; van Opijnen and Levin, 2020) : le TnSeq (*Transposon Sequencing*), le TraDIS (*Transposon-Directed Insertion site Sequencing*), le INSeq (*Insertion Sequencing*) et le HITS (*High-throughput Insertion Tracking by deep sequencing*). Elles se basent toutes sur le même principe (**Figure 16**) : tout d'abord, le génome bactérien est soumis à une mutagenèse aléatoire par insertion de transposons jusqu'à saturation, puis la banque de mutants obtenue est placée en conditions de culture pour permettre la multiplication des mutants. Après multiplication, le séquençage des transposons et/ou des sites d'insertion permet de quantifier avec précision l'abondance relative de chacun des mutants dans la population. Par comparaison du niveau de croissance de chacun des mutants, il est alors possible d'évaluer l'impact (positif ou négatif) de chacune des mutations sur la fitness bactérienne.

Le TnSeq a dans un premier temps été consacré à l'étude des gènes essentiels. Il est en effet facile de repérer lors de la construction de la banque les gènes qui ne possèdent pas d'insertion puisque ces mutants sont absents de la banque. Dans ce cas, et sous réserve que la mutagenèse du génome soit saturante, on considère que ces gènes ont bien subi des événements d'insertion de transposon mais que la mutation a été très délétère voire létale. Dans des conditions de culture en milieu riche, ces gènes sont donc considérés comme essentiels pour le fonctionnement cellulaire bactérien (van Opijnen and Levin, 2020).

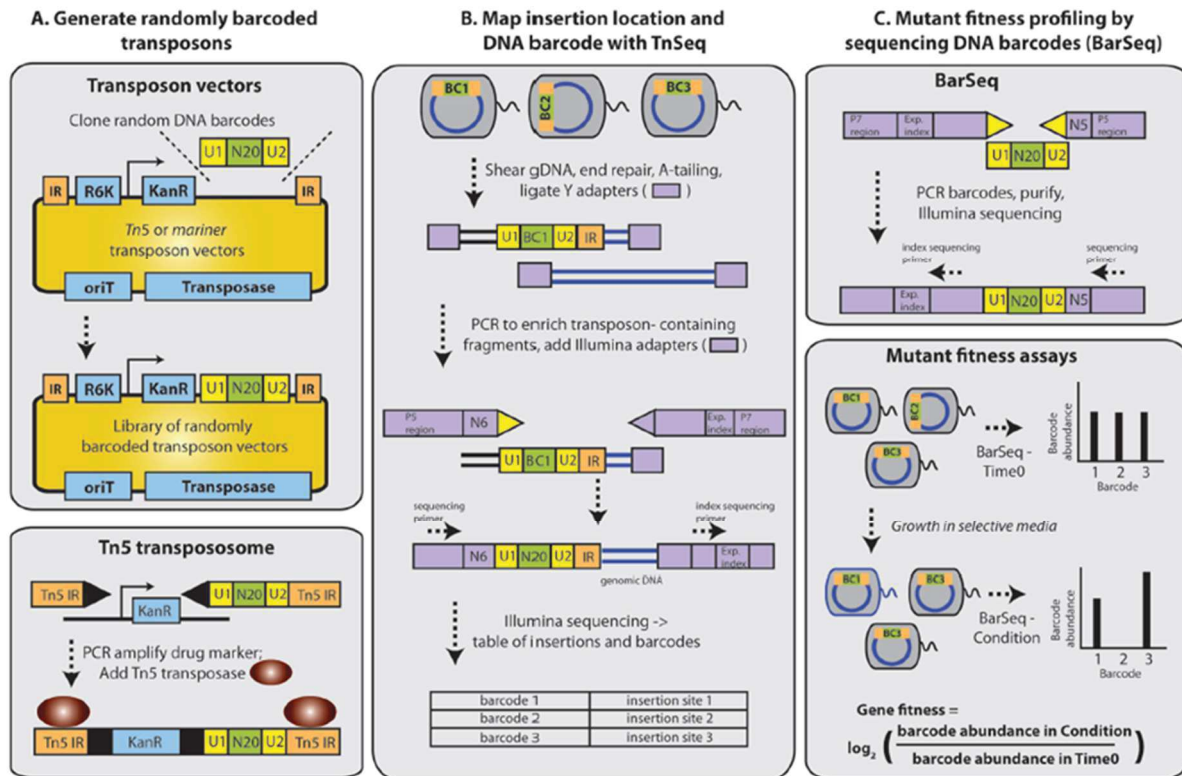


Figure 17 | Principe du RB-TnSeq. A) (Haut) Les vecteurs de livraison de transposon Tn5 et mariner sont convertis en vecteurs RB-TnSeq en clonant des millions de code-barres ADN uniques (N20) flanqués de sites d'amorçage PCR communs (U1 et U2) près du bord de la répétition inversée du transposon (IR). (En bas) Un transpososome à code-barres aléatoires a été généré en amplifiant d'abord par PCR le gène de résistance à la kanamycine avec des oligonucléotides contenant des IR Tn5 et la région de code-barres d'ADN aléatoire, puis en ajoutant la transposase Tn5. Les trois systèmes peuvent être utilisés pour muter les bactéries par électroporation ou (pour les vecteurs Tn5 et mariner) par conjugaison. Indépendamment du système ou de la méthode de délivrance, le but est de générer une grande population de transposons mutants de telle sorte que chaque souche contienne un code-barre ADN unique. **B)** Une banque de mutants de transposon barcodés au hasard est caractérisée en utilisant un protocole similaire au HITS ou au TraDIS. Ici, nous nous référons à ce protocole de manière générique par «TnSeq». Pour le TnSeq, l'ADN génomique est fragmenté, réparé et ligaturé avec des adaptateurs Illumina Y. Les fragments d'ADN contenant le transposon sont enrichis par PCR à l'aide d'une amorce spécifique de l'adaptateur Y et d'une seconde amorce spécifique du transposon. Le code-barre d'ADN et le site d'insertion du transposon sont identifiés en une seule étape de séquençage Illumina de 150 nucléotides. Les résultats TnSeq se présentent sous la forme d'un tableau des code-barres et des sites d'insertion de transposon associés. **C)** (Haut) Pour le BarSeq, les code-barres d'ADN sont amplifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides qui se lient aux régions U1 et U2 communes. Les deux oligonucléotides contiennent des séquences adaptatrices pour le séquençage Illumina. L'un des oligonucléotides contient un indice d'expérimentation et permet le multiplexage de plusieurs expériences de BarSeq sur une seule ligne de séquençage Illumina. (En bas) Les tests d'évaluation de la compétitivité des mutants sont effectués en comparant l'abondance des code-barres d'ADN par BarSeq avant (temps zéro) et après (condition) la croissance sélective. Dans cet exemple simple, le gène associé au code-barre 2 a une fitness réduite; le gène associé au code-barre 3 a une meilleur fitness. D'après Wetmore et al., 2015.

La connaissance des gènes essentiels est importante puisqu'elle permet d'identifier de nouvelles cibles de traitement pour lutter contre les infections. Elle ouvre également la porte au monde de la biologie synthétique qui vise à comprendre les mécanismes minimaux requis pour le fonctionnement des cellules.

Au-delà des analyses de présence/absence de mutants, la force des approches de type TnSeq repose sur la possibilité de quantifier de manière très fine la contribution de chacun des gènes à la fitness. Ainsi, le TnSeq a très vite été utilisé pour étudier l'importance de chacun des gènes lors de l'infection. Ce criblage fonctionnel haut-débit a récemment été appliqué *in planta* chez plusieurs bactéries associées aux plantes dont certains pathogènes comme *Pantoea stewartii* dans le xylème du maïs (Duong et al., 2018), *Agrobacterium tumefaciens* sur la tomate (Gonzalez-Mula et al., 2019), *Pseudomonas syringae* sur et dans les feuilles de haricot et de poivron (Helmann et al., 2019; Helmann et al., 2020) et *Dickeya dadantii* sur endive (Royet et al., 2019), mais également chez des modèles non-pathogènes comme *Pseudomonas simiae* (Cole et al., 2017) et *Pseudomonas fluorescens* (Liu et al., 2018) dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana*. Cependant, à ce jour aucune étude TnSeq n'a été réalisée sur un membre des *Xanthomonas*.

La dernière évolution de la famille TnSeq est le RB-TnSeq (Randomly-Barcoded Transposon insertion site Sequencing). De manière assez ingénieuse, le RB-TnSeq se base sur la présence de codes barre nucléotidique aléatoire de 20 pb dans les transposons pour identifier chacun des mutants dans la population (**Figure 17**; Wetmore *et al.*, 2015). L'étape préliminaire de caractérisation de la banque par séquençage des transposons, avec leur code-barre, et des régions flanquantes dans l'ADN bactérien permet alors d'associer chaque code-barre à un site d'insertion, et donc de relier chaque code-barre à une mutation. L'avantage de cette méthode réside dans l'économie de temps et d'argent : une fois la banque caractérisée, le séquençage des échantillons sera effectué uniquement sur les code-barres et non plus sur les sites d'insertion, évitant ainsi tout le travail bioinformatique de mapping des reads sur le génome. Au bilan, le TnSeq permet de cribler à haut-débit (en une seule étape et pour des milliers de gènes en parallèle), la contribution de chacun des gènes bactériens à la fitness au cours de l'infection. Cette méthode est donc complémentaire des approches de transcriptomique évoquées précédemment : alors que le RNAseq renseigne sur le profil d'expression des gènes à un moment donné, le TnSeq fournit une mesure de l'importance réelle

des gènes pour la fitness sur une période de temps élargie. Combiner ces deux approches fonctionnelles pour comprendre la biologie des systèmes sans *a priori* semble donc être une stratégie pertinente pour étudier l'adaptation des bactéries au cours de l'infection.

Chapitre 2

Projet de Thèse

Au cours des dernières décennies, l'avènement de la biologie moléculaire a permis d'identifier et de caractériser les déterminants majeurs du pouvoir pathogène chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Cependant, les bases génétiques de l'adaptation aux environnements colonisés par les bactéries, en particulier lors de l'infection de la plante hôte, restent encore mal connues. Au cours de cette thèse, j'ai donc cherché à répondre à plusieurs questions :

- Quels mécanismes sont déployés par *Xcc* pour infecter la plante ?
- Quels gènes en particulier contribuent à la fitness de *Xcc* ?
- Quelles stratégies adaptatives sont employées dans chacun des tissus colonisés au cours du cycle infectieux ?

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place des approches de génomique fonctionnelle par RNAseq et RB-TnSeq et ainsi réalisé des cribles génétiques haut-débit lors de l'infection du chou-fleur commercial *Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis F1 par la souche *Xcc* 8004. L'importance de plusieurs gènes candidats dans la fitness bactérienne a ensuite été validée par des approches de génétique inverse et de phénotypage *in vitro* et *in planta*.

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse sont présentés dans le **Chapitre 3**. La **Partie 1** correspond au manuscrit d'un article soumis récemment pour publication. On y présente les résultats de notre approche transcriptomique par RNAseq destinée à étudier la physiologie de *Xcc* lors de l'infection précoce (4 heures post-inoculation) et tardive (3 jours post-inoculation) des hydathodes de chou-fleur. La **Partie 2** correspond au manuscrit d'un autre article en cours de finalisation. Il représente le cœur de mon projet de thèse, avec des résultats de criblages RB-TnSeq dans les hydathodes et la sève de xylème de chou-fleur notamment. On y décrit l'identification des gènes requis pour la fitness de *Xcc* dans des environnements *in planta* et la caractérisation d'un gène que l'on considère être un nouveau régulateur de l'adaptation et de la pathogénie chez *Xcc*. Enfin, la **Partie 3** détaille ma contribution à la caractérisation d'un nouvel effecteur de type III de *Xcc*, XopJ6. Je présente les résultats obtenus concernant l'influence de XopJ6 sur la croissance de *Xcc* *in planta* et les mécanismes impliqués dans sa reconnaissance par le chou-fleur Clovis F1. L'ensemble de ces

résultats, les éléments de réponse qu'ils apportent, ainsi que les perspectives envisageables sont discutés dans le **Chapitre 4**.

Chapitre 3

Résultats

Partie 1

Transcriptome de *Xcc* dans l'hydathode :
adaptations physiologiques et expression du
pouvoir pathogène

3.1.1 Contexte

L'objectif central de ma thèse était d'améliorer notre compréhension du comportement de *Xcc* lors de l'infection de la plante hôte. La transcriptomique est une approche classique qui fournit une image de l'état physiologique de la cellule au temps « t » en dévoilant les réponses adaptatives implémentées par la bactérie. Dans ce premier chapitre, nous décrivons l'analyse du comportement de *Xcc* lors de l'infection précoce des hydathodes par une approche de transcriptomique par RNAseq. Grâce à l'élaboration d'un protocole d'enrichissement en ARN bactériens, nous avons pu comparer le transcriptome de *Xcc* après 4 heures et 3 jours dans l'hydathode et avons constaté une reprogrammation massive du niveau d'expression de plusieurs centaines de gènes. De plus, nous identifions le régulon de HrpG, le régulateur de réponse contrôlant l'expression du T3SS, chez la souche *Xcc* 8004 et montrons que ce régulon est activé pendant la colonisation de l'hydathode. La validation fonctionnelle menée sur des gènes candidats a permis de valider l'importance de l'acquisition de certains composés comme le phosphate pour la multiplication optimale de *Xcc* dans cette niche. L'ensemble des approches et résultats développés dans le cadre de cette étude sont décrits dans le manuscrit ci-après récemment soumis pour publication dans la revue *The ISME Journal*.

3.1.2 Contribution

Le travail présenté ici est le résultat d'une collaboration locale au sein du LIPM porté par l'équipe SIX et impliquant 3 doctorants successifs. Dans un premier temps, Brice Roux a optimisé le protocole pour la transcriptomique *in vitro* chez *Xcc* et généré les données du

régulon HrpG. Par la suite, Aude Cerutti a développé un protocole pour réaliser le RNAseq sur *Xcc* lors de l'infection des hydathodes et généré les échantillons. Les données de séquençages des deux expériences étaient disponibles lors de mon arrivée dans l'équipe. Après les traitements bio-informatiques et bio-statistiques, j'ai été impliqué dans l'analyse des résultats, l'identification des gènes candidats et la validation fonctionnelle des voies qui nous paraissaient intéressantes d'approfondir. J'ai donc produit les différentes souches bactériennes (délétion et complémentation) et caractérisé leurs phénotypes (évaluation du pouvoir pathogène et de la multiplication dans l'hydathode). Enfin, j'ai contribué à la rédaction de l'ensemble du manuscrit soumis.

***Xanthomonas campestris* transcriptome inside cauliflower hydathodes
reveals virulence strategies and physiological adaptation during
the biotrophic infection stage**

Running title: *Xanthomonas* transcriptome inside hydathodes

Julien S. Luneau^{1,*}, Aude Cerutti^{1,*}, Brice Roux^{1,2}, Sébastien Carrère¹, Marie-Françoise Jardinaud¹, Antoine Gaillac¹, Carine Gris¹, Emmanuelle Lauber¹, Richard Berthomé¹, Matthieu Arlat¹, Alice Boulanger¹, Laurent D. Noël¹

Affiliations:

¹ LIPM, université de Toulouse, INRAE, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France

² present address: HalioDx, Luminy Biotech Entreprises, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille Cedex 9, France

* These authors contributed equally to this work

Authors for correspondence: alice.boulanger@inrae.fr and laurent.noel@inrae.fr, LIPM, université de Toulouse, INRAE, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France. Tel: +33 5 61 28 50 47.

Abstract

Pathogens causing diseases on crop plants represent a threat to agriculture and indirectly to the environment through the use of pesticides. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is a seed-transmitted vascular pathogen causing black rot disease on cultivated and wild *Brassicaceae*. Hydathodes are plant organs localized at leaf margins which are preferentially used by *Xcc* to enter the plant tissues and initiate systemic infections. This study presents the transcriptomic status of *Xcc* three days after entry into cauliflower hydathodes. Despite the absence of visible plant tissue alterations and a bacterial biotrophic lifestyle, *Xcc* deeply modified the expression of over 800 of its genes including a striking repression of chemotaxis and motility functions. *Xcc* full repertoire of virulence factors was not yet activated but the

expression of the 95-gene HrpG regulon, including the type three secretion machinery important for suppression of plant immunity, was induced. A number of metabolic adaptations such as catabolism of plant compounds, transport functions, sulfur and phosphate metabolism were upregulated transcriptionally without significant bacterial stress responses being observed. These transcriptomic observations give information about the nutritional and stress status of bacteria during the biotrophic infection stages and help to decipher the adaptive strategy of *Xcc* to the hydathode environment.

Importance

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) bacteria cause important damages in the cultivated *Brassicaceae* including both fresh market and processing Brassica and impose strong sanitary restrictions to the Brassica seed industry. The question of how such pathogens adapt and prosper in plant environments is an essential question to optimize our agricultural practices and to limit the spread and incidence of the disease. In this study, we report the pathogen transcriptome at early stages when the bacterial population is low. To this end, we optimized both RNA extraction and enrichment methods to capture *Xcc* transcriptome inside hydathodes, the leaf plant organs preferentially infected by *Xcc* in field conditions. These transcriptomic data captured bacterium physiological status at the first encounter of plant inner tissues and enable to generate a new list of candidate genes potentially involved in bacterial pathogenicity and adaptation to the plant environment.

Keywords

Xanthomonas campestris, hydathode, cauliflower, transcriptome, *hrp* gene cluster, type III effector, type III secretion, *hrpG*, regulon.

Introduction

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) is a seed-transmitted vascular pathogen causing black rot disease on *Brassicaceae*. This bacterium has a complex lifestyle composed of both epiphytic and endophytic stages (Vicente and Holub, 2013) which have been studied by molecular genetics since the 80's (Daniels et al., 1984). *Xcc* epiphytic life is associated with environmental stresses such as UV or dehydration and relies, for instance, on the production of protective pigments or xanthan exopolysaccharides (EPS). Upon favorable conditions, *Xcc* will gain access into the plant inner tissues via wounds or hydathodes (Cerutti et al., 2017). Hydathodes are plant organs localized at the leaf margin mediating guttation. Hydathodes are classically composed of an epidermis with water pores resembling stomata and an inner loose parenchyma called epithem irrigated by numerous xylem vessels (Cerutti et al., 2019). These specific structures offer an ecological niche for pathogenic bacteria and a rapid access to xylem vessels leading to systemic vascular infections (Cerutti et al., 2017). However, only few pathogens have been demonstrated to colonize this niche and the conditions driving hydathode infection are poorly understood (Cerutti et al., 2019). While a pre-invasive immunity limiting *Xcc* entry through water pores could not be evidenced, a post-invasive immunity was described inside the epithem (Cerutti et al., 2017). This is best revealed by the inability of a bacterial type III secretion (T3S) mutant to multiply in the epithem and to initiate vascular infections. The Hrp (hypersensitive response and pathogenicity) T3S system is responsible for the secretion and translocation of type III effector (T3E) proteins inside plant cells where they interfere with plant physiology and suppress plant immunity.

Once inside hydathodes, *Xcc* will adapt to this new niche and first adopt a biotrophic lifestyle: bacteria will multiply intercellularly between epithem cells without causing visible tissue alterations as observed until three days post infection (dpi) of cauliflower hydathodes (Cerutti et al., 2017). A switch to a necrotrophic behaviour is then observed, resulting in the almost complete digestion of the epithem at 6 dpi and bacterial vascularization. Systemic infection reaching the flowers will cause seed colonization and transmission to seedlings (Darsonval et al., 2009; Dutta et al., 2014).

During infection, *Xcc* feeds on guttation fluid, xylem sap or plant tissues. This process can be facilitated by high affinity nutrient transport systems such as TonB-dependent transporters (TBDT) for mineral (e.g iron) or carbohydrate nutrition {e.g. sucrose, Blanvillain

et al., 2007) and to a large repertoire of plant cell wall degrading enzymes secreted through the type two secretion (T2S) system. Such metabolic adaptations need to be finely coordinated throughout the infectious cycle. Master regulators include the *rpf*-DSF (Diffusible Signal Factor) quorum sensing system and sensors of nutrient availability and metabolic activity. *Xcc* genome encodes more than 50 two-component systems that allow bacterial cells to respond appropriately to diverse extracellular stimuli encountered during its life cycle such as oxidative stress, oxygen levels, pH, temperature and plant signals (Qian et al., 2008). Among them, some are well known to play a major role in virulence such as the response regulator HrpG which is, with the transcription regulator HrpX, the master regulator of the T3S regulon (Noël et al., 2001; Roux et al., 2015; Zhang et al., 2020). Most transcriptomic studies in *Xcc* or other *Xanthomonas* species were performed so far *in vitro* focusing on specific regulons of the *hrpG* and *hrpX* genes in *hrp-inducing* medium, the *prc* protease gene, the DSF-mediated quorum sensing gene or the *gum* genes responsible for xanthan production (Schmidtke et al., 2012; Jalan et al., 2013; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2013; An et al., 2014; Alkhateeb et al., 2016; Kim et al., 2016; Liao et al., 2016; Noh et al., 2016; Chen et al., 2018; Li et al., 2019). Only few *in planta* transcriptomic analyses were performed on *Xanthomonas* (Lee et al., 2017; Li et al., 2019; Liao et al., 2019; Gétaz et al., 2020) and all at late stages of infection and/or in comparison to *in vitro*-grown bacteria. Our knowledge of *in planta* gene expression and regulation thus remains elusive and technically challenging especially at early steps of infection, when bacterial populations are low. Such *in planta* transcriptomics approaches would help identify new pathogenic behaviors and adaptation to the host during the infection process and in the different tissues colonized. Such approaches are also good descriptors of the environmental conditions and stresses imposed by the host to the bacterial pathogen (Nobori et al., 2018).

In this study, we compared the transcriptome of *Xcc* inside cauliflower hydathodes at 4 or 72 hours after inoculation, *i.e.* during the biotrophic stage of infection, in order to determine *Xcc* adaptative transcriptomic responses and access the environmental conditions met by this bacterial pathogen inside plant tissues.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The list of strains and plasmids used in this study is provided in **Table S1**. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reference strain 8004 is a spontaneous rifampicin-resistant derivative of strain NCPPB 1145 isolated from cauliflower in Sussex (UK, 1958) (Daniels et al., 1984). The 8004::*hrpG** E44K mutant constitutively expresses the *hrpG* regulon (Guy et al., 2013). All deletion mutants were constructed in the *Xcc* 8004::*GUS-GFP* background (Cerutti et al., 2017). *Xcc* was cultivated in MOKA rich 4 g.l⁻¹ Yeast extract, 8 g.l⁻¹ Casamino acids, 1 mM MgSO₄ and 2 g.l⁻¹ K₂HPO₄; Blanvillain et al., 2007) at 28°C under agitation at 200 rpm or on MOKA-agar plates. *E. coli* strains TG1 and pRK2073 were cultivated on LB-agar or in liquid LB medium at 37°C under agitation.

Mutagenesis and complementations

In-frame deletion mutants of *Xcc* were achieved using double recombination with derivatives of the suicide plasmid pK18mobSacB as described (Schäfer et al., 1994). Sequences flanking the deletion were PCR amplified from *Xcc* strain 8004 genomic DNA, introduced into pK18mobSacB by Gibson assembly (Gibson et al., 2009) and verified by sequencing. Genetic complementation was performed by genomic integration of a cassette containing each gene under the control of a constitutive pTac promoter at a neutral locus situated between *XC_1301* and *XC_1302*. Gene fragments encompassing the predicted translational start site were PCR amplified from *Xcc* strain 8004 genomic DNA and cloned by Gibson assembly into plasmid pK18_CompR3, a pK18mobSacB derivative containing a pTac promoter region and a T7 terminator region from pCZ1016 (Déjean et al., 2013) flanked by *XC_1301* and *XC_1302* sequences. Because *XC_2711* is located at the end of the *pstCAB* operon, it does not contain any ribosome-binding site (RBS) in its immediate upstream region, thus preventing correct translation of the transcript. This led us to construct the pK18_compR3_RBS plasmid by adding the RBS from the pK18-GUS-GFP plasmid (Cerutti et al., 2017), downstream the pTac promoter. All plasmids were conjugated into *Xcc* 8004::*GUS-GFP* derivatives by triparental mating with the *E. coli* TG1 carrier and pRK2073 helper strains as described (Figurski and Helinski, 1979; Ditta et al., 1980; Cerutti et al., 2017). Deletions and insertions were verified

by PCR. The sequences of oligonucleotides used to construct deletion and complementation plasmids are listed in **Table S2**.

Plant growth conditions

Brassica oleracea var *botrytis* cv. Clovis F1 (cauliflower) were grown under greenhouse conditions. Four-weeks-old plants were transferred to a growth chamber (9 h light; 22°C; 70% relative humidity) one day before inoculations.

Preparation of biological samples used for RNA sequencing

Xcc strains were grown *in vitro* in MOKA medium to mid exponential phase, harvested by filtration as described (Roux et al., 2015) and stored at -80°C. Hydathodes from the first three cauliflower leaves were inoculated by continuous or transient dipping as described (Cerutti et al., 2017) using 0.01% of SILWET-L77® (DE SANGOSSE). For continuous dipping, leaves were dipped in a bacterial suspension for 4 hours in a covered small greenhouse and immediately harvested. For transient dipping, after inoculation, plants were watered, placed in a small greenhouse, covered for a day and a half and harvested 72 hours post inoculation. To collect hydathodes, leaves were briefly rinsed twice in sterile distilled water and dried on a paper towel prior to harvesting. At least 1000 hydathodes were macrodissected per condition with a 1.5 mm diameter punch. Collected tissues were immediately placed in a RNA Protect Bacteria Reagent® (Quiagen™, 2:1 (v/v) of RNA Protect and RNase free water). After three minutes sonication in a waterbath, the supernatant was recovered and centrifuged for 10 minutes at 5000g. The pellet was stored at -80°C. Three independent biological replicates were performed.

In order to verify that in both conditions hydathodes contain an equivalent amount of bacteria, infection efficiency after 4 hpi and 72 hpi was checked by determining bacterial populations in 24 and 30 individual hydathodes, respectively in three independent experiments (**Figure S1**).

RNA extractions, ribodepletion and sequencing

RNA extraction was essentially performed as previously described (Sallet et al., 2013). After RNA extraction with the mirVana Isolation Kit (Ambion®, Life Technologies™), RNA integrity was assessed using the RNA Nano 6000 Assay Kit for the Bioanalyzer 2100 system. 10 µg of total RNA per sample were used for oligocapture-based ribodepletion using the RiboMinus™ Magnetic Beads, Invitrogen® and a cocktail of custom biotinylated locked nucleic acid (LNA)-modified oligonucleotides. Probes directed against *Xanthomonas* rRNA (27 oligonucleotides targeting 23S, 16S and 5S subunits or rRNA) and 2 tRNA (Ile and Ala) of *Xcc* were previously described (Roux et al., 2015). New probes targeting *Arabidopsis* and *Brassica oleracea* rRNA (26 probes targeting 28S, 18S and 5S rRNA subunits) and some chloroplastic RNA (22 probes targeting *PsbA*, *RbcL*, Bo01051s70, Bo01051s80) were designed (**Table S3**) as described (Sallet et al., 2013). Oligocapture was performed following the manufacturer instructions as described (Sallet et al., 2013). After ethanol precipitation, residual oligonucleotides were removed with Turbo DNase (Ambion®, Invitrogen™). Quality of RNA samples and ribosomal and other-RNA depletion were analysed using a Fragment Analyzer-AATI (Advanced Analytical) on the GeT-PlaGe platform (Genotoul, Toulouse, France). RNAs were then separated into short (<200 nt) and long (>200 nt) RNA fractions using Zymo Research RNA Clean & Concentrator™-5 columns (Proteogene). Oriented sequencing was carried out on *in vitro*-grown *Xcc* by Fasteris SA (Geneva, Switzerland) as described (Sallet et al., 2013). For small RNA fraction, the Small RNA Sequencing Alternative v1.5 Protocol (Illumina) was used, starting with ca. 500 ng RNAs that were treated with tobacco acid pyrophosphatase to remove triphosphate at 5' transcript ends and purified on acrylamide gel before and after the adaptor ligation step. For large RNAs, a fragmentation step by zinc during 8 min was included after the Illumina procedure. The size of selected inserts was 20–120 nt for short RNA libraries and 50–120 nt for long RNA libraries. Libraries were sequenced either in single end (small RNA fraction) or in paired end (Large RNA fraction) on an Illumina HiSeq 2000 platform. Raw sequence data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) database (Accession SRP280320).

For samples prepared from infected tissues, oriented paired-end RNA sequencing was carried out on the GeT-PlaGe platform (Genotoul, Toulouse, France) using an Illumina HiSeq 3000 platform. Oriented RNA libraries were prepared with TrueSeq™ Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina®). Subsequent steps of sequencing were performed according to the

manufacturer instructions (RNA fragmentation, ADNc synthesis, 3' adenylation). During the fragmentation step, the RNA were cut in fragments of 120 to 210 bases. Raw sequence data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) database (Accession SRP280329).

Reannotation of *Xcc* strain 8004 genome sequence

Annotation of *X. campestris* pv. *campestris* strain 8004 genome was performed using EuGene-PP (Sallet *et al.*, 2013; EuGene-PP v1.0, eugene-4.1c) with SRP280320 RNA libraries and *X. campestris* pv. *campestris* strains 8004, ATCC33913 and B100 public annotations GCA_000012105.1, GCA_000007145.1 and GCA_000070605.1, respectively. This new annotation is available at <https://dx.doi.org/10.25794/reference/id52ofys>.

Analysis of RNA sequencing results and statistical analysis

Mapping of RNA sequencing reads was performed on *Xcc* strain 8004 genome sequence (Qian *et al.*, 2005, Genbank accession number CP000050.1) which was reannotated and when appropriate on sequences of *Brassica oleracea* nuclear genome (Brassica_oleracea.v2.1.31; Accession GCA_000695525.1), *Brassica oleracea* mitochondrial genome (accession NC_016118.1) and *Brassica rapa* chloroplastic genome (BRARA_CHL, accession NC_040849.1). Parameters used were the following: matches allow no gap, a minimum length of 40 nucleotides for single-end mRNA libraries and no more than one mismatch, a minimum length of 18 nucleotides for single-end smallRNA libraries and no mismatch and a minimum length of 60 nucleotides for single-end mRNA libraries with a maximum of 5 mismatches. We kept only the best alignments for each read or pair of reads. Reads mapping at two different positions with the same best scores were not considered.

Differentially expressed genes were detected with EdgeR Bioconductor package version 3.30.3 (Robinson *et al.*, 2010). Genes with no counts across all libraries were discarded prior to further analysis. Normalization was performed using TMM (trimmed mean of M-values) method (Robinson and Oshlack, 2010). Quality control plots of normalized data sets and reproducibility of biological repeats (**Figure S2**) were generated by principal component analysis using Ade4 version 1.7-15 package (Dray, 2007) and heatmaps obtained with the

package pheatmap version 1.0.12 (Raivo Kolde (2015). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.8. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>) on sample to sample Euclidean distances. Fitted generalized linear models (GLM) with a design matrix Multiple factor (biological repetition and factor of interest) were designed for further analyses. The Cox-Reid profile-adjusted likelihood (CR) method in estimating dispersions was then used. Differentially expressed genes (DEG) were called using the generalized linear model (GLM) likelihood ratio test using a False Discovery Rate (FDR; Benjamini and Yekutieli, 2001) adjusted q -value < 0.05. Clustering on filtered DEG (q -value < 0.05 in at least on biological condition) was generated with heatmap.2 function as available in the gplots Bioconductor package version 3.0.1. (Warnes et al., 2016). gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.0.1. (<https://CRAN.Rproject.org/package=gplots>) using Ward's minimum variance clustering method on Euclidean. Enrichment analysis considering gene ontology was then conducted using the topGO package version 2.40.0 (Alexa et al., 2006).

Infection of hydathodes and measurement of bacterial population

For hydathode infection, the second true leaf of cauliflower plants was dip-inoculated in a bacterial suspension at 10^8 cfu/mL in 1mM MgCl₂ containing 0.5% (v/v) Tween 80. In order to determine *Xcc* populations in single hydathodes, hydathodes were collected at 3 or 6 days post-inoculation by macrodissection with a 1.5 mm-diameter punch. 8 hydathodes were sampled per leaf and individually placed in 200 μ L of 1mM MgCl₂. After bead-assisted grinding at 30 Hz for 2 min using a Retsch MM400 grinder, 5- μ L droplets of serial dilutions were spotted on MOKA 30 μ g/mL pimarcin plates in three technical replicates and incubated at 28°C for two to three days. Individual colonies were then counted and the mean of the three technical replicates was calculated to estimate the infection level of each hydathode. Experiments were performed on three plants per condition and in three independent biological replicates. Significance of differences observed in bacterial population quantifications and bacterial pathogenicity assays was assessed using the non-parametric Kruskal-Wallis test with $\alpha = 0.05$.

Results

Improved annotation of *Xcc* strain 8004 genome based on a large transcriptomic dataset

Transcriptomic analyses are intrinsically dependent on the proper structural annotation of genes. In order to improve annotation of *Xcc* strain 8004 using experimental expression data, we produced the transcriptome of two nearly isogenic strains grown in MOKA medium: wild type 8004 and strain 8004::*hrpG** which expresses the constitutive active variant E44K of HrpG (Guy et al., 2013; see later for comparative analysis of the HrpG regulon). Total RNAs were extracted from exponentially growing bacteria and subjected to ribodepletion using a custom oligonucleotide set optimized to bind *Xanthomonas* ribosomal RNAs (Roux et al., 2015). At this step, RNAs were separated based on their size with a cutoff of ca. 200 bases. While the large RNA fractions were subjected to single end strand-specific sequencing, the smaller RNAs protected with a 5' triphosphate group in the small fraction were subjected to paired end strand-specific sequencing in order to map precisely transcriptional start sites and distinguish small RNAs from degradation products of larger RNA molecules. Those 12 libraries (Two genotypes, two RNA fractions, three biological replicates) were used to refine the annotation of the genome. More than 1724 transcriptional starts (5' UTRs) and 1246 3' UTRs could be experimentally defined (**Table 1**). In particular, determination of 5' UTRs modified predicted translational start site for 1164 CDS. Additionally, 753 small ncRNAs were evidenced. These results highlight the importance of experimentally-supported genome annotations and offer improved resources for the genetic characterization of *Xcc* and the functional analysis of its transcriptome.

Xcc transcriptome remodeling at early stages of hydathode infection:

To obtain a proxy of the physiological status of *Xcc* at the early step of plant leaf infection, we performed RNA sequencing on bacteria re-isolated from cauliflower hydathodes 72 hours after a rapid dip inoculation of an attached leaf. This 72 hpi timepoint corresponds to a biotrophic phase of the infection where bacteria are still limited to the epithem apoplastic spaces and where the epithem does not present detectable cellular alterations (Cerutti et al., 2017). For any transcriptomic analysis, the choice of the reference condition is most critical. Here, we determined that after 4 hours of continuous immersion of a detached leaf in the

bacterial suspension, ca. 10^5 cfu per hydathode are detected, similarly to the bacterial titers measured at 72 hpi (**Figure S1**). Thus, the 4 hpi and 72 hpi conditions allow the narrow comparison of two bacterial populations both in contact with the epithem tissue for 4 and 72 hours, respectively. Other observations suggest the relevance of the 4 hpi timepoint as a reference *in planta* condition: comparison of *in vitro* (MOKA rich medium) and *in planta* (4 and 72 hpi) RNAseq results for wild-type *Xcc* strain 8004 using Euclidean distance calculations shows that the RNAseq samples obtained from hydathodes at 4 hpi cluster with the 72 hpi samples rather than those obtained in MOKA (**Figure S2**). Also, the expression of 14 genes belonging to the HrpG regulon was already induced at 4 hpi (**Figure 1, Table S4**) indicating that bacterial cells extracted in this condition were in contact with plant tissue. Finally, among the 1,356 differentially-expressed genes (DEGs) between the 72 hpi and MOKA conditions (**Table S4**), 711 were already differentially expressed at 4 hpi compared to MOKA. These results suggest that the transcriptomic impact of inoculum preparation (from MOKA to 1mM $MgCl_2$) can be masked by the choice of the 4 hpi timepoint in order to focus the analysis solely on bacterial adaptation to the plant environment.

Our *in planta* analysis revealed that during the first days of hydathodes colonization, *Xcc* massively reshaped its transcriptome (**Figure 1, Table S4, Table S5**). Indeed, 18 % of *Xcc* CDS undergo a transcriptional reprogramming during hydathode infection with 828 DEGs after 72 hpi in comparison to 4 hpi. We observe that 18 Biological Processes, such as catabolism, stress response and transport, were enriched in up-regulated genes. On the other hand, 13 GO-terms were found enriched among down regulated genes, with a strong over-representation of motility and chemotaxis categories (**Table 2**).

***Xcc* adopts a sedentary lifestyle inside hydathodes**

Most genes involved in flagellar biosynthesis, type IV pilus biosynthesis and chemotaxis are strongly repressed 72 hpi when bacteria are localized into hydathodes. Motility and chemotaxis are key components of pathogenicity, especially for plant pathogens (Matilla and Krell, 2018). However, some previous studies have shown that *Xcc* could be an exception. Indeed, *Xcc* seems to not be flagellated when grown in xylem fluids and that the motile form of *Xcc* cells seems to be less efficient in disease development on cauliflower and radish (Kamoun and Kado, 1990). These observations suggest a probable fitness cost of motility apparatus

production during infection. To investigate the importance of motility in disease development, we have constructed deletion mutants in key genes for either type IV pilus synthesis ($\Delta pilE$ and $\Delta pilA$) or for flagellar synthesis ($\DeltafliC$, $\DeltafliQ$). Different combinations of these mutants were tested for *in vitro* motility (**Figure S3**), pathogenicity (**Figure S4**) and hydathode colonization (**Figure 2**). As expected, no strong effect of these mutations was observed neither on disease symptoms development nor on hydathode colonization. These results, together with the heavy repression observed in hydathodes, strongly suggest that motility is a process that could be detrimental for the bacterium during plant tissue colonization.

The *hrpG* regulon is activated and required at early steps of infection

Data mining also showed that the expression of the *hrpG* gene, as well as the T3SS components and T3E, are induced during hydathodes infection. This observation prompted us to (i) confirm that *hrpG* is important for hydathodes infection and (ii) precisely identify the set of genes controlled by *hrpG*. We constructed the 8004 $\Delta hrpG$ mutant and show that it presents a reduced multiplication in hydathodes (**Figure 2**) and is avirulent on cauliflower after wound inoculation (**Figure S4**). Both phenotypes are complemented by inserting an *hrpG* overexpression construct in 8004 $\Delta hrpG$ chromosome. On the other hand, the *hrpG** gain-of-function mutation did not affect the multiplication of *Xcc* in cauliflower hydathodes (**Figure 2**) nor its pathogenicity after wound inoculation as compared to the wild-type strain. This suggests that HrpG functionality *in planta* is retained and that *in vitro* studies with this mutant are legitimate. We also confirm the observation made in the close relative *Xanthomonas euvesicatoria* (Noël et al., 2001) that the 8004::*hrpG** strain presents a reduced extracellular activity on milk plates (**Figure S5**).

To identify the set of genes under the control of HrpG in *Xcc*, we explored the transcriptome of the 8004::*hrpG** and 8004 strains. The newly annotated genome was used to map reads obtained from both strains after growth in MOKA rich medium (**Table S6**). Analysis of the HrpG regulon identified 95 differentially expressed genes (DEGs, $\text{Log}_2(\text{fold change}) \geq 2$ or ≤ -2 , FDR adjusted *p*-value < 0.05) distributed across the genome or grouped within the 23-kb *hrp* gene cluster (25 DEGs out of 95, **Table S4**). To objectively investigate the cellular processes affected in our subset of DEGs, we performed a Gene Ontology (GO-term) enrichment test. Among the 85 genes with an increased expression in strain 8004::*hrpG**, 43

possess a predicted PIP box in their promoter region (**Table S4**). The PIP box is a cis-DNA motif allowing the induction of gene expression by the HrpX transcriptional regulator which is under direct positive regulation by HrpG (Koebnik et al., 2006). As expected, 43 of the 95 DEGs correspond to genes involved in T3SS and T3Es, underlying the enrichment in the secretion GO term among genes upregulated in *hrpG** background (**Table 3, Table S5**). From the 30 T3Es encoded by *Xcc* 8004, only 18 were significantly induced in the 8004::*hrpG** strain. Of the other 56 DEGs, 26 encode proteins with unknown function and 19 enzymes, many of which are predicted to degrade proteins or carbohydrates. Interestingly, most genes belonging to this HrpG regulon are similarly regulated into hydathodes after 72 hpi (**Figure 1**). Among the 95 genes belonging to the HrpG regulon, 25 (out of 25) and 24 (out of 30) genes coding for the T3S system and T3E proteins, respectively, were induced at 72 hpi (**Table S4 and S5**), meaning that HrpG is activated at this early stage of infection. As mentioned previously, it is also worth noting that 14 genes are over-expressed in hydathodes at 4 hpi in comparison to the MOKA condition, thus hinting at the rapid adaptive response deployed by *Xcc* at the first encounter with host tissues. These results indicate that, though essential for pathogenicity, the HrpG regulon involves a very limited number of genes (95 out of 6162) which represents a very partial view of *Xcc* transcriptomic adaptations to “*in planta*” conditions.

Metabolic adaptations of *Xcc* inside hydathodes highlight some nutritional properties of the plant environment

Among the 31 GO terms significantly affected at transcriptomic level a third are involved in metabolism, indicating that *Xcc* undergoes an important metabolic adaptation inside the hydathode.

- Modification of the expression profile of genes encoding plant cell wall degrading enzymes

Regarding sugar catabolism, we observe an increase in the transcription of genes involved in the catabolism of cellulose, a major compound of plant primary cell wall. Yet, increased expression of other plant cell wall degrading enzymes genes is not observed at 72 hpi, consistently with the absence of visible degradation of cell walls in the epithem (Cerutti et al., 2017). Among the 43 genes encoding degradative enzymes in *Xcc* strain 8004 (da Silva et al.,

2002), 10 have an increased and 10 have a reduced expression at 72 hpi, respectively (**Table S5**). Expression of either *xps* or *xcs* genes encoding type II secretion systems involved in secretion of those enzymes is not induced at 72 hpi suggestive of a biotrophic lifestyle for at least three days post infection.

Lignin is another major component of plant cell walls and a source of aromatic compounds. Interestingly, the expression of *XC_3426* and *XC_3427* genes coding for protocatechuate (PCA) 4;5-dioxygenase subunits is increased 6- and 8-fold at 72 hpi, respectively. PCA is a lignin degradation product (Brown et al., 2004) which can be further catabolized by PCA dioxygenases to enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Wang et al., 2015c). While *XC_3426* and *XC_3427* relevance for pathogenicity remains unknown, *XC_0375* to *XC_0383* genes cluster encoding 3- and 4-hydroxybenzoate degrading enzymes are needed for full virulence of *Xcc* in radish (Wang et al., 2015c) suggesting that degradation plant phenolic compounds is a key issue inside plant tissues.

- Expression of transporter genes is deeply remodeled *in planta*

Broad expression changes can be observed in transporter genes since 49 out of 210 genes involved in transport are differentially expressed at 72 hpi (Table A, Table SE). Those transporters belong to MFS, ABC and TonB dependent Transporters (TBDT) families. TBDTs have been shown to be involved in iron and carbohydrates polymers uptake with high affinity in *Xcc* (Blanvillain et al., 2007; Boulanger et al., 2010; Déjean et al., 2013). 14 out of 48 TBDT genes are differentially expressed: 7 show an increased expression at 72 hpi and 7 with a decreased activity. Among those, some have no clear known function, but the ones identified to be induced by polygalacturonate (PGA) (Blanvillain et al., 2007) are all repressed into hydathodes (**Table S5**). The two TBDT genes *XC_3205* and *XC_2512* known to be positively regulated by HrpG and HrpX (Blanvillain et al., 2007) are also induced at 72 hpi.

Interestingly, the absence of the *fur* regulon and its iron high affinity TBDT transporters (*XC_0167*, *XC_3463*, *XC_2846*, *XC_1341*, *XC_1108*, *XC_0924-0925*, *XC_0642*, *XC_4249*, *XC_0558* and *XC_4249*) in our dataset indicates that iron might not be limiting at this stage of the infection of the hydathodes.

418

- 419 • Upregulation of two pathways important for sulfur assimilation in hydathodes

420 In contrast to iron, induction of genes important for sulfur transport and assimilation is observed
421 at 72hpi in hydathodes: the operon encoding the ABC sulfate transporter CysPUWA (XC_3292
422 to XC_3295) and the operon encoding an assimilatory sulfate reduction pathway leading to
423 sulfide production (XC_0990 to XC_0994) are induced by ca. 6- and 20-fold, respectively
424 (**Table S5**). Sulfide is then used for cysteine and methionine biosynthesis. Sulfur metabolism
425 including sulfur-containing amino acids, sulfur compounds, or sulfate have been shown to be
426 involved in different virulence factor production, as in xanthan production (García-Ochoa et
427 al., 2000) or T3SS induction (Schulte and Bonas, 1992). Yet, a deletion of the entire *cysPUWA*
428 operon (Δ XC_3292-95) in *Xcc* strain 8004 did not significantly affect bacterial multiplication
429 in neither hydathodes after dip-inoculation nor disease symptoms development after wound
430 inoculation in cauliflower (**Figure 2, Figure S4**). Thus, sulfate import through the CysPUWA
431 system is not required, indicating that either sulfur is not limiting for bacterial growth in
432 hydathodes or that sulfur might be acquired through other import pathways such as the taurine
433 import system. For instance, *E. coli* responds to sulfate or cysteine starvation by expressing the
434 *ssuABCDE* and *tauABCD* operons which are involved in the uptake of alkanesulfonate and
435 desulfonation of the organosulfonates and for the uptake and desulfonation of taurine,
436 respectively. While *ssuABCDE* can be found in other *Xanthomonas* such as *Xanthomonas citri*
437 (Pereira et al., 2015), it is absent in *Xcc* strain 8004. TauABCD homologues are encoded by
438 genes of the locus XC_3454 to XC_3460 (**Figure S6**) with XC_3454, XC_3459 and XC_3456
439 being highly similar to *E. coli* TauB, TauC and a predicted taurine dioxygenase, respectively.
440 Interestingly, expression of these genes (locus XC_3454 to XC_3460) is increased at 72 hpi
441 suggesting a possible implication of this pathway in sulfur assimilation *in planta*.

442

- 443 • Phosphate uptake machinery is rate limiting for *Xcc* multiplication inside hydathodes

444 Increased expression of the genes encoding the PstSCAB high-affinity transporter system
445 (genes XC_2708 to XC_2711, **Table S4**) involved in active inorganic phosphate (Pi) import
446 upon phosphate starvation suggests that Pi might be limiting inside hydathodes. This system is
447 known to be activated in various conditions in bacteria (Lamarche et al., 2008), including during

plant colonization (Pegos et al., 2014; Moreira et al., 2015). For instance, phosphate uptake by *Xanthomonas citri* is essential for pathogenicity on citrus. In order to test if phosphate acquisition upon phosphate starvation is important for *Xcc* strain 8004 during hydathode colonization, we have deleted *XC_2711* (*pstB*) and *XC_3272* (which encodes an homologue of the PhoB response regulator of Pi starvation response in *E. coli*; [Yang et al., 2012](#); [Gardner and McCleary, 2019](#)). Results obtained demonstrated that *pstB*, unlike *phoB*, is important for hydathode colonization (**Figure 2**) and that both Δ *pstB* and Δ *phoB* mutants were not affected in symptoms development by direct inoculation into xylem vessels (**Figure S4**). These results demonstrate that Pi might be limiting for the growth during early infection stages but not for the pathogenicity into xylem vessels. Similar to Pi, expression of genes important for nitrogen assimilation such as those involved in uptake of nitrite and nitrate and their reduction to ammonia (*XC_2175* to *XC_2178*) are induced at 72 hpi in hydathodes, further stressing the importance of *Xcc* mineral nutritional needs *in planta*.

Limited stress responses *in planta* suggests a rapid adaptation of *Xcc* to the plant environment

Surprisingly, there are few transcriptional changes for genes associated with transcription, translation, replication, TCA cycle or amino acid biosynthesis between 4 and 72 hpi. However, these functions are already strongly repressed comparing 4 hpi with MOKA conditions meaning that adaptation to the plant environment requires a rapid slowdown in cellular division and core-metabolism. Other stress-responsive genes have their expression induced *in planta* such as base excision repair and nucleotide excision repair systems, trehalose production pathways, superoxide dismutases and chaperone proteins. In addition, expression of the ABC transporter system *OpuB-ABC* (*XC_0173* to *XC_0174*; [Hoffmann et al., 2018](#)) and the choline degradation pathway (*XC_0760* to *XC_0761*; [Wargo, 2013](#)), both involved in osmoprotection, are induced 72 hpi suggesting that bacteria face an osmotic shock in the apoplast of the epithem cells (**Figure 3, Table S4**). Finally, expression of some genes of the *gum* operon (*XC_1658* to *XC_1673*) implicated in the production of the xanthan exopolysaccharides (EPS) are induced by 4- to 5-fold at 72 hpi. Xanthan is a well-known protectant against environmental stresses and toxic compounds and a suppressor of plant immunity (Kakkar et al., 2015). All together these data seem to indicate that *Xcc* cells face nutritional, osmotic and environmental stresses in hydathodes,

Discussion

Xcc life cycle depends on *Xcc* adaptation to various plant environments (e.g. seeds, leaf surface, hydathodes, xylem, mesophyll, debris). This work provides the first analysis of transcriptional changes that *Xcc* undergoes upon plant infection and hydathode colonization, including the regulation of various metabolic and virulence pathways (**Figure 3**), and informs about the environmental conditions faced by *Xcc* inside hydathodes.

Xcc adopts a sedentary biotrophic lifestyle inside hydathodes

Xcc is known to be a necrotroph causing black rot disease. However, the physiological snapshot obtained by RNAseq at 72 hpi in hydathodes suggests that *Xcc* rather behaves as a biotroph since the epithem is intact (Cerutti et al., 2017) and many genes coding for degradative enzymes, T2SS and most catabolic pathways of sugar polymers and carbohydrates were expressed at basal levels. We also observed that the constitutive activation of the HrpG regulon recapitulating part of the *in planta* condition at 72 hpi is associated with the repression of protease genes expression and a reduced extracellular protease activity. Carbon and nitrogen needs of *Xcc* could be supported *in planta* by the continuous xylem sap flow in the epithem and/or by the energy stored during bacterial growth into rich medium prior to plant inoculation. Furthermore, the expression of multiple virulence-associated genes such as those involved in quorum sensing, iron uptake or motility was also reduced at 72 hpi in hydathodes. Motility has been shown to be an essential virulence trait for many bacterial pathogens (Chaban et al., 2015). Yet, *Xcc* motility mutants $\Delta fliC$ and $\Delta flic\text{-}\Delta pliA\text{-}\Delta pliE$ were not affected in pathogenicity which could be expected considering that, inside hydathodes, *Xcc* strongly repressed the expression of over 84 (out of 94) genes important for chemotaxis, twitching (Type 4 pilus) and swimming (flagellum) motility. Repression of chemotaxis and motility has also been reported at early rice infection stages in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*; Liao et al., 2019) while twitching motility and quorum sensing were both activated at later infection stages and important for virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*; Lee et al., 2017) and *Xac* (Li et al., 2019). Interestingly, an increase in the expression of genes important for twitching motility and adhesion was observed in *Xcc* grown *in vitro* in xylem sap (Dugé de Bernonville et al., 2014).

Xylem sap corresponds to the environment met by *Xcc* immediately after leaving the hydathode. These observations suggest a possible biphasic infectious process with the reactivation of the motility and other virulence-associated genes at late infection stages. Further transcriptomic analyses of virulence gene expression throughout the entire infectious cycles would be needed to support such an hemibiotrophic lifecycle of *Xcc* or other *Xanthomonas* species.

Stealthiness of *Xcc* inside hydathodes and neutralization of plant immune responses

The observed repression of chemotaxis, twitching and swimming motility also suggests that those functions are dispensable once inside hydathodes or even detrimental to successfully settle *in planta*. For instance, production of bacterial peptide flg22 from the flagellar FliC protein is a well-known PAMP (pathogen-associated molecular pattern) recognized by the FLS2 receptor and a potent elicitor of basal plant immunity which restricts pathogen growth *in planta* (Gómez-Gómez and Boller, 2000). While flg22₈₀₀₄ peptide is not recognized by Arabidopsis FLS2 (Sun et al., 2006; Guy et al., 2013b), we cannot exclude that other FliC peptides, flagellar proteins or pili proteins from *Xcc* strain 8004 could act as PAMPs in Brassicaceae. In the absence of an *Xcc* strain constitutively expressing those genes, we were not able to test such hypotheses. *Xcc* stealthiness could also be acquired by limiting bacterial multiplication until an efficient suppression of immunity has been achieved. Such suppression could be mediated by the T3E proteins whose expression depends on the HrpG regulator. In contrast to a wild-type *Xcc* strain, a T3S system mutant caused hydathode browning and necrosis at 48 hpi and had a reduced multiplication at 72 hpi (Cerutti et al., 2017). These results indicate that hydathode immune responses can be effective against bacterial pathogens and that their suppression by *Xcc* T3S system and its T3E proteins is required for successful infection. It would thus be most interesting to refine our observations by finely monitoring plant immune responses throughout the infection.

Inference of environmental conditions inside hydathodes based on *Xcc* transcriptomic behaviour

Compared to *in vitro*-grown *Xcc*, transcriptomic changes are already observed as early as 4 hpi with the increased expression of 14 genes belonging to HrpG regulon (**Table S4**). These genes could participate in the transition from *in vitro* to *in planta* growth such as gene *XC_2566* coding for an extracellular function (ECF) sigma factor which importance for this transcriptional switch should be tested. Those transcriptomic signatures can also be used to infer the metabolic and physiological status of *Xcc* inside hydathodes and the nutritional properties of the epithem. For instance, the epithem environment, in which *Xcc* proliferates, is likely not limiting for assimilable iron since the corresponding uptake machinery is not expressed. In contrast, both the low-affinity phosphate inorganic transport (Pit) and the high-affinity phosphate-specific transport (Pst) systems, known to be important for the uptake of inorganic phosphate (Pi) in *Xanthomonas*, are upregulated at 72 hpi (Willsky and Malamy, 1980; Moreira et al., 2015). Similar to *Xac* (Moreira et al., 2015), the Pst system is needed for *in planta* growth of *Xcc*. These results demonstrate that *Xcc* not only faces Pi starvation inside hydathodes but that Pi availability also limits *Xcc* proliferation in this tissue. Very low Pi concentrations are indeed found in guttation fluids of several plant species such as barley (Nagai et al., 2013) and are correlated with expression of genes coding for plant high affinity Pi transporters such as *AtPHT1;4* in hydathodes even under Pi sufficient conditions (Misson et al., 2004). These observations suggest that an active competition between the plant and *Xcc* for access to Pi might occur in the epithem. Similar to Pi, *Xcc* transcriptome at 72 hpi also suggests that sulfur and nitrogen are present in low amounts requiring the upregulation of dedicated uptake systems. Yet, it remains unclear whether these elements are limiting for growth of *Xcc* inside hydathodes. Exposure to stresses is also unveiled by the transcriptomic upregulation of many genes involved in responses to general stress (e.g. *gum* genes) and especially osmotic stress. However, it remains uncertain whether this potential osmotic stress is intrinsic of the epithemal environment or whether it is caused by active plant immune responses. For instance, we could not evidence significant signs of oxidative stresses classically associated with strong plant immune responses. Therefore, *Xcc* seems to adapt rapidly to the low concentrations of nutrients found in the epithem and to endure limited stress maybe due to the continuous flow of fluids inside hydathodes which renews nutrient supplies and dilutes potential antibacterial compounds.

Perspectives

While informative, such global transcriptomic studies provide an averaged picture of the population, ignoring the spatial and temporal differences occurring *in planta* between attached vs. planctonic cells or between cells which entered hydathodes early vs. late after inoculation. The phenotypic heterogeneity often observed in bacterial pathogens is therefore ignored here (Weigel and Dersch, 2018). To answer this limitation, single cell transcriptomic protocols are becoming available (Shi et al., 2015; Wang et al., 2015b; Chen et al., 2017; Ma et al., 2019) but their use to describe the transcriptomes of *in planta*-grown bacteria still remains highly challenging.

Acknowledgments

AC and JL were funded by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. BR, AC and LDN were funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche XANTHOMIX (ANR-2010-GENM-013-02), Xopaque (ANR-10-JCJC-1703-01) and NEPHRON (ANR-18-CE20-0020-01). We are grateful to Stéphanie Bolot for management and early analysis of the Xanthomix dataset. JL, EL, AB and LDN were funded by the XBOX (ANR-19-CE20-JCJC-0014-01) project. The Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes is part of the French Laboratory of Excellence project (TULIP ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). All authors benefited from the COST action CA16107 EuroXanth.

References

- Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T** (2006) Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* **22**: 1600–1607
- Alkhateeb RS, Vorhölter F-J, Rückert C, Mentz A, Wibberg D, Hublik G, Niehaus K, Pühler A** (2016) Genome wide transcription start sites analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 with insights into the gum gene cluster directing the biosynthesis of the exopolysaccharide xanthan. *Journal of Biotechnology* **225**: 18–28
- An S-Q, Allan JH, McCarthy Y, Febrer M, Dow JM, Ryan RP** (2014) The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* **92**: 586–597
- Benjamini Y, Yekutieli D** (2001) The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics* **29**: 1165–1188
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M** (2007) Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLOS ONE* **2**: e224
- Boulanger A, Déjean G, Lautier M, Glories M, Zischek C, Arlat M, Lauber E** (2010) Identification and Regulation of the N-Acetylglucosamine Utilization Pathway of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **192**: 1487–1497
- Brown CK, Vetting MW, Earhart CA, Ohlendorf DH** (2004) Biophysical Analyses of Designed and Selected Mutants of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase. *Annual Review of Microbiology* **58**: 555–585
- Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noël LD** (2017) Immunity at cauliflower hydathodes controls infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiol* pp.01852.2016
- Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 91–116
- Chaban B, Hughes HV, Beeby M** (2015) The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **46**: 91–103
- Chen X, Sun C, Laborda P, Zhao Y, Palmer I, Fu ZQ, Qiu J, Liu F** (2018) Melatonin Treatment Inhibits the Growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.02280
- Chen Z, Chen L, Zhang W** (2017) Tools for Genomic and Transcriptomic Analysis of Microbes at Single-Cell Level. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01831
- Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyc MK, Byrde RJW, Fielding AH** (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal* **3**: 3323–3328
- Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M-A** (2009) Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *MPMI* **22**: 747–757

630 **Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S,**
 631 **Jamet S, Zischek C, Lautier M, et al** (2013) The xylan utilization system of the plant pathogen
 632 *Xanthomonas campestris* pv *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with
 633 oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytol* **198**: 899–915

634 **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR** (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative
 635 bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *PNAS* **77**: 7347–7351

636 **Dray S, Dufour A-B** (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of*
 637 *Statistical Software* **20**

638 **Dugé de Bernonville T, Noël LD, SanCristobal M, Danoun S, Becker A, Soreau P, Arlat M, Lauber E** (2014)
 639 Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas*
 640 *campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. *FEMS Microbiol Ecol* **89**: 527–541

641 **Dutta B, Gitaitis R, Sanders H, Booth C, Smith S, Langston DB** (2014) Role of Blossom Colonization in Pepper
 642 Seed Infestation by *Xanthomonas euvesicatoria*. *Phytopathology*® **104**: 232–239

643 **Figurski DH, Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a
 644 plasmid function provided in trans. *PNAS* **76**: 1648–1652

645 **García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E** (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties.
 646 *Biotechnology Advances* **18**: 549–579

647 **Gardner S, McCleary W** (2019) Control of the *phoBR* Regulon in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. doi:
 648 10.1128/ecosalplus.esp-0006-2019

649 **Gétaz M, Puławska J, Smits THM, Pothier JF** (2020) Host–Pathogen Interactions between *Xanthomonas*
 650 *fragariae* and Its Host *Fragaria × ananassa* Investigated with a Dual RNA-Seq Analysis. *Microorganisms*
 651 **8**: 1253

652 **Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison Iii CA, Smith HO** (2009) Enzymatic assembly of
 653 DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**: 343–345

654 **Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: An LRR Receptor–like Kinase Involved in the Perception of the
 655 Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011

656 **Guy E, Genissel A, Hajri A, Chabannes M, David P, Carrere S, Lautier M, Roux B, Boureau T, Arlat M, et**
 657 **al** (2013a) Natural Genetic Variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pathogenicity on
 658 *Arabidopsis* Revealed by Association and Reverse Genetics. *mBio* **4**: e00538-12

659 **Guy E, Lautier M, Chabannes M, Roux B, Lauber E, Arlat M, Noël LD** (2013b) xopAC-triggered Immunity
 660 against *Xanthomonas* Depends on *Arabidopsis* Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes PBL2 and
 661 RIPK. *PLOS ONE* **8**: e73469

662 **Hoffmann T, Warmbold B, Smits SHJ, Tschapek B, Ronzheimer S, Bashir A, Chen C, Rolbetzki A,**
 663 **Pittelkow M, Jebbar M, et al** (2018) Arsenobetaine: an ecophysiological important organoarsenical
 664 confers cytoprotection against osmotic stress and growth temperature extremes. *Environmental*
 665 *Microbiology* **20**: 305–323

666 **Jalan N, Kumar D, Andrade MO, Yu F, Jones JB, Graham JH, White FF, Setubal JC, Wang N** (2013)
 667 Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide
 668 insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *BMC Genomics* **14**: 551

669 **Kakkar A, Nizampatnam NR, Kondreddy A, Pradhan BB, Chatterjee S** (2015) *Xanthomonas campestris* cell-
670 cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed
671 by the exopolysaccharide xanthan. *J Exp Bot* **66**: 6697–6714

672 **Kamoun S, Kado CI** (1990) Phenotypic Switching Affecting Chemotaxis, Xanthan Production, and Virulence in
673 *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3855–3860

674 **Kim S, Cho Y-J, Song E-S, Lee SH, Kim J-G, Kang L-W** (2016) Time-resolved pathogenic gene expression
675 analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *BMC Genomics* **17**: 345

676 **Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U** (2006) Specific Binding of the *Xanthomonas campestris*
677 pv. *vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes. *J*
678 *Bacteriol* **188**: 7652–7660

679 **Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J** (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a
680 regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 461–
681 473

682 **Lee SE, Gupta R, Jayaramaiah RH, Lee SH, Wang Y, Park S-R, Kim ST** (2017) Global Transcriptome
683 Profiling of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under in planta Growth and in vitro Culture Conditions.
684 *Plant Pathol J* **33**: 458–466

685 **Leong SA, Ditta GS, Helinski DR** (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding
686 for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* **257**: 8724–8730

687 **Li L, Li J, Zhang Y, Wang N** (2019) Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates
688 expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. *BMC*
689 *Genomics* **20**: 55

690 **Liao C-T, Liu Y-F, Chiang Y-C, Lo H-H, Du S-C, Hsu P-C, Hsiao Y-M** (2016) Functional characterization
691 and transcriptome analysis reveal multiple roles for *prc* in the pathogenicity of the black rot pathogen
692 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Research in Microbiology* **167**: 299–312

693 **Liao Z-X, Ni Z, Wei X-L, Chen L, Li J-Y, Yu Y-H, Jiang W, Jiang B-L, He Y-Q, Huang S** (2019) Dual RNA-
694 seq of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* infecting rice reveals novel insights into bacterial-plant
695 interaction. *PLOS ONE* **14**: e0215039

696 **Liu W, Yu Y-H, Cao S-Y, Niu X-N, Jiang W, Liu G-F, Jiang B-L, Tang D-J, Lu G-T, He Y-Q, et al** (2013)
697 Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX
698 and rich medium NYG. *Research in Microbiology* **164**: 466–479

699 **Ma Q, Bücking H, Gonzalez Hernandez JL, Subramanian S** (2019) Single-Cell RNA Sequencing of Plant-
700 Associated Bacterial Communities. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2019.02452

701 **Matilla MA, Krell T** (2018) The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS*
702 *Microbiol Rev*. doi: 10.1093/femsre/fux052

703 **Misson J, Thibaud M-C, Bechtold N, Raghothama K, Nussaume L** (2004) Transcriptional regulation and
704 functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate
705 uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol Biol* **55**: 727–741

706 **Moreira LM, Facincani AP, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, Gozzo FC, de Oliveira JCF, Ferro JA,**
707 **Soares MR** (2015) Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies
708 during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. *Funct Integr Genomics* **15**: 197–210

709 **Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S-I,**
710 **Sakamoto W, Shimmen T, et al** (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to
711 tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1826–1837

712 **Nobori T, Velásquez AC, Wu J, Kvitko BH, Kremer JM, Wang Y, He SY, Tsuda K** (2018) Transcriptome
713 landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *PNAS* **115**: E3055–E3064

714 **Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U** (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon
715 in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology* **41**: 1271–1281

716 **Noh T-H, Song E-S, Kim H-I, Kang M-H, Park Y-J** (2016) Transcriptome-Based Identification of Differently
717 Expressed Genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Exhibiting Different Virulence in Rice
718 Varieties. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 259

719 **Pegos VR, Nascimento JF, Sobreira TJP, Pauletti BA, Paes-Leme A, Balan A** (2014) Phosphate regulated
720 proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. *Journal of Proteomics* **108**: 78–88

721 **Pereira CT, Moutran A, Fessel M, Balan A** (2015) The sulfur/sulfonates transport systems in *Xanthomonas citri*
722 pv. *citri*. *BMC Genomics* **16**: 524

723 **Qian W, Han Z-J, Tao J, He C** (2008) Genome-Scale Mutagenesis and Phenotypic Characterization of Two-
724 Component Signal Transduction Systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913.
725 *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1128–1138

726 **Qian W, Jia Y, Ren S-X, He Y-Q, Feng J-X, Lu L-F, Sun Q, Ying G, Tang D-J, Tang H, et al** (2005)
727 Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas*
728 *campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**: 757–767

729 **Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression
730 analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140

731 **Robinson MD, Oshlack A** (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-
732 seq data. *Genome Biology* **11**: R25

733 **Roux B, Bolot S, Guy E, Denancé N, Lautier M, Jardinaud M-F, Fischer-Le Saux M, Portier P, Jacques M-
734 A, Gagnevin L, et al** (2015) Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge
735 the concept of core type III effectome. *BMC Genomics* **16**: 975

736 **Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas
737 P, Capela D, et al** (2013) Next-Generation Annotation of Prokaryotic Genomes with EuGene-P:
738 Application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res* **20**: 339–354

739 **Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A** (1994) Small mobilizable multi-purpose
740 cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions
741 in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73

742 **Schmidtke C, Findeiß S, Sharma CM, Kuhfuß J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U** (2012) Genome-
743 wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence
744 functions. *Nucleic Acids Res* **40**: 2020–2031

745 **Schulte R, Bonas U** (1992) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which
746 determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of*
747 *Bacteriology* **174**: 815–823

- Shi X, Gao W, Wang J, Chao S-H, Zhang W, Meldrum DR** (2015) Measuring gene expression in single bacterial cells: recent advances in methods and micro-devices. *Critical Reviews in Biotechnology* **35**: 448–460
- da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Sluys MAV, Almeida NF, Alves LMC, et al** (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF** (2006) Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and Its Impact on Elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2–Dependent Defenses. *The Plant Cell* **18**: 764–779
- Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* **14**: 2–18
- Wang J, Chen L, Chen Z, Zhang W** (2015a) RNA-seq based transcriptomic analysis of single bacterial cells. *Int Bio (Cam)* **7**: 1466–1476
- Wang J-Y, Zhou L, Chen B, Sun S, Zhang W, Li M, Tang H, Jiang B-L, Tang J-L, He Y-W** (2015b) A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Scientific Reports* **5**: 18456
- Wargo MJ** (2013) Homeostasis and Catabolism of Choline and Glycine Betaine: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2112–2120
- Weigel WA, Dersch P** (2018) Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes and Infection* **20**: 570–577
- Willsky GR, Malamy MH** (1980) Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **144**: 356–365
- Yang C, Huang T-W, Wen S-Y, Chang C-Y, Tsai S-F, Wu W-F, Chang C-H** (2012) Genome-Wide PhoB Binding and Gene Expression Profiles Reveal the Hierarchical Gene Regulatory Network of Phosphate Starvation in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **7**: e47314
- Zhang F, Du Z, Huang L, Cruz CV, Zhou Y, Li Z** (2013) Comparative Transcriptome Profiling Reveals Different Expression Patterns in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains with Putative Virulence-Relevant Genes. *PLOS ONE* **8**: e64267
- Zhang H-Y, Wei J-W, Qian W, Deng C-Y** (2020) Analysis of HrpG regulons and HrpG-interacting proteins by ChIP-seq and affinity proteomics in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant Pathology* **21**: 388–400

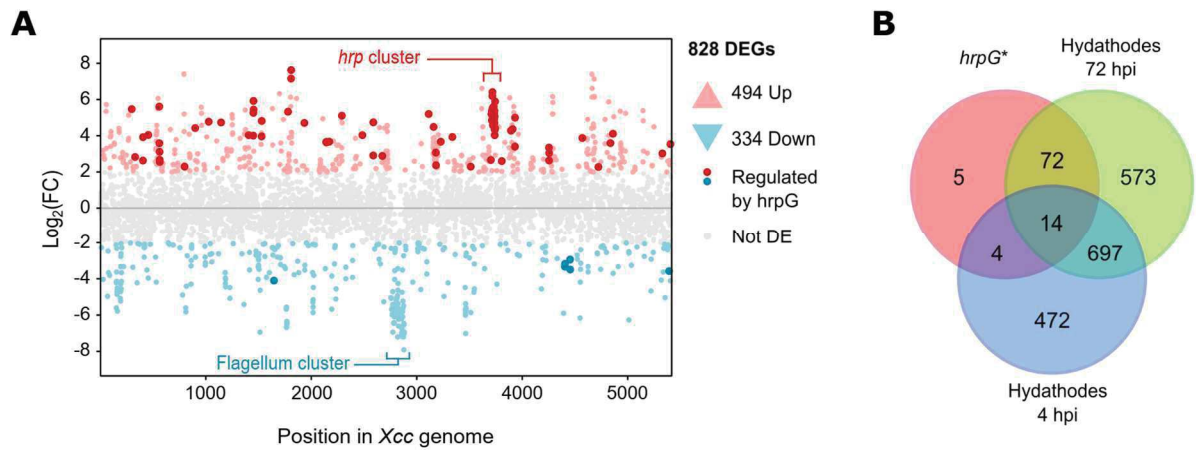


Figure 1: *Xanthomonas campestris* undergoes a massive transcriptomic reprogramming during hydathodes infection. (A) Genome-wide expression profile of *Xcc* in hydathodes at 72 hpi versus 4 hpi. Each point represents a gene for which the change in expression level is given as the log₂ fold change (Log₂FC) between 72 hpi and 4 hpi into hydathodes. Genes considered significantly differentially expressed (DEGs) are represented in red if induced or in blue if repressed between the two timepoints. Non DEGs are colored in grey. Genes under the control of the HrpG regulator (*ie.* found differentially expressed in the 8004::*hrpG** vs 8004 dataset) and found differentially expressed at 72 hpi vs 4 hpi in hydathodes are colored in dark red (up-regulated) and dark blue (down-regulated). (B) Venn diagram showing the total number of DEGs ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 2$; $\text{FDR} \leq 0.05$) obtained after growth of the *Xcc* 8004 WT strain in MOKA-rich medium as compared to either the 8004::*hrpG** mutant in MOKA and the WT strain after 4 hours or 72 hours in hydathodes.

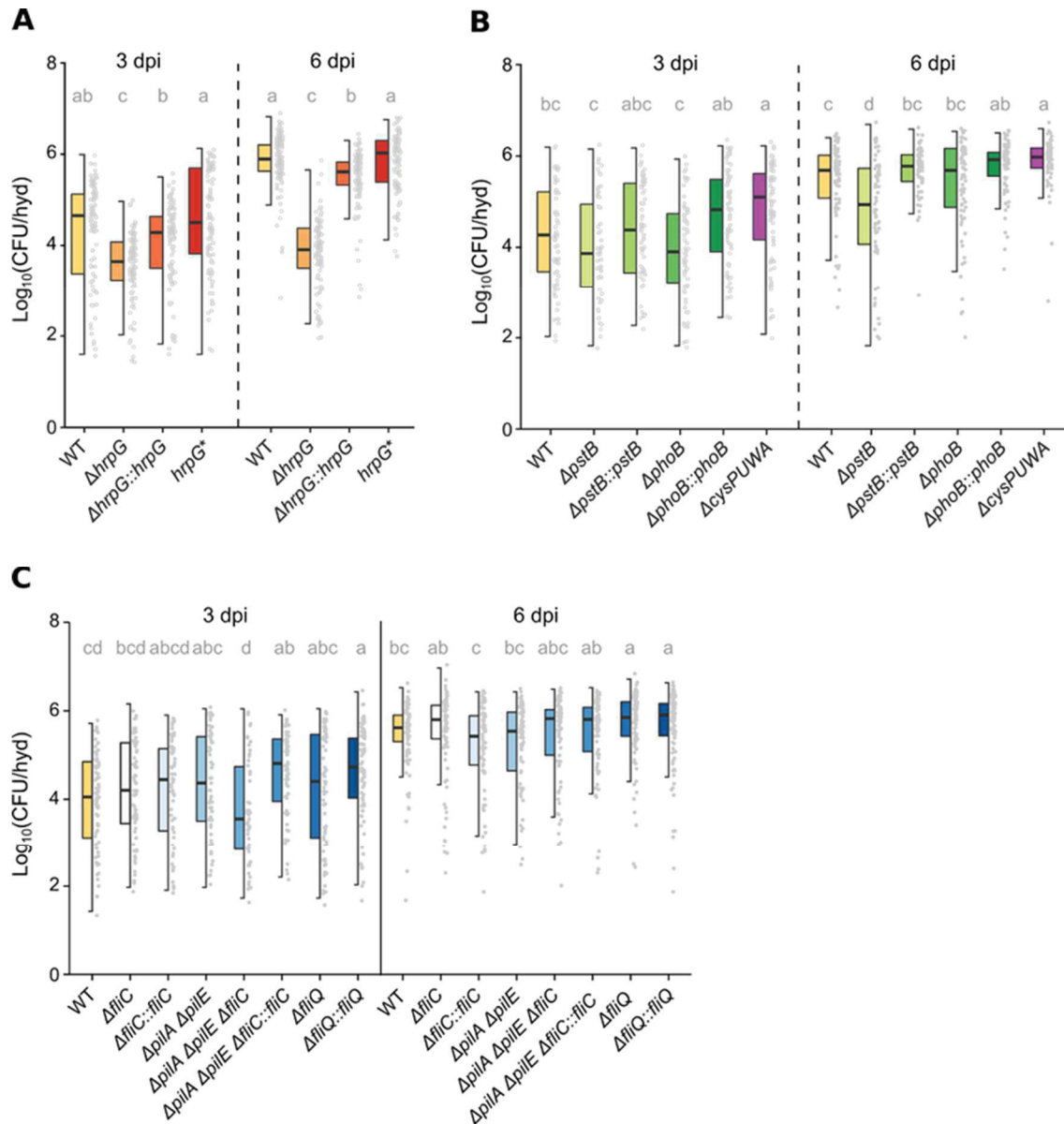


Figure 2: *Xanthomonas* colonization of hydathodes. Bacterial multiplication of *Xcc* 8004 wild-type strain (WT), deletion mutants and complemented strains in individual hydathodes 3 and 6 days after dip-inoculation of the second true leaf of 4 weeks-old cauliflower plants. The box plot representations are showing the impact of (A) mutations in the T3SS *hrpG* regulator, (B) mutations in phosphate and sulfate transport genes and (C) mutations in motility genes over *Xcc* multiplication into hydathodes. Each point of the plot represents the population extracted from one hydathode. At least 8 hydathodes were sampled on one leaf per plant and three plants were used per experiment, though not all hydathodes were infected. Results from at least three independent experiments were pooled and a total of at least 50 infected hydathodes were counted for each strain. Letters indicate statistically different groups obtained from the Kruskal-Wallis test on all data points for each strain with an error $\alpha = 0.05$.

Table 1: Impact of transcriptomic data on the *de novo* annotation of *Xcc* 8004 genome

RNAseq data used^a	All genes	mRNA^b	rRNA^c operon	tRNA^d	Other ncRNA^e	5' UTR^f	3' UTR^g	Reference	Accession Number
No	4333	4273	2	53	1	-	-	Qian et al., 2005	NCBI:CP000050.1
No	4631	4478	2	54	93	-	-	NCBI	NCBI:NC_007086.1
Yes	5431	4617	2	55	753	1724	1246	This study	DOI:10.25794/reference/id52 ofys

^a Use of merged transcriptomic datasets from *Xcc* strain 8004 derivatives (WT or 8004::*hrpG*^{*}) grown *in vitro* in MOKA medium.

^b Protein coding sequence

^c Ribosomal RNA

^d Transfer RNA

^e Non coding RNA

^f 5' untranslated region

^g 3' untranslated region

Table 2: GO terms of biological processes enriched among *Xcc* genes differentially expressed in hydathodes, 4 hpi vs 72 hpi.

GO.ID	Term	Annotated ^a	Significant ^b	Expected ^c	Adjusted p-value
Upregulated					
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	19	11	1,89	1.8 10 ⁻⁸
GO:0055114	oxidation-reduction process	399	74	39,78	8.9 10 ⁻⁸
GO:0070814	hydrogen sulfide biosynthetic process	5	5	0,5	9.5 10 ⁻⁶
GO:0005992^c	trehalose biosynthetic process	5	5	0,5	9.5 10⁻⁶
GO:0006950	response to stress	123	25	12,26	0.00063
GO:0019344	cysteine biosynthetic process	6	4	0,6	0.00123
GO:0009251	glucan catabolic process	11	5	1,1	0.00263
GO:0043649	dicarboxylic acid catabolic process	7	4	0,7	0.00265
GO:0044247	cellular polysaccharide catabolic process	8	4	0,8	0.00361
GO:0009306	protein secretion	46	11	4,59	0.00435
GO:0043623	cellular protein complex assembly	18	6	1,79	0.00612
GO:0006457	protein folding	18	6	1,79	0.00612
GO:0098661	inorganic anion transmembrane transport	15	5	1,5	0.01230
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	30	7	2,99	0.02468
GO:0044419	interspecies interaction between organisms	12	4	1,2	0.02506
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	201	39	20,04	0.03559
GO:0006817	phosphate ion transport	8	3	0,8	0.03753
GO:0016311	dephosphorylation	33	7	3,29	0.04006
Downregulated					
GO:0006935	chemotaxis	44	36	3,12	< 10 ⁻³⁰
GO:0097588	archaeal or bacterial-type flagellum-dependent cell motility	23	23	1,63	9.4 10⁻²⁸
GO:0007165	signal transduction	175	51	12,4	1.7 10 ⁻²²

GO:0044781	bacterial-type flagellum organization	16	16	1,13	2.2 10⁻¹⁹
GO:0030031	cell projection assembly	16	13	1,13	3.5 10 ⁻¹³
GO:0000160	phosphorelay signal transduction system	133	23	9,43	3.5 10 ⁻⁵
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	27	7	1,91	0.0021
GO:0007155	cell adhesion	5	3	0,35	0.0031
GO:0048870	cell motility	25	25	1,77	0.0039
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	40	6	2,83	0.0149
GO:0006468	protein phosphorylation	79	11	5,6	0.0215
GO:0015031	protein transport	81	12	5,74	0.0295
GO:0000302	response to reactive oxygen species	11	3	0,78	0.0378

^a Number of genes annotated for a given GO term

^b Number of differentially regulated genes among the genes annotated for a given GO term

^c Expected number of differentially regulated genes if no significant enrichment

^e Terms for which all annotated genes are differentially regulated are highlighted in bold

Table 3: GO terms enrichment among *Xcc* genes belonging to the HrpG regulon.

GO.ID	Term	Annotated ^a	Significant ^b	Expected ^c	Adjusted p-values
BIOLOGICAL PROCESS					
Upregulated					
GO:0002790	peptide secretion	46	9	0,91	1.5 10 ⁻⁷
GO:0009306	protein secretion	46	9	0,91	1.5 10 ⁻⁷
GO:0032940	secretion by cell	47	9	0,93	1.8 10 ⁻⁷
GO:0046903	secretion	47	9	0,93	1.8 10 ⁻⁷
GO:0015031	protein transport	81	10	1,61	2.5 10 ⁻⁶
GO:0008104	protein localization	85	10	1,69	3.9 10 ⁻⁶
GO:0015833	peptide transport	85	10	1,69	3.9 10 ⁻⁶
GO:0045184	establishment of protein localization	85	10	1,69	3.9 10 ⁻⁶
GO:0042886	amide transport	86	10	1,71	4.3 10 ⁻⁶
GO:0033036	macromolecule localization	96	10	1,91	1.2 10 ⁻⁵
GO:0071705	nitrogen compound transport	120	10	2,38	8.6 10 ⁻⁵
GO:0071702	organic substance transport	142	10	2,82	0.00035
GO:0044419	interspecies interaction between organisms	12	3	0,24	0.00143
GO:0051704	multi-organism process	21	3	0,42	0.00763
Downregulated					
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	27	3	0,08	5.6 10 ⁻⁵
GO:0009057	macromolecule catabolic process	58	3	0,18	0.00057
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	61	3	0,19	0.00066
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	64	3	0,2	0.00076
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	201	4	0,63	0.00198
MOLECULAR FUNCTION					
Upregulated					
GO:0016301	kinase activity	176	8	2,71	0.0046
GO:0001067	regulatory region nucleic acid binding	27	3	0,42	0.0077

GO:0044212	transcription regulatory region DNA binding	27	3	0,42	0.0077
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	83	5	1,28	0.0081
Downregulated					
GO:0004175	endopeptidase activity	57	3	0,17	0.00045
GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	30	2	0,09	0.00315
GO:0070011	peptidase activity, acting on L- amino acid peptides	128	3	0,38	0.00477
GO:0008233	peptidase activity	152	3	0,45	0.00774
GO:0016829	lyase activity	158	3	0,46	0.00863
GO:0008236	serine-type peptidase activity	53	2	0,16	0.00964
GO:0017171	serine hydrolase activity	53	2	0,16	0.00964

^a Number of genes annotated for a given GO term

^b Number of differentially regulated genes among the genes annotated for a given GO term

^c Expected number of differentially regulated genes if no significant enrichment

Supplemental Material and Methods

Bacterial pathogenicity assays

Pathogenicity of *Xcc* strains was tested by wound inoculation of the second true leaf of cauliflower plants by wounding the main vein with a needle dipped in an *Xcc* suspension at 10^8 cfu/mL. Symptoms were evaluated according to a disease index scale at 7 and 10 dpi (**Figure S4**) Experiments were performed on five plants per condition and in three independent biological replicates. Significance of differences observed bacterial pathogenicity assays was assessed using the non-parametric Kruskal-Wallis test with $\alpha = 0.05$.

Motility assays

Xcc cells grown overnight in MOKA were washed by centrifugation (4000 x g, 5 min) and resuspended in sterile water. 2- μ l bacterial suspensions adjusted at 10^8 cfu/mL were spotted on swimming plates {0.03% Bacto peptone, 0.03% yeast extract, 0.3% agar, \Su, 2016 #8143} and incubated 48 h at 28°C. White halos expanding from the colonies indicate the strains' ability to perform flagellar motility.

Protease activity assay on milk plates

10 % skimmed milk stock solution was first autoclave for 10 min and used to pour 0.5 % skimmed milk MOKA plates supplemented with 30 μ g/mL pimarin. Each plate contains 15 mL of medium. Extracellular protease activity of *Xcc* strains was tested by spotting 5 μ L of an overnight culture adjusted to 4.10^8 cfu/mL. Plates were incubated at 28 °C and imaged 24 hour post inoculation. Diameters of colonies and halos of degradation were measured. Protease activity was calculated as followed: $PrA = [\pi(r^{halo})^2 - \pi(r^{colo})^2] / [\pi(r^{colo})^2]$ with “r” corresponding to the radius.

Measurement of exopolysaccharide production

Extracellular EPS production was measured as described {Vojnov, 1998 #8147}. Briefly, an overnight growth of each strain in MOKA was used to inoculate 20 mL of MOKA supplemented with 50 μ g/mL of rifampicin at 2.10^7 cfu/mL. After 24 hours of growth 12 mL of culture was centrifuged 15 min at 6500 g. EPS present in supernatant were ethanol precipitated. Then, bacterial and EPS pellets were dried for 8 hours at 65°C before being weighed. EPS production corresponds to the ratio of dry weight EPS on dry weight bacterial cells.

Growth measurements *in vitro*

In vitro growth curves were generated using a FLUOStar Omega apparatus (BMG Labtech, Offenburg, Germany) using 96-well flat-bottom microtiter plates (Greiner) with 200 μ L of bacterial suspensions. After an overnight preculture in MOKA rich medium, cells were harvested by centrifugation at 9500 g for 4 minutes, washed and resuspended in MME minimal medium (K_2HPO_4 10.5 g/L, KH_2PO_4 4.5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L $MgSO_4$ 0.12g/L, casamino acids 0.15 g/L) (Arlat et al 1991). Bacterial suspensions inoculated at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.15 were prepared in MME and MOKA media. For each experiment, four replicates coming from two independent precultures were performed. The microplates were shaken continuously at 700 rpm using the linear-shaking mode. Each experiment was repeated three times and a representative experiment was shown.

Supplemental Figures:

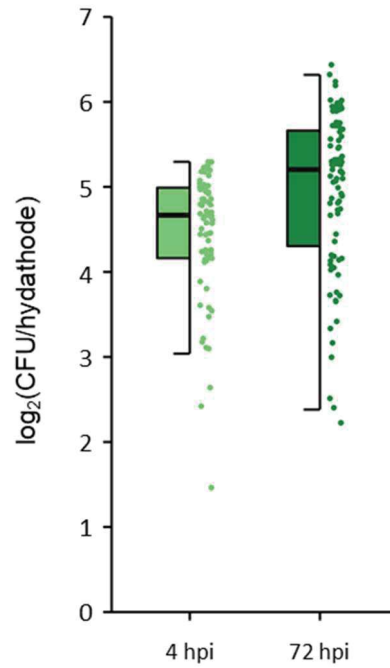


Figure S1: Measure of hydathode population in the two conditions used for RNAseq. The number of *Xcc* colony forming units (CFU) per hydathode was determined after 4 hours of continuous immersion (4 hpi) or 72 hours after transient dipping (72 hpi) for 24 or 30 individual hydathodes respectively in three independent biological replicates. Each point represents the population extracted from one hydathode. Box plots represent the pooled results obtained for three independent experiments.

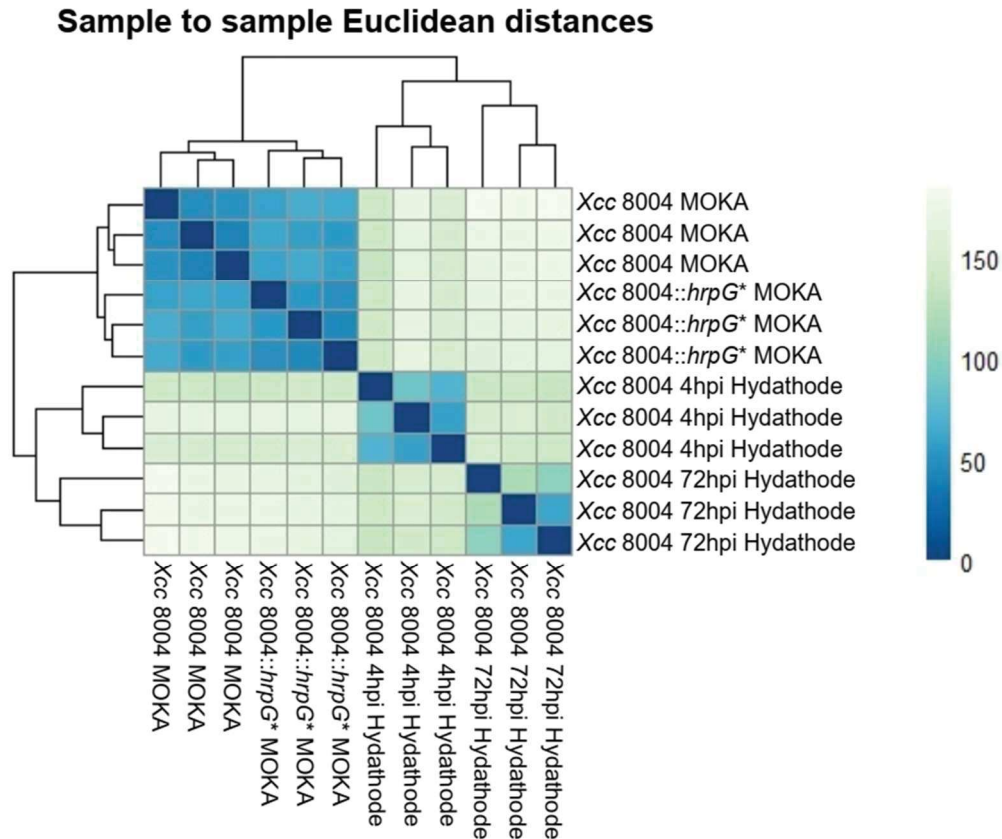


Figure S2: RNAseq samples clustering. The heatmap shows the Euclidean distances between samples as calculated from the variance-stabilizing data transformation of the count data.

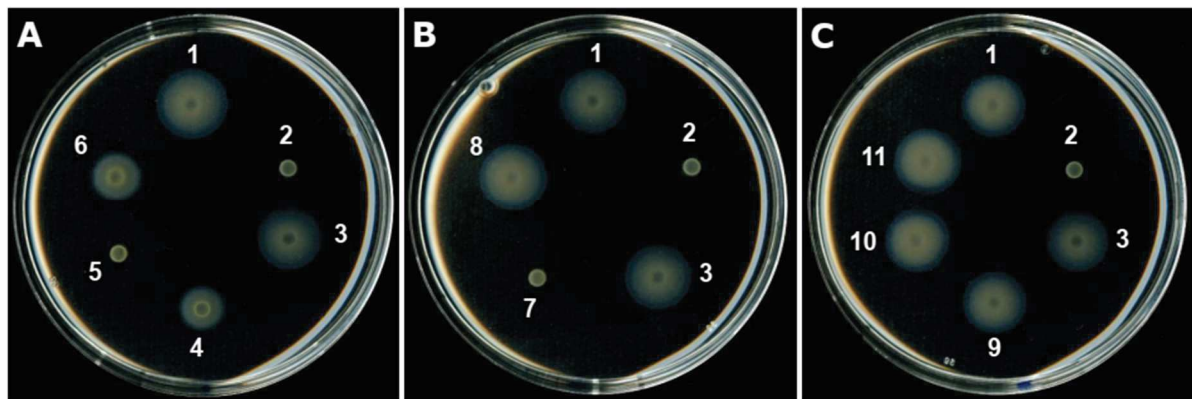


Figure S3: Swimming motility is reduced in type IV pilus and flagellum mutants in *Xcc*. To confirm the loss of flagellar motility in the mutants tested in patho-assays, we assayed their ability to move in 0.3% agar swimming plates. 2 μ L of bacterial suspensions adjusted to 10^8 cfu/mL were spotted on swimming plates and pictures were taken after 48 hours of incubation at 28°C. Deletion mutants affected in key components of the type IV pilus (A), flagellum (B), and *hrpG* regulator (C). The experiment was repeated three times independently using five plates each time. Strains: 1. WT; 2. $\Delta fliC$; 3. $\Delta fliC::fliC$; 4. $\Delta pilA \Delta pilE$; 5. $\Delta pilA \Delta pilE \Delta fliC$; 6. $\Delta pilA \Delta pilE \Delta fliC::fliC$; 7. $\Delta fliQ$; 8. $\Delta fliQ::fliQ$; 9. $\Delta hrpG$; 10. $\Delta hrpG::hrpG$; 11. *hrpG**

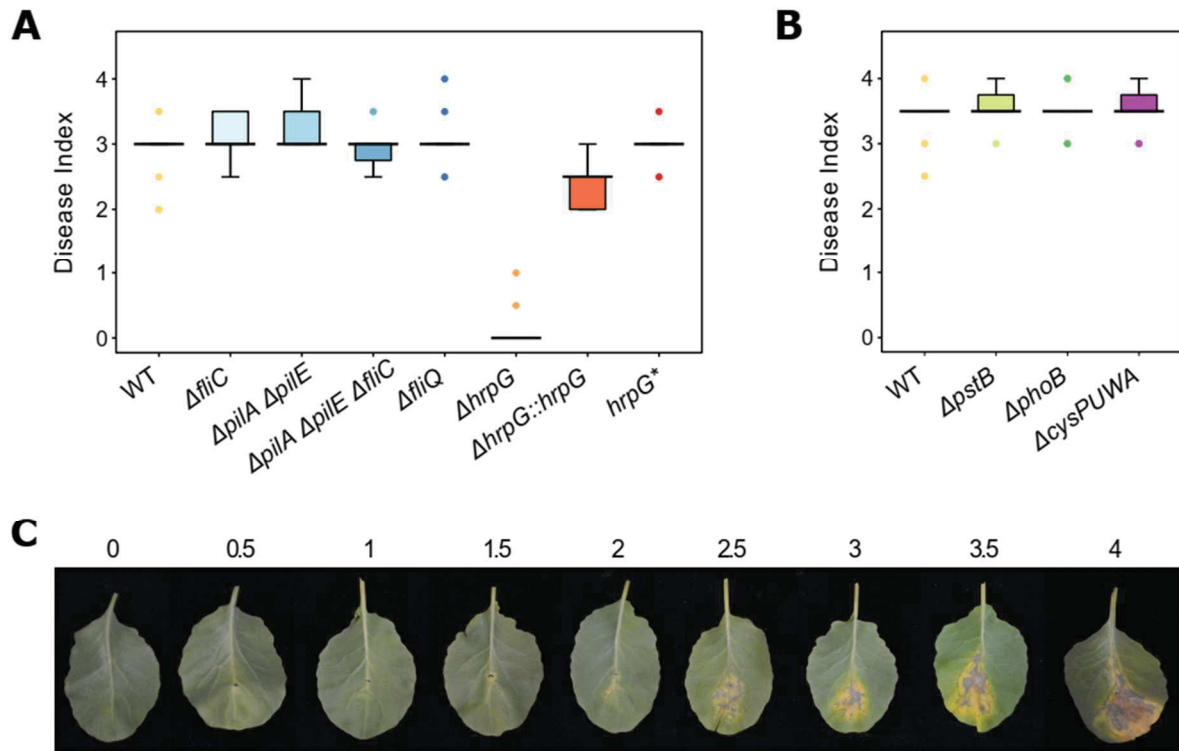


Figure S4: Evaluation of disease symptoms severity during infection of cauliflower leaves by *Xcc* mutants. Severity of the symptoms observed on cauliflower leaves 10 days after inoculation by the *Xcc* 8004::GUS-GFP WT strain or various genetic mutants in (A) motility and T3S regulation or (B) phosphate and sulfate metabolism. The inoculation is performed by piercing the main vein of the second leaf of 4-weeks old cauliflower plants with a needle dipped in a bacterial suspension adjusted to 10^8 cfu/mL. Boxplots represent the results obtained in three independent biological replicates comprising 5 plants per strain each. (C) Disease Index scale designed in this study to score the severity of the symptoms caused by *Xcc* after inoculation into the main vein of the cauliflower leaf. 0 : No symptoms; 0.5 : Mesophyll discoloration; 1 : Mesophyll discoloration & necrosis along the veins; 1.5 : Vein necrosis & yellow chlorosis at the inoculation point; 2 : Vein necrosis & yellow chlorosis extended to the mesophyll; 2.5 : Extended chlorosis & multiple necrosis spots in the mesophyll away from the inoculation point; 3 : Large chlorosis covering all the diseased area; 3.5 : Large necrosis & large chlorosis area reaching the leaf margin; 4 : Necrosis covering all the diseased area.

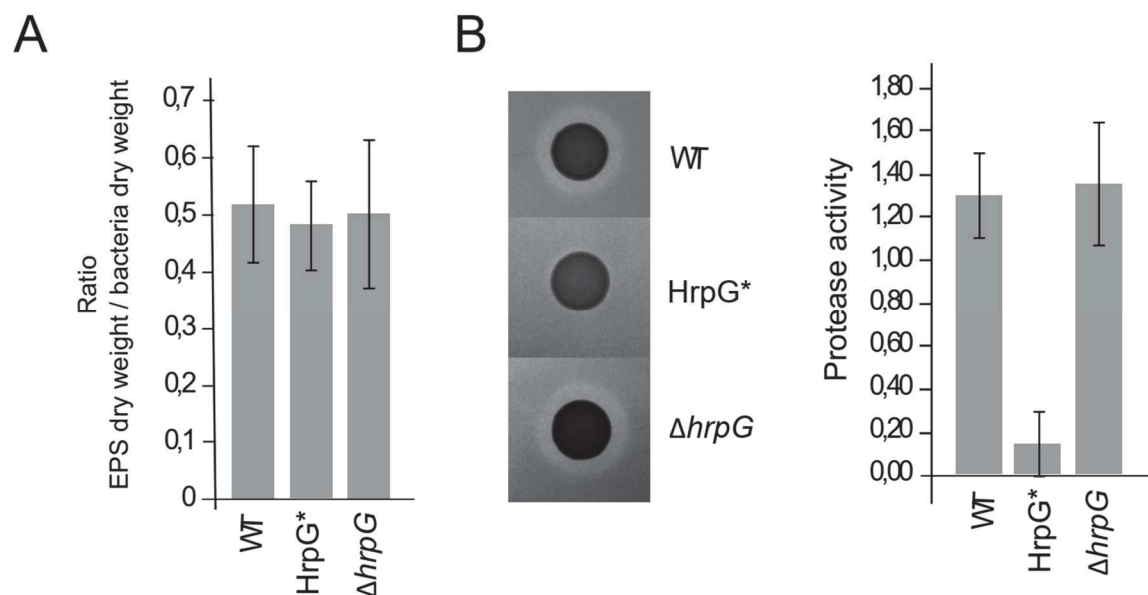
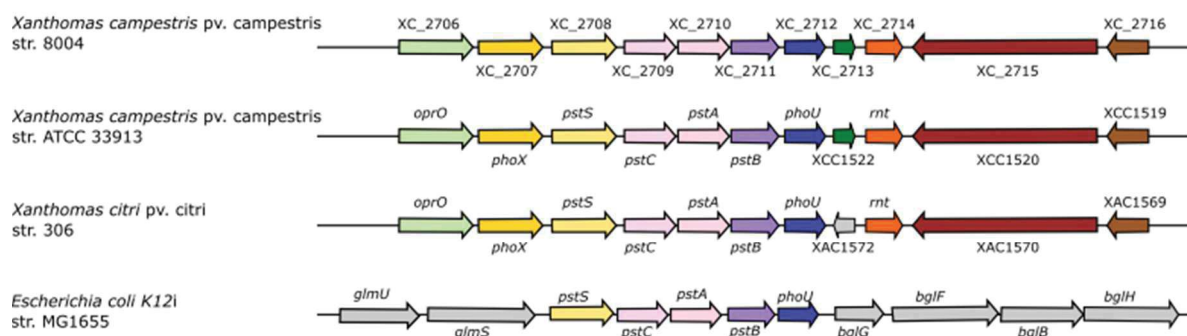


Figure S5: Phenotypic characterization of *hrpG* mutants. (A) EPS production assays were performed on 24h growth of either 8004::GUS-GFP strain (WT), HrpG* and $\Delta hrpG$ strains in rich MOKA medium. Production was normalized on dry weight bacteria. Histogram represents the average of results obtained for three independent replicates. (B) On the left, representative pictures of protease activity assay on plate are shown for each tested strain. The histogram represents the average of protease activity measured, as described in the supplemental Material and Methods section, for three independent replicates.

A. Conservation of the locus coding for the pst system



B. Conservation of the locus coding for the Tau system

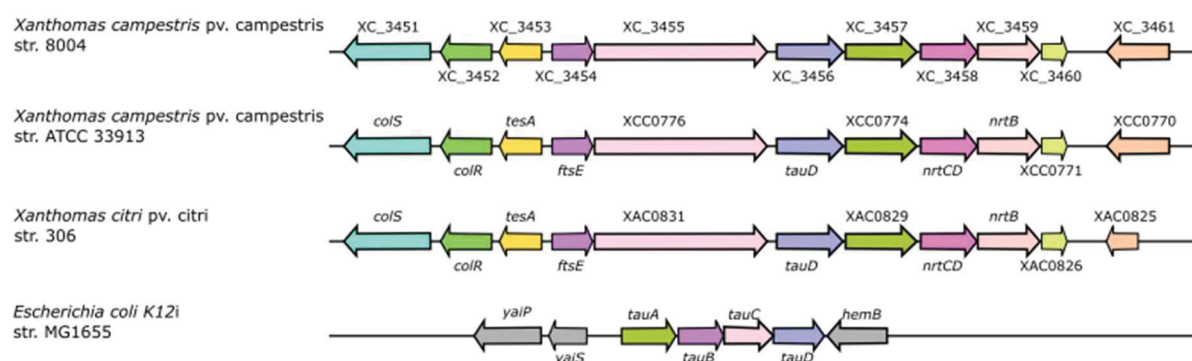


Figure S6: Synteny of genes involved in two transport systems in *Xcc*. Alignment was performed based on protein Blast using the SyntTax tool (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/>). (A) Comparison of genetic organization of the locus involved in the pst system between *Xcc* strain 8004, *Xcc* strain ATCC33913, *Xac* strain 306 et *E. coli* K12 strain MG1655 using XC_3456 as reference and “Best match” and a minimal threshold normalized BLAST bit score set at 30% as parameters. (B) Comparison of genetic organization of the locus involved in Tau system between *Xcc* strain 8004, *Xcc* strain ATCC33913, *Xac* strain 306 et *E. coli* K12 strain MG1655 using XC_2711 as reference and “Best match” and a minimal threshold normalized BLAST bit score set at 30% as parameters.

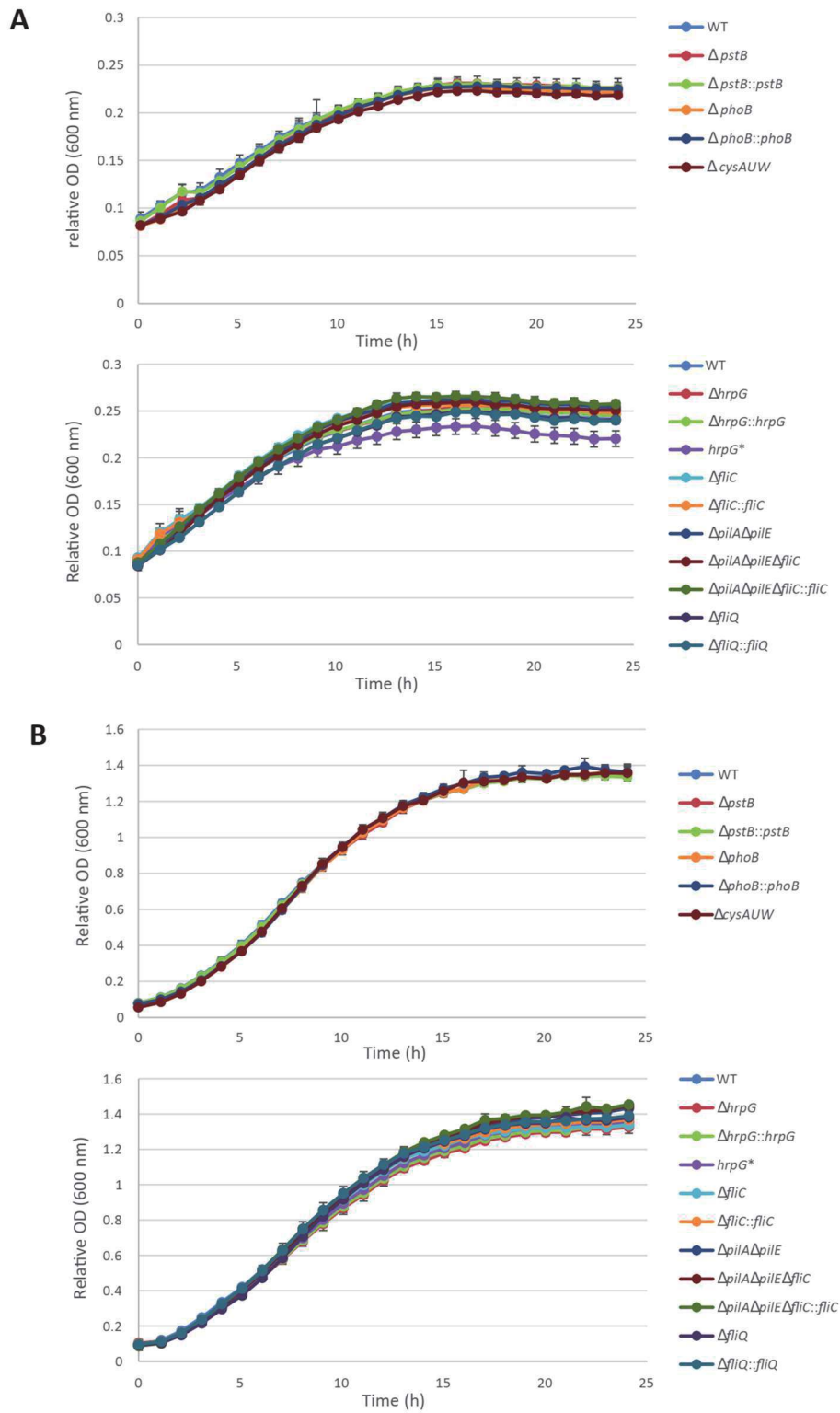


Figure S7: Growth of *Xcc* wild-type and mutant strains in (A) MME minimal medium and (B) MOKA rich medium. After overnight growth in complete medium, cells were harvested, washed, and resuspended in MME or MOKA. The error bars indicate the standard deviations obtained from 4 technical replicates. The experiments were repeated 3 times and similar results were obtained.

Supplemental Tables

Table S1: List of strains and vectors used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
8004	Wild-type, spontaneous Rifampicin-resistant mutant of NCPPB 1145; Rif ^R	(Daniels et al., 1984)
8004:: <i>hrpG</i> *	<i>hrpG</i> _{E44K} mutant derivative, constitutive <i>hrp</i> gene expression; Rif ^R	(Guy et al., 2013b)
8004:: <i>GUS-GFP</i>	Wild-type, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	(Cerutti et al., 2017)
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>hrpG</i>	<i>hrpG</i> (XC_3077) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>hrpG</i> :: <i>hrpG</i>	<i>hrpG</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP hrpG</i> *	<i>hrpG</i> _{E44K} mutant derivative, constitutive <i>hrp</i> gene expression, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>fliC</i>	<i>fliC</i> (XC_2245) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>fliC</i> :: <i>fliC</i>	<i>fliC</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>pilA</i> Δ <i>pilE</i>	<i>pilA</i> (XC_1058) <i>pilE</i> (XC_1626) double deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>pilA</i> Δ <i>pilE</i> Δ <i>fliC</i>	<i>pilA</i> (XC_1058) <i>pilE</i> (XC_1626) <i>fliC</i> (XC_2245) triple deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>pilA</i> Δ <i>pilE</i> Δ <i>fliC</i> :: <i>fliC</i>	<i>pilA pilE fliC</i> triple deletion mutant complemented with <i>fliC</i> , constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>fliQ</i>	<i>fliQ</i> (XC_2272) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>fliQ</i> :: <i>fliQ</i>	<i>fliQ</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>pstB</i>	<i>pstB</i> (XC_2711) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>pstB</i> :: <i>pstB</i>	<i>pstB</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study

8004:: <i>GUS-GFP ΔphoB</i>	<i>phoB</i> (XC_3272) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP ΔphoB::phoB</i>	<i>phoB</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rk⁻ mk⁻) [F' traD36 proAB lacI^q ZAM15]</i>	Stratagene
DH5α	<i>F⁻ recA lacZ DM15</i>	Bethesda Research Laboratory
Plasmids		
pRK2073	Helper plasmid for triparental mating; Spec ^R ; Strep ^R	(Leong et al., 1982)
pK18mobSacB	Suicide vector in <i>Xcc</i> used for genome edition; Kan ^R	(Schäfer et al., 1994)
pK18_XC3077_AmAv	<i>XC_3077</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC2245_AmAv	<i>XC_2245</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC1058_AmAv	<i>XC_1058</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC1626_AmAv	<i>XC_1626</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC2272_AmAv	<i>XC_2272</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC2711_AmAv	<i>XC_2711</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_XC3272_AmAv	<i>XC_3272</i> deletion construct; Kan ^R	This study
pK18_compR3	pK18mobSacB derivative use for genomic complementation, pTac promoter; Kan ^R	This study
pK18_Comp_XC3077	<i>XC_3077</i> overexpression construc; Kan ^R	This study
pK18_Comp_XC2245_5UTR	<i>XC_2245</i> overexpression construct; Kan ^R	This study
pK18_Comp_XC2272	<i>XC_2272</i> overexpression construct; Kan ^R	This study
pK18_Comp_XC3272	<i>XC_3272</i> overexpression construct; Kan ^R	This study
pK18_compR3_RBS	pK18mobSacB derivative use for genomic complementation, pTac promoter with ribosome-binding site added; Kan ^R	This study
pK18_CompRBS_XC2711	<i>XC_2711</i> overexpression construct; Kan ^R	This study

Rif: Rifampicin; Kan: Kanamycin

Table S2: Sequences of oligonucleotides used for construction of deletion and complementation plasmids

Locus name	Position	Direction	Name	Sequence (5'-3')
Plasmids construction				
<i>XC_1301</i>	Right	Fw	pK18_Am1301	<i>TGTAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCA</i> <i>ATCGCACGTGATGGAGCGCTGG</i>
	Left	Rev	MCS_Am1301	<i>TATGATGTCGGCGCAAAACTGCAGGGC</i> <i>AAGGCCGTTGTGGCGACTCGGC</i>
<i>XC_1302</i>	Right	Rev	pK18_Av1302	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTGGC</i> <i>TATGGCGCCTGGGAAATCGGCC</i>
	Left	Fw	MCS_Av1302	<i>TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCT</i> <i>GTGGTGATCAGCGGGCCGCAGC</i>
pTac-T7 MCS region	Right	Fw	Am1301_MCS	<i>AGCGCCGAGTCGCCACAACGGCCTTGC</i> <i>CCTGCAGTTTTTGCGCCGACATC</i>
	Left	Rev	Av1302_MCS	<i>GCGCTGCGGCCCCTGATCACCACAGC</i> <i>AAGTGATAGCGGTACGCTGCGCG</i>
RBS	Right	Fw	CompR3_RBSup	<i>CGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAA</i> <i>GCTGAATTAATTCGGATCCCTC</i>
	Left	Rev	CompR3_RBSdw	<i>CGCGTTTAAACCGCATGCATCGCAAGCTT</i> <i>GGTCGAGATCCTCTAGAGCTC</i>
Deletion				
<i>XC_3077</i>	Left	Fwd	pK18_3077Am	<i>GTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCGG</i> <i>TCCACCTGTAATTACAAGAGC</i>
		Rev	XC_3077AvAm	<i>CTCAGCAAGCTGCGGTGCGATTGACGT</i> <i>CATTCGCAGCGGCGTCCATCAC</i>
	Right	Fwd	XC_3077AmAv	<i>GTGATGGACGCCGCTGCGAATGACGTC</i> <i>AATCGCACCGCAGCTTGCTGAG</i>
		Rev	pK18_3077Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTGTA</i> <i>CGGCGAGAGCCCGAAGCAG</i>
<i>XC_2245</i>	Left	Fwd	pK18_2245Am	<i>GTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCGC</i> <i>TCAAGACCACCTTGTCGTCGAT</i>
		Rev	XC_2245AvAm	<i>GCTGTGACGCTGCCGATTACTGCAGCA</i> <i>GCGACATTACGTTGGTGTTGATTACCT</i> <i>GTG</i>
	Right	Fwd	XC_2245AmAv	<i>AATCAACACCAACGTAATGTCGCTGCT</i> <i>GCAGTAATCGGCAGCGTCACAGCAACG</i> <i>C</i>
		Rev	pK18_2245Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTCCG</i> <i>AGCTGGTGGTGGTGGCGGTAA</i>
<i>XC_1058</i>	Left	Fwd	pK18_1058Am	<i>GTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTGAG</i> <i>CATGTTGCGGTTGCGAGCAGG</i>

		Rev	XC_1058AvAm	GAGCTTTGATTACGGAGCCGCCGCTTC GATCAGTGTA AAAACCATTTTGC
	Right	Fwd	XC_1058AmAv	GCAAAATGGTTTTACTGATCGAAGC GGCGGCTCCGTAATCAAAGCTC
		Rev	pK18_1058Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCA<u>AAGCT</u>ACT</i> GAATAGTAGTCCCGGAGCCGTTG
XC_1626	Left	Fwd	pK18_1626Am	<i>GTAAAACGACGGCCAGTGCCA<u>AAGCT</u>CAG</i> GATGGTGATCGGACATTGAGCC
		Rev	XC_1626AvAm	GCCAGTCTTTACATCACCAACAGTCAC GCCCCCTAACTGCTTGCAAGAAC
	Right	Fwd	XC_1626AmAv	GTTCTTGCAAGCAGTTAGGGGGCGTGA CTGTTGGTGATGTAAAGACTGGC
		Rev	pK18_1626Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCA<u>AAGCT</u>CAG</i> ACAGCAACTGGTCCGCAGGGTG
XC_2272	Left	Fwd	pK18_2272Am	<i>GTAAAACGACGGCCAGTGCCA<u>AAGCT</u>ATG</i> GGGGACCCCGAAGCAGAACAGC
		Rev	XC_2272AvAm	TCCATCAGCGCGTGCCGCTACCCGATA ATCCACAAGACGGTGACCAGGCC
	Right	Fwd	XC_2272AmAv	TGGCCTGGTCACCGTCTTGTGGATTATC GGGTAGCGGCACGCGCTGATGG
		Rev	pK18_2272Av	<i>AGAGTCGACCTGCAGGCATGCA<u>AAGCT</u>TA</i> GCTGTCCACCAGCAACGCGATC
XC_2711	Left	Fwd	pK18_2711Am	<i>GTAAAACGACGGCCAGTGCCA<u>AAGCT</u>GCT</i> GTACGTGATGCAGACCG
		Rev	XC_2711AvAm	GCAGGCCTACATCAGCCGAAGCGGCTT GGCGTTTTGGAGATCGTTC
	Right	Fwd	XC_2711AmAv	GAACGATCTCCAAAACGCCAAGCCGCT TCGGCTGATGTAGGCCTGC
		Rev	pK18_2711Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCA<u>AAGCT</u>GGA</i> ATTGAGTGCGATCGAGCGCTTG
XC_3272	Left	Fwd	pK18_3272Am	<i>GTAAAACGACGGCCAGTGCCA<u>AAGCT</u>GCT</i> TCGATGCGCTGCTGAAGC
		Rev	XC_3272AvAm	GGCATCAGGTGGCCGAGGAGAAACGG TCATCGACGATCAGGATGCG
	Right	Fwd	XC_3272AmAv	CGCATCCTGATCGTCGATGACCGTTTCT CCTCGGCCACCTGATGCC
		Rev	pK18_3272Av	<i>GAGTCGACCTGCAGGCATGCA<u>AAGCT</u>GCC</i> TTGTTGAACCACTGCAC
Complementation				

XC_3077	Left	Fwd	pK18_CompR3_X C3077_Fwd	CGAATTCGAGCTCCGTCGACA <u>AAGCT</u> CTGT TGTGCTCAGTTCCATGGTCTG
	Right	Rev	pK18_CompR3_X C3077_Rev	GTTTAAACCGCATGCATCGCA <u>AAGCT</u> TCAG CAAGCTGCGGTGCGATTGACC
XC_2245	Left	Fwd	pK18_Comp_XC2 245_5UTR_Fwd	CGAATTCGAGCTCCGTCGACA <u>AAGCT</u> CTA AAGGTTCCCAGAGCATCG
	Right	Rev	pK18_Comp_XC2 245_out_Rev	GTTTAAACCGCATGCATCGCA <u>AAGCT</u> GCTC TAGCGTTGCTGTGACG
XC_2272	Left	Fwd	pK18_CompR3_X C2272_Fwd	CGAATTCGAGCTCCGTCGACA <u>AAGCT</u> GCA CCGCACTTGTCATCAGCACTCC
	Right	Rev	pK18_CompR3_X C2272_Rev	GTTTAAACCGCATGCATCGCA <u>AAGCT</u> CTAC CCGATCAGATGCGGAATGC
XC_2711	Left	Fwd	pK18_CompRBS_ XC2711_Fwd	GCTCTAGAGGATCTCGACCA <u>AAGCT</u> ATGA CTGACCTTTCTTTCCGGACG
	Right	Rev	pK18_CompRBS_ XC2711_Rev	CGTTTAAACCGCATGCATCGCA <u>AAGCT</u> TCA GCCGAAGCGGCCGGTGATG
XC_3272	Left	Fwd	pK18_CompR3_X C3272_Fwd	CGAATTCGAGCTCCGTCGACA <u>AAGCT</u> CGT AGTCTACTGGCGACCATCC
	Right	Rev	pK18_CompR3_X C3272_Rev	GTTTAAACCGCATGCATCGCA <u>AAGCT</u> TCAG GTGGCCGAGGAGAAACGGTAG

Table S3: Sequences of oligonucleotides used for oligocapture of plant RNAs

Name	Sequence (5'-3') ^a
Nuclear ribosomal RNA	
28S_2844_LNA	CTC{C}CGA{C}AATTTCAA{G}CA{C}TCT
28S_3090_LNA	GT{G}TTT{C}AA{G}ACGGGTCGAA{T}GG
28S_3345_LNA	C{C}TATACCCAAGT{C}AGA{C}GAA{C}G
28S_3660_LNA	T{C}TTAAT{C}GAC{C}AACACC{C}TTTG
28S_3889_LNA	G{C}TACTA{C}CAC{C}AAGATCTG{C}AC
28S_4534_LNA	CCTA{C}ATTGTT{C}CATC{G}AC{C}AGA
28S_4803_LNA	GGA{C}CATC{G}CAATG{C}TTTGT{T}TT
28S_5082_LNA	GT{C}ATTTCA{C}AAAGTCG{G}ACT{A}G
28S_5399_LNA	GA{T}AGG{C}CACG{C}TTTCACGG{T}TC
28S_5772_LNA	CG{G}ATTCTGA{C}TTAGA{G}GCG{T}TC
28S_5693_LNA	GA{C}CAATTGT{G}CGAA{T}CAACG{G}T
28S_6158_LNA	AA{G}TTGG{G}AATT{C}GTTAAG{G}AGC
28S_2474_LNA	TGA{T}ATGCT{T}AAA{C}TCAGC{G}GGT
28S_2707_LNA	CCAAA{C}AACCCGA{C}TC{G}TAGA{C}A
28S_4147_LNA	TT{T}CCAG{G}GTGGG{C}AGG{C}TGTTA
18S_70_LNA	GTT{C}ATA{C}TTA{C}ACATGCATG{G}C
18S_174_LNA	GCA{C}GTATT{A}GCT{C}TAGAA{T}TAC
18S_383_LNA	AT{C}GAA{C}CCTAATTCT{C}CGT{C}AC
18S_1792_LNA	CG{G}AAA{C}CTTGTTACGA{C}TT{C}TC
18S_1677_LNA	ATT{C}AATCG{G}TAG{G}AGCGA{C}GGG

18S_559_LNA	TG{C}CCT{C}CAATGGAT{C}CTC{G}TTA
18S_258_LNA	AT{C}ATGAA{T}CATCAG{A}GCAA{C}GG
18S_1147_LNA	TTC{C}TTTAAGTT{T}CAG{C}CTTG{C}G
18S_1412_LNA	GG{C}CATAGTC{C}CTCTAA{G}AA{G}CC
28S_843_LNA	GCCAA{C}ACAA{T}AGGA{T}CGAA{A}TC
5,8S_2159_LNA	ACA{C}CAA{G}TATCGCA{T}TT{C}GCT
Chloroplastic ribosomal RNA	
Bo0151s070_23S_10_LNA	A{C}AGCTT{C}GGCA{G}ATCG{C}TTAGC
Bo01051s070_23S_256_LNA	CAAG{G}GGTA{G}TA{C}AGGAATA{T}TC
Bo01051s070_23S_832_LNA	AGA{C}AGTG{C}CCA{G}ATCGT{T}ACGC
Bo01051s070_23S_974_LNA	CCTT{C}TTCG{C}CTT{C}CA{C}CTAAGC
Other plant RNA	
BRARA_CHL_psbA_43_LNA	GTTAT{C}CAGTTA{C}AGAA{G}C{G}ACC
BRARA_CHL_psbA_199_LNA	GTTT{C}TGGAT{C}T{C}TTCTTTA{C}GG
BRARA_CHL_psbA_506_LNA	GATT{C}CTA{G}AGG{C}ATACCAT{C}AG
BRARA_CHL_psbA_745_LNA	CCA{A}AATAA{C}CGTGA{G}CAG{C}TAC
BRARA_CHL_psbA_829_LNA	CAA{A}TACCTA{C}TAC{C}GGC{C}AAGC
BRARA_CHL_psbA_932_LNA	CA{G}CC{C}AAGTATT{A}ATAACA{C}GTC
BRARA_CHL_rbcL_4_LNA	G{C}TTTAGT{C}TCT{G}TTTGTGGT{G}A
BRARA_CHL_rbcL_188_LNA	C{C}ACA{C}AGTTGTC{C}ATGTA{C}CAG
BRARA_CHL_rbcL_731_LNA	CA{T}CATTT{C}TTCG{C}ATGTA{C}CCG
BRARA_CHL_rbcL_1032_LNA	CAT{C}GCG{C}AG{T}AAATCAA{C}AAAG
BRARA_CHL_rbcL_1395_LNA	CGAT{G}GTTGG{G}AA{G}TTAAAT{G}TG

Bo01051s080_29_LNA	GTAA{C}CCAT{G}CTAT{A}CTC{C}CAGG
Bo01051s080_127_LNA	GGTTCAA{G}AACG{C}AAG{G}TGT{C}CC
Bo01051s080_517_LNA	CTA{G}AAGCAG{C}CA{C}CCTTG{A}AAG
Bo01051s080_709_LNA	CGGTA{C}CAAAT{C}GAG{G}CAA{A}CTC
Bo01051s080_812_LNA	GAAG{C}TTAT{C}CCCCA{C}CGT{C}TCA

^a Bases under brackets refer to locked nucleic acid (LNA)-modified bases

Table S6: Properties of RNAseq libraries from *Xcc* strain 8004 wild-type and derivatives grown *in vitro* or harvested from cauliflower hydathodes

Strain	Condition	Biological replicates	Number of raw reads	Uniquely mapped reads <i>Xcc</i> & <i>Brassica</i> (%) ^a	Hits <i>Brassica</i> genes (%) ^b	Hits <i>Xcc</i> genes (%) ^c	Accession ^d
8004	MOKA	3	22 503 680	93,58 %	-	94,72 %	SRR12603737
			31 781 601	88,67 %	-	94,49 %	SRR12603738, SRR12603725
			29 317 932	88,54 %	-	94,21 %	SRR12603739, SRR12603726
8004:: <i>hrpG</i> *	MOKA	3	21 746 450	95,87 %	-	93,58 %	SRR12603727
			14 282 665	94,84 %	-	94,11 %	SRR12603728
			15 932 094	95,08 %	-	94,57 %	SRR12603729
8004	Cauliflower hydathodes 4 hpi	3	158 422 507	33,42 %	62,45 %	13,32 %	SRR12603813, SRR12603814, SRR12603815
			150 271 178	23,49 %	66,21%	10,63 %	SRR12603810, SRR12603811, SRR12603812
			173 591 985	41,15 %	67,94 %	10,12 %	SRR12603804, SRR12603805, SRR12603806
8004	Cauliflower hydathodes 72 hpi	3	164 579 058	38,59 %	55,19 %	16,40 %	SRR12603816, SRR12603817, SRR12603818
			163 894 181	38,47 %	52,56 %	27,27 %	SRR12603801, SRR12603802, SRR12603803
			143 337 188	27,63 %	73,48 %	1,61 %	SRR12603807, SRR12603808, SRR12603809

^a Percentage of raw reads mapped uniquely to the sequences of *Xcc* strain 8004 chromosome (Genbank accession number CP000050.1), *Brassica oleracea* nuclear and mitochondrial genomes (Accession GCA_000695525.1, NC_016118.1) and *Brassica rapa* chloroplastic genome (BRARA_CHL, accession NC_040849.1).

^b Percentage of unique hits to the genes of *Brassica oleracea* nuclear and mitochondrial genomes and *Brassica rapa* chloroplastic genome.

^c Percentage of unique hits to the genes of *Xcc* strain 8004.

^d Sequence Read Archive accession number

3.1.3 Discussion & Perspectives

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent une réponse adaptative forte de *Xcc* lors de l'infection de l'hydathode avec (i) une sédentarisation, (ii) l'activation de certains facteurs de virulence et (iii) l'induction de transporteurs haute-affinité pour l'acquisition des nutriments. Cependant, ce n'est que la première étape de l'infection. Dès 6 jours post-inoculation *Xcc* abandonne son comportement initial biotrophe et s'engage dans un comportement nécrotrophe menant à la destruction de l'hydathode. Il serait intéressant d'étudier ce changement dans le comportement parasitaire de *Xcc* pour établir les mécanismes d'évasion de l'hydathode. La vascularisation est en effet une étape critique dans la maladie puisqu'elle permet la propagation rapide et systémique de *Xcc*. Déterminer le transcriptome de *Xcc* à 6dpi dans l'hydathode puis lors de la colonisation du xylème s'avèrerait être complémentaire à notre étude et bénéfique pour la compréhension du cycle infectieux de ce pathogène. De la même manière, la comparaison avec l'infection du mésophylle foliaire pourrait renseigner sur les stratégies infectieuses de *Xcc* dans la plante.

Cependant, malgré la valeur descriptive des approches de transcriptomique, la contribution réelle de chacun des gènes identifiés comme différentiellement exprimés dans nos conditions n'est pas évaluée. C'est pourquoi nous avons décidé d'initier un criblage des gènes requis pour la fitness de *Xcc in planta* par RB-TnSeq.

Partie 2

Identification des déterminants de la fitness de *Xcc* dans l'hydathode et la sève de xylème par RB-TnSeq

3.2.1 Contexte

Ce chapitre rassemble la majorité du travail développé pendant ma thèse concernant l'identification des déterminants génétiques de la fitness chez *Xcc* par RB-TnSeq. Le projet de thèse proposait d'utiliser le RB-TnSeq pour quantifier la contribution de chacun des gènes de *Xcc* à la fitness dans les trois environnements colonisés lors du cycle infectieux : les hydathodes, le xylème et le mésophylle. Ici je présente les résultats obtenus dans les hydathodes, point d'entrée de *Xcc* dans la plante, et dans la sève de xylème. De plus, le criblage a été réalisé dans plusieurs conditions *in vitro* pour déterminer les gènes dont l'importance est centrale pour la physiologie bactérienne indépendamment de l'environnement dans lequel elle évolue. A ce titre, l'analyse de notre banque de mutants a permis de produire une liste de gènes essentiels chez *Xcc* (dans le milieu riche utilisé pour la mutagenèse). Les résultats du criblage *in planta* nous ont conduit à approfondir l'implication d'une douzaine de gènes dans le pouvoir pathogène et l'adaptation de *Xcc* lors de l'infection. En particulier, nous nous sommes concentrés sur le gène *XC_3388*, codant une protéine sans fonction ni domaine connu, pour lequel nous avons fait l'hypothèse qu'il s'agit d'un nouveau régulateur du pouvoir pathogène chez *Xcc*. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article scientifique. Plusieurs pistes sont cependant encore en cours d'investigation pour finaliser ce travail (voir paragraphe **3.2.3**). Par ailleurs, le travail de validation fonctionnelle engagé dans ce projet a nécessité le développement d'un protocole d'évaluation de la fitness bactérienne lors de l'infection. Ce protocole a été valorisé sous la forme d'une publication dans la revue *Bio-protocol* et est décrit en détails dans le paragraphe **3.2.4**.

3.2.2 Contribution

Le travail présenté ici est le résultat d'une collaboration internationale impliquant plusieurs membres du LIPM, la plateforme de séquençage toulousaine GeT-PlaGe, l'*University of California, Berkeley* et le *Lawrence Berkeley National Laboratory* (Berkeley, CA, USA). Le projet d'utilisation du RB-TnSeq chez *Xcc* avait été initié avant le début de ma thèse. La banque de mutants avait ainsi été générée par Maël Baudin dans l'équipe de Jennifer Lewis (UC Berkeley). Tout le travail de séquençage et de mapping des insertions, géré par Jayashree Ray dans le groupe d'Adam Deutschbauer, était également déjà très avancé. Les outils pour la réalisation du criblage RB-TnSeq étaient donc à ma disposition dès le début de la thèse. J'ai donc (i) optimisé les conditions expérimentales nécessaires au bon déroulement du criblage, (ii) réalisé les expériences biologiques *in vitro* et *in planta* et (iii) analysé les résultats (le séquençage et le traitement bioinformatique étant assurés par l'équipe d'Adam Deutschbauer). Par la suite, j'ai activement contribué (i) à sélectionner les gènes candidats à approfondir, (ii) à construire les mutants de délétions et les souches complémentées correspondantes et (iii) à phénotyper ces mutants. J'ai également participé au développement d'un protocole permettant d'évaluer la fitness bactérienne lors de l'infection par un test de compétition (cf. **paragraphe 3.2.4**). Enfin, j'ai compilé ces résultats et mené l'écriture du manuscrit présenté ici.

**Genome-wide identification of fitness determinants
uncovers adaptive traits in the *Xanthomonas campestris* bacterial pathogen
during plant infection**

Julien S. Luneau¹, Maël Baudin^{2,3}, Sébastien Carrère¹, Olivier Bouchez⁴, Marie-Françoise
Jardinaud¹, Carine Gris¹, Jonas François¹, Jayashree Ray⁵, Babil Torralba¹, Matthieu
Arlat¹, Jennifer D. Lewis^{2,3}, Adam M. Deutschbauer⁵, Emmanuelle Lauber¹, Laurent D. Noël¹,
Alice Boulanger¹

¹ LIPM, université de Toulouse, INRA, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan,
France

² Plant Gene Expression Center, USDA, Albany, CA, USA

³ Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, CA, USA

⁴ Genotoul Genome & Transcriptome (GeT-PlaGe), INRA, Toulouse, France

⁵ Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA,
USA

Authors for correspondence: alice.boulanger@inrae.fr and laurent.noel@inrae.fr, LIPM,
Université de Toulouse, INRA, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France.

Abstract

Xanthomonas bacterial phytopathogens cause disease on more than 400 plant species
and are responsible for tremendous losses on various economically important crops worldwide.
While pathogenicity factors required for disease development have been extensively studied,
only few reports concern determinants of bacterial fitness during early entry and colonization
of the host. Here, we use RB-TnSeq to perform a genome-wide screening and identify key
bacterial fitness determinants of the vascular pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

(*Xcc*) during infection of cauliflower (*Brassica oleracea*). This high-throughput analysis was conducted in multiple synthetic media *in vitro*, in xylem sap and in the understudied hydathode organ that constitutes the natural entry point of *Xcc*. By integrating all these datasets, we determined a set of genetic determinants contributing to bacterial fitness during hydathodes and xylem colonization by *Xcc*, thus leading the way for this large genus of phytopathogens. We identified more than 170 genes required for optimal bacterial fitness in the hydathodes of cauliflower and listed 273 essential genes in *Xcc*. A deepened analysis of 12 genes by reverse genetics on clean deletion mutants confirmed the large-scale screening data and uncovered the importance of novel candidate genes involved in pathogenicity. Notably, we characterize a putative regulator, XC_3388, that seems to play a key role in the adaptation and virulence of *Xcc*. This ecological approach to functional genomics also highlighted that hydathodes provide a confined environment in which we could detect clues of social cooperative behaviors among *Xcc* individuals.

Key Words

RB-TnSeq; *Xanthomonas*; Fitness; *Brassica oleracea*; Hydathodes

Introduction

Crop production, for both food and feed, is at the core of our alimentation. However, pests and pathogens are a constant threat and often cause significant yield losses. The search for new control strategies then relies on our understanding of host-pathogen interactions. Therefore, the identification and characterization of molecular determinants of pathogens fitness are of great interest and provide new targets for the development of disease management solutions.

Xanthomonas bacteria cause disease on more than 400 plant species and are responsible for tremendous losses on various economically important crops worldwide. Among them, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), the causal agent of the black rot disease, represents the most damageable bacterial pathogen of *Brassica* crops (e.g. cauliflower, cabbage,

mustard, radish etc.; Vicente and Holub, 2013). Transmissible by seeds, *Xcc* survives as an epiphyte and enters the plant by leaf organs called hydathodes. Hydathodes are nephron-like structures located at the extremity of xylem sap conducting vessels that mediate the plant guttation process, allowing the release of excess root pressure in the leaf and presumably filtering sap content (Cerutti et al., 2017; Cerutti et al., 2019). *Xcc* exploits the hydathodes pores located at the leaf margin to sneak into its host and initiate the infection. After a six-day long biotrophic homing step, *Xcc* adopts a necrotrophic behavior and destroys the epithelial tissue of hydathodes. By doing so, *Xcc* gains access to xylem vessels and exploits the plant vasculature to spread systemically within the plant.

Xcc deploys an arsenal of virulence factors to successfully infect the host plant, including two secretion systems that are essential for pathogenicity: while the type II secretion system (T2SS) exports enzymes such as plant cell wall degrading enzymes to the extracellular space, the type III secretion system (T3SS) enables the translocation of effector proteins into the host cells to suppress immune responses and hijack host metabolism (Büttner and Bonas, 2010). In addition, *Xcc* produces exopolysaccharides (xanthan) and lipopolysaccharides that protect the cell against environmental stresses and support biofilm formation. Quorum sensing coordinates bacterial behavior, including biofilm dispersal, and is required for disease as well. Furthermore, *Xcc* possesses a wide range of two-components systems that ensure perception of environmental signals and mounting of adequate adaptive responses (Qian et al., 2008b). Altogether, these traits contribute to the fitness of the bacterium during the infection. However, while previous studies have investigated in depth the virulence factors deployed by *Xcc* to implement its pathogenic lifestyle at late stages of infection, very few looked at the finer fitness determinants involved in the early steps of plant infection (An et al., 2019; Timilsina et al., 2020). A recent transcriptomic study on the early infection steps revealed that *Xcc* colonization of hydathodes is associated with sedentarization, activation of pathogenicity determinants and induction of high-affinity transporters for nutrient uptake (e.g. phosphate, sulfate, nitrate; Luneau et al., in prep). Nevertheless, transcriptome profiling only provides genes expression levels without evaluating their contribution to bacterial fitness.

With the rise of New Generation Sequencing technologies, transposon insertion site sequencing tools have been developed to address the question of bacterial fitness at the genomic scale (Cain et al., 2020; van Opijnen and Levin, 2020). Here, we propose to use Randomly

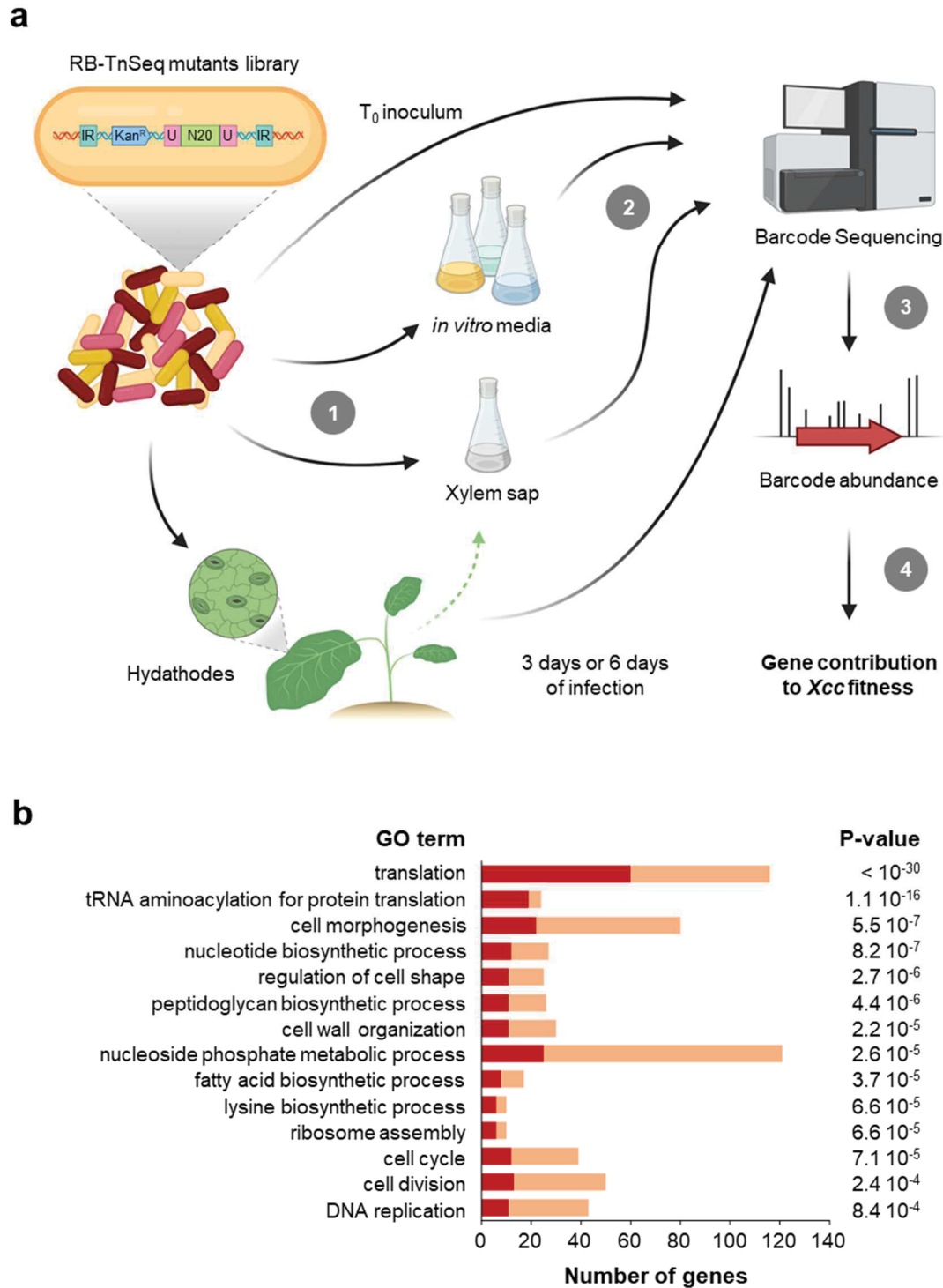


Figure 1 | An RB-TnSeq library of *Xcc* mutants to screen for fitness determinants *in vitro* and *in planta*. **a)** The RB-TnSeq library is composed of *Xcc* 8004::GUS-GFP derived transposon-insertion mutants carrying 20 bp-random barcodes (N20). (1) To evaluate the competitive fitness of the pool of *Xcc* mutants, the T₀ population is inoculated into either hydatodes, xylem sap or *in vitro* media and evolved for multiple generations. (2) After DNA extraction, both T₀ and evolved population samples are (3) analyzed by barcode sequencing to measure the relative abundance of each mutant strain. (4) Comparison of relative abundance in the two populations assesses the impact of genes inactivation on bacterial fitness and precisely quantifies the contribution of each gene to *Xcc* fitness. (Created with BioRender.com) **b)** List of key biological processes found enriched among essential genes of *Xcc* according to the Gene Ontology classification. Red bars indicate the number of genes found to be essential in each GO category. Light red bars show the total number of genes annotated in each category.

Barcoded Transposon insertion site Sequencing (RB-TnSeq) to identify the genetic bases underlying the adaptation of *Xcc* to the environments it colonizes within the host. RB-TnSeq allows, via the inoculation of a saturated library of barcoded transposon-mutagenized bacteria, to evaluate gene importance for fitness at very high-throughput (Wetmore et al., 2015). Focusing on the early interactions between *Xcc* and its host could prove useful to understand the factors underlying the emergence of epidemics and develop appropriate control strategies.

In this study, we screened and successfully identified genes contributing to *Xcc* fitness in hydathodes, xylem sap and synthetic media. In addition, we investigated several candidate genes and characterized the “hypothetical protein”-encoding gene *XC_3388*. We show that this protein acts as a major regulator of adaptation and pathogenicity in *Xcc* and that it is likely contributing to fitness into hydathodes through social behavior within the bacterial population.

Results

Construction of a saturated library of *Xcc* transposon-insertion mutants identifies essential genes.

In order to screen for genes involved in the adaptation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain 8004 to its environment, we first constructed a saturated library of randomly barcoded insertion mutants (RB-TnSeq) using a *mariner* transposon. High-throughput TnSeq analysis allowed the mapping of each insertion site to *Xcc* genome and their association to a unique barcode. This large-scale mutagenesis ultimately resulted in the obtention of 241,284 well mapped individual mutants, each carrying a barcode. However, after filtering out chimeric reads and non-unique DNA barcodes, and computationally removing insertions located outside the body of the gene (central 10% - 90% of the coding sequence), we selected 109,885 mutants for fitness analysis (see Methods). Also, because insertions are performed using a *mariner* transposon, mutations only occur at TA dinucleotide sites in the genome (**Figure 1a**). We identified 51,853 out of 77,299 potential TA insertion sites in *Xcc* 8004 genome to be successful recipients of a transposon insertion, thus resulting in the large saturation of the genome (one insertion every 100 bp in average). Overall, our library contains mutants with at least one insertion mapped for 4,186 out of 4,617 with 3,674 genes included in our computational analyses (*ie.* genes that have at least one insertion with a unique barcode in the body of the gene).

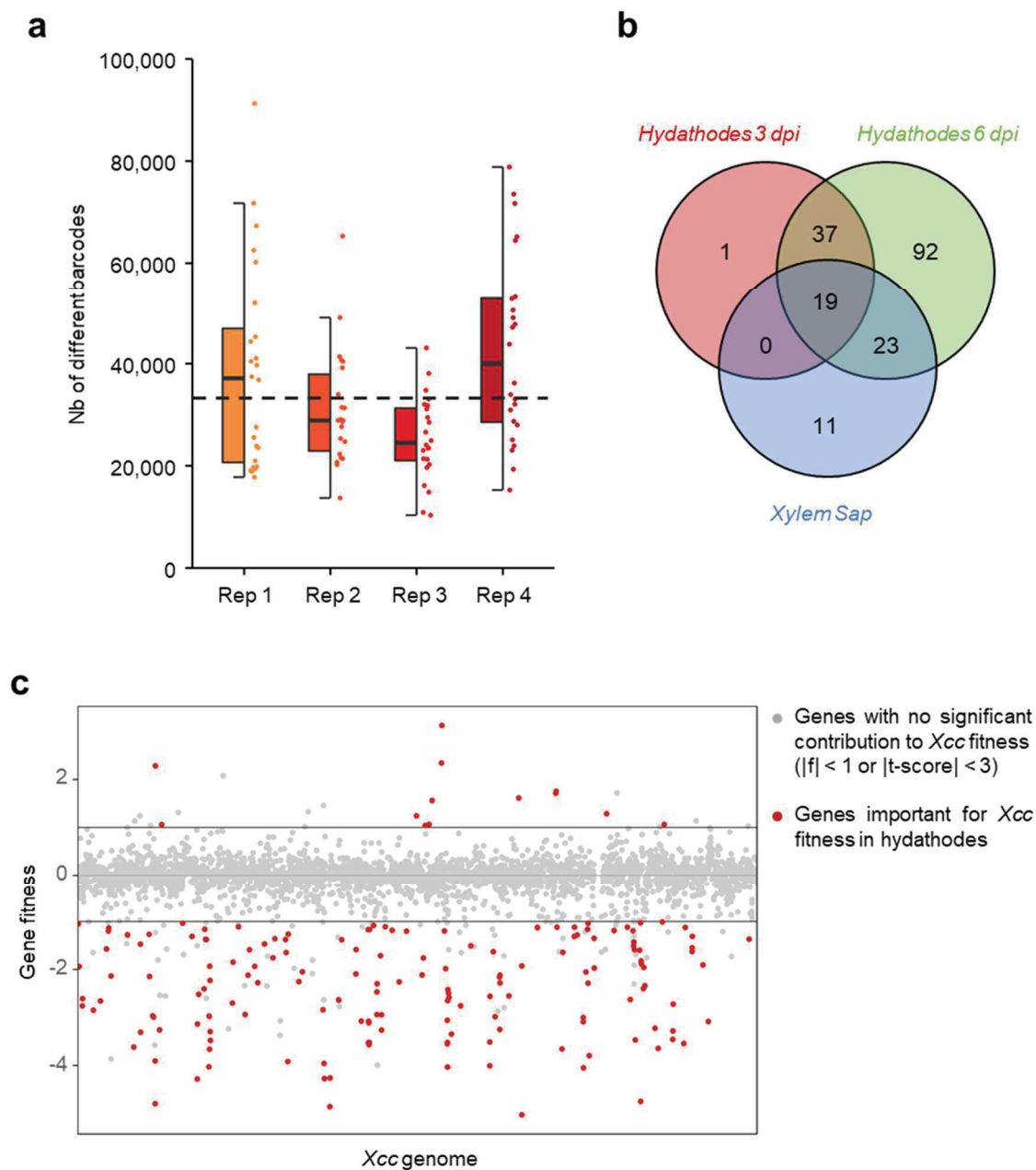


Figure 2 | RB-TnSeq identifies over 180 genes contributing to *Xcc* fitness in hydathodes and xylem sap.
a) Number of barcodes recovered 3 days after hydathodes inoculation with the RB-TnSeq library. The bottleneck was estimated based on 4 biological replicates ($n = 24$ hydathodes each). The dashed line indicates the mean of the 4 replicates. **b)** Venn diagram showing the overlap between genes contributing to *Xcc* fitness in hydathodes at 3 or 6 dpi and in xylem sap. **c)** Representation of the genome wide fitness phenotype of *Xcc* mutants after 6 days in the hydathodes. Red dots represent the genes that we consider to be directly involved in *Xcc* fitness (for details see Methods section).

Among the 431 genes that do not contain an insertion, 33 do not carry a TA site in their sequence and could not have been included in our study, while 125 do not have mutations within the body of the gene. Because of the high saturation of insertions, we supposed that mutations did occur in the other 273 genes but resulted in a lethal outcome. Consequently, we hypothesized that our genome-wide mutagenesis identified 273 essential genes in *Xcc* strain 8004 (**Table S1**). We performed a Gene Ontology enrichment analysis which highlighted that core cellular functions related to DNA replication, translation (tRNA metabolism and ribosome assembly), cell envelope (cell wall organization, peptidoglycan and fatty acids biosynthesis) and cell morphogenesis (cell shape, cell division) were significantly enriched in this subset of essential genes (**Figure 1b**). Nucleoside metabolism is also strongly affected in mono- and poly-phosphate purine and pyrimidine pathways. Regarding amino acids, only the lysine biosynthesis pathway seems essential for *Xcc* growth in the rich medium used to build the library.

RB-TnSeq fitness analysis identifies 172 genes required for *Xcc* multiplication in hydathodes.

Xcc is one of the few plant pathogens known to be able to enter the host via hydathodes pores. Since it is the first environment encountered by the bacterium in the plant, hydathodes are a particularly meaningful compartment to study through the scope of bacterial fitness. Because the apoplasm of hydathodes is filled with nutrient-depleted xylem sap, we hypothesized that *Xcc* encounter specific environmental conditions during the early infection process, including poor nutrient availability, osmotic stress and plant defenses that they need to overcome to establish successfully (Luneau et al., in prep). To determine which genes contribute to *Xcc* fitness in hydathodes, we performed a genome-wide screening using our RB-TnSeq library.

Due to the anatomy of the hydathodes, we expected that the tight entry points and the constrained space inside the tissue would act as a strong bottleneck in the inoculation process (Cerutti et al., 2017). Conveniently, thanks to the barcode feature of our library, the retrieval of individual infected hydathodes allowed us to precisely count the number of different *Xcc* mutant strains that enter the hydathodes during the inoculation procedure (**Figure 2a**; see Methods).

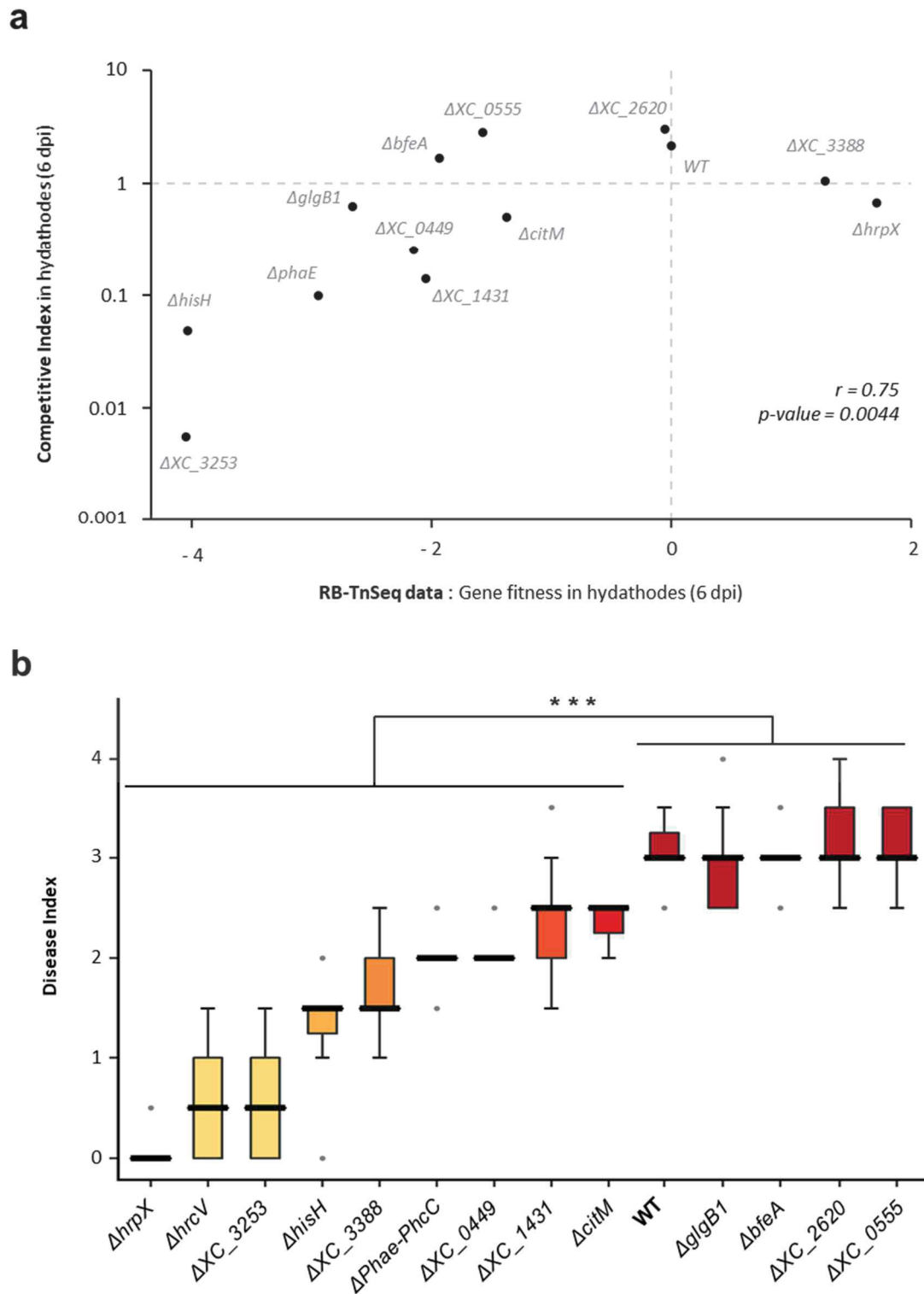


Figure 3 | Functional validation confirms the importance of selected candidate genes for *Xcc* fitness and pathogenicity. **a** Correlation between competition assays performed by challenging *Xcc* deletion mutants of candidate genes with the WT* strain and the RB-TnSeq data in hydathodes at 6 dpi. Spearman correlation coefficient and the associated p-value are indicated on the graph. **b** Pathogenicity assays in cauliflower leaves shows a diversity of phenotypes associated to the loss of genes contributing to *Xcc* fitness in hydathodes. Statistically significant differences are indicated according the Kruskal-Wallis test (***: p-value < 0.001).

We observed that an average of 35,000 bacterial strains could be inoculated within individual hydathodes during a single infection event. While this result was a prerequisite for estimating the number of hydathode samples needed to perform the screening in the best conditions, it also informs us on the capacity of hydathodes to host a massive population of *Xcc* during infections. Cauliflower hydathodes each display an average of 30 pores (Cerutti et al., 2017) which suggests that around 1,200 bacteria can enter each of the hydathode pores. This evaluation indicates that, under natural conditions, entry into hydathodes does not constitute a biological bottleneck. However, in the frame of the RB-TnSeq screening, this bottleneck effect strongly limits the inoculation to only a subset of the library mutants in the same micro-environment. In order to overcome a potential bias and obtain reproducible results, we sampled over 1,600 hydathodes from around 100 plants per biological replicate (**Figure S1**).

Previous work had demonstrated that *Xcc* infection remains contained into the cauliflower hydathodes for 6 days before entering the xylem vessels (Cerutti et al., 2017). We therefore chose to study the fitness of *Xcc* mutants after 3 and 6 days of hydathodes colonization, with the hope to decouple hydathodes early infection processes and adaptive responses in a settled population. We could identify 172 genes as directly contributing to *Xcc* fitness into hydathodes (**Table S2**). Almost all the genes found to be important at 3 dpi were also found at 6 dpi (**Figure 2b**). A large majority of the genes were sorted out by our RB-TnSeq screening because the associated mutants displayed a loss of fitness. A GO terms enrichment analysis revealed that functions related to the biosynthesis of cofactors, purine (Inosine Monophosphate), LPS and multiple amino acids were significantly associated with *Xcc* fitness in hydathodes. We also identified phosphate uptake and gluconeogenesis as statistically enriched pathways.

In order to go beyond the descriptive value of our dataset, we constructed 12 in-frame deletion mutants on candidate genes that we wanted to investigate further (**Table 1**). To validate the results of the large-scale fitness assay, the phenotype of these 12 mutants was assessed by a competition assay where each mutant was co-inoculated in a 1:1 ratio against the wild-type strain. At 6 dpi, Competitive Indexes (CI) values obtained in dip-inoculated hydathodes were well correlated with the RB-TnSeq data (Spearman correlation coefficient $r = 0.75$, $p\text{-value} = 0.0044$; **Figure 3a**). This observation validates the RB-TnSeq screening results and allows the extrapolation of descriptive loss of fitness into functional importance of mutated genes. We also evaluated the ability of our set of mutants to generate disease symptoms by wound inoculation

on cauliflower (**Figure 3b**). We could show that the $\Delta hisH$ (XC_2377) mutant, auxotrophic for histidine, the $\Delta citM$ (XC_0810) mutant, devoid of citrate transporter, and $\Delta PhaE-PhbC$ (XC_1958/XC_1959) mutant, impaired in the biosynthesis of the polyhydroxyalkanoate energy storage compound, displayed both a loss of fitness in the hydathodes and a defect in pathogenicity. Notably, two putative transcriptional regulators, XC_0449 and XC_1431, as well as two genes without any predicted functions, XC_3253 and XC_3388, were strongly affected in pathogenicity. This is particularly interesting because it emphasizes the strength of the RB-TnSeq approach to identify genes crucial for bacterial fitness without any *a priori* on their function or biological role.

Table 1 | List of genes selected for validation of the RB-TnSeq data

Gene 8004	Predicted Function	Gene name	Hyd 3dpi	Hyd 6dpi	Xylem sap	MME Glucose DropOut -LTH	MME Glucose	MOKA
XC_0143	1,4-alpha-glucan branching protein	<i>glgB1</i>	-1,93	-2,66	-0,08	-0,08	-0,15	-0,08
XC_0449	MarR family transcriptional regulator	-	-1,52	-2,15	-0,44	-0,24	-0,22	0,11
XC_0555	hypothetical protein	-	-4,47	-1,57	-0,43	-0,67	-0,23	-0,34
XC_0810	citrate transporter	<i>citM</i>	-0,38	-1,38	-0,10	0,17	0,09	0,08
XC_1113	TonB-dependent receptor	<i>bfeA</i>	-0,46	-1,94	0,10	-0,02	-0,05	0,09
XC_1431	TetR family transcriptional regulator	-	-0,98	-2,05	-0,05	-0,48	-0,19	0,09
XC_1958	PHA synthase subunit	<i>phaE</i>	-1,99	-2,95	-0,77	0,44	0,31	0,10
XC_1959	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	<i>phbC</i>	-1,79	-3,27	-0,90	0,43	0,22	0,03
XC_2377	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	<i>hisH</i>	-2,08	-4,04	0,04	-4,30	0,18	0,20
XC_2620	conserved plasmid protein	-	1,11	-0,06	-0,09	-0,56	-0,39	-0,10
XC_3076	DNA-binding protein	<i>hrpX</i>	0,29	1,71	0,13	-0,11	-0,04	0,00
XC_3253	hypothetical protein	-	-1,62	-4,05	-3,08	-0,63	-0,16	0,05
XC_3388	DUF1631 domain-containing protein	-	0,36	1,28	-0,35	-1,22	-0,89	-0,60

Metabolic adaptation is a key fitness determinant for *Xcc* into plant-associated environments

We then hypothesized that a xylem-dwelling bacterium such as *Xcc* is adapted to its vascular lifestyle, in particular from the nutrition standpoint. Therefore, we also investigated the genetic basis of *Xcc* adaptation to the xylem environment. However, because the inoculation of the xylem vessels by piercing-like methods imposes a very strong bottleneck, we decided to use xylem sap as a proxy for this environment. Xylem sap can be easily collected from cauliflower (Dugé de Bernonville et al., 2014) and the large amounts gathered allowed us to grow the RB-TnSeq library in flasks (*ex-planta*). We identified 53 genes as key fitness determinants of *Xcc* in xylem sap. While 11 are specific to this condition, 42 were also found to be required for hydathodes colonization at 6 dpi (**Figure 2b; Table S3**). Interestingly, we managed to identify 19 genes as commonly important for *Xcc* fitness in all three plant-

associated conditions investigated here (hydathodes 3 dpi, 6 dpi and xylem sap; **Figure 2b**; **Table S4**). Only purine (Inosine monophosphate) biosynthesis as well as vitamins (NADH and Folate) and TCA cycle-related pathways are found in all cases. While this might seem revealing, these quasi-essential functions are also impacted *in vitro* and are therefore not specifically interesting for the study of *in planta* fitness (**Figure S3**). Nevertheless, we sorted out ppGpp metabolism as specifically important in our screening in xylem sap, suggesting that *Xcc* faces adverse conditions that require a stringent response. We did not detect a strong metabolic signature of *Xcc* adaptation into xylem sap as compared to hydathodes. Remarkably, it was the opposite: biosynthesis of almost all amino acids (except cysteine, methionine, proline and valine) were required for *Xcc* optimal multiplication into the hydathode compartment but were presumably not limiting in xylem sap (**Table S5**). Only mutants on the proline biosynthesis pathway showed a significant and specific fitness defect in xylem sap.

TnSeq vs. RNAseq: two sides of the same story

A recent study in our group investigated the physiology of *Xcc* in hydathodes using a transcriptomic approach (Luneau *et al.*, in prep). We saw that over 800 genes are deregulated in *Xcc* between early infection (4 hours post inoculation; hpi) and later settlement of the bacteria in the plant (3 days post inoculation). Because we identified overlapping pathways associated with *Xcc* lifestyle in the hydathodes using our RB-TnSeq approach, such as phosphate uptake and regulation of virulence factors, we decided to compare the transcriptomic response of *Xcc* in hydathodes to the RB-TnSeq results obtained here. We observed a complete lack of correlation between the RB-TnSeq results obtained at 6 dpi into the hydathodes and the change in genes expression between 4 hpi and 3 dpi (**Figure S3**). In fact, only 10 genes could be identified as differentially expressed in RNAseq and important for the competitive fitness of *Xcc* in hydathodes by RB-TnSeq. Here, we confirm the previous observations of Helmann *et al.* (2019) that both approaches are totally uncorrelated when studying a plant pathogen. One explanation is that they measure different aspects of bacterial physiology: while RNAseq captures a snapshot of the population's transcriptome at a given time of infection, RB-TnSeq compiles the history of individual cells over the whole infection period. The other reason is that RB-TnSeq looks at the direct contribution of each gene on bacterial fitness while RNAseq only

describes their expression level. Therefore, transcriptomic profiling by RNAseq and fitness assessment by RB-TnSeq are complementary approaches to study the same question.

RB-TnSeq in hydathodes quantifies the cost of virulence and identifies new putative regulators of pathogenicity

It is widely considered that virulence factors expressed by bacterial pathogens are important for their fitness in the host in the sense that they are critical to the colonization of this special niche. However, our experimental RB-TnSeq data shows that only a few genes identified as important for *Xcc* fitness in the hydathodes are related to virulence functions (He *et al.*, 2007; **Figure S5**). We see that genes involved in EPS biosynthesis and T2SS contribute to *Xcc* fitness, but none of the T3SS machinery components or Type III effectors, nor quorum sensing signal biosynthesis genes came out of the screen. However, we observe a gain of fitness in mutants associated with major regulators of virulence factors including the *hrpG* and *hrpX* transcriptional activator of the T3SS and the *rpfC* and *rpfG* genes encoding the two-component system involved in quorum sensing signal perception, as well as many transcriptional regulators involved in adaptive responses to the environment such as *xibR* (iron metabolism), *ravR* (response to oxygen tension), *hpaR* (extracellular proteases production), *vemR* (motility and exopolysaccharides production) and *clp* (exopolysaccharides and extracellular enzymes production) (**Table 2**).

Table 2 | Genes for which RB-TnSeq mutants displayed a gain of fitness during hydathodes infection

Gene 8004	locus_tag	locus_tag_NCBI	Gene name	Hyd 3dpi	Hyd 6dpi	Xylem sap	MOKA	MME Glucose	MME Glucose -LTH
XC_0486	XCC8004_a06231	XC_RS02465	<i>clp</i>	1,13	2,28	0,78	0,29	0,19	0,24
XC_0522	XCC8004_a06761	XC_RS02655	-	0,19	1,06	0,15	0,04	-0,05	0,04
-	XCC8004_a27231	XC_RS10905	-	1,23	1,24	1,23	0,28	0,02	0,02
XC_2228	XCC8004_a27921	XC_RS11215	<i>ravR</i>	0,03	1,04	-0,06	0,01	0,05	0,12
XC_2252	XCC8004_a28231	XC_RS11335	<i>vemR</i>	0,34	1,06	0,36	-0,10	-0,28	-0,42
XC_2272	XCC8004_a28471	XC_RS11435	<i>fliQ</i>	1,38	1,56	0,24	0,02	0,02	0,07
XC_2333	XCC8004_a29211	XC_RS11720	<i>rpfC</i>	1,25	2,34	0,73	0,25	-0,07	-0,28
XC_2335	XCC8004_a29231	XC_RS11730	<i>rpfG</i>	1,64	3,12	0,50	0,21	0,06	-0,12
XC_2827	XCC8004_a35451	XC_RS14235	<i>hpaR</i>	0,73	1,61	0,41	0,27	-0,02	0,04
XC_3076	XCC8004_a38371	XC_RS15490	<i>hrpX</i>	0,29	1,71	0,13	0,00	-0,04	-0,11
XC_3077	XCC8004_a38401	XC_RS15500	<i>hrpG</i>	0,76	1,75	-0,02	0,01	-0,19	-0,03
XC_3388	XCC8004_a42701	XC_RS17165	-	0,36	1,28	-0,35	-0,60	-0,89	-1,22
XC_3760	XCC8004_a47281	XC_RS19010	<i>xibR</i> (<i>xerR</i> , <i>xmbR</i>)	0,75	1,06	1,14	0,30	0,02	0,18

TnSeq approaches are prone to such counterintuitive results as they evaluate the fitness of individual cells in a population context. In particular, mutations associated with the production of public goods - resources secreted in the extracellular space that are available to

the whole population - can be subject to cross-complementation at the population level. Thus, while inactivation of individual genes may not allow the detection of fitness loss in a mixed population, mutation of the regulators suppresses the cost of expressing the set of virulence factors and sometimes results in an apparent gain of fitness. This cheater-like behavior is generally visible in dense bacterial populations. In our case, *Xcc* cells are confined and tightly-packed within hydathodes, which, in the light of our data, suggests (i) that hydathodes constitute a conducive environment for cheater-like behavior and (ii) that RB-TnSeq can finely quantify the cost of virulence during *Xcc* infection.

A closer look into the mutants displaying a gain of fitness in hydathodes revealed that 3 out of the 13 genes have not been characterized. Though XC_0522 is predicted to be a XRE-family transcriptional regulator, the functions of XC_3388 and XC_RS10905 remain elusive as they are annotated as encoding a “hypothetical protein” and a “stress-induced protein” respectively. However, due to their phenotype in hydathodes, we hypothesize that these 3 genes encode regulators of adaptation and/or pathogenicity. Among them, the Δ XC_3388 mutant shows a strong decrease in its ability to trigger disease symptoms and a rough phenotype on plates (**Figure 3b**). Consequently, we chose to focus our attention on understanding its role in *Xcc* physiology and fitness. We performed multiple functional validation assays to explore the consequence of XC_3388 deletion on *Xcc* and investigated motility, EPS production, extracellular enzyme secretion and *in vitro* growth (**Figure 4**). In addition to the loss of pathogenicity, the Δ XC_3388 mutant is hyper-motile on swimming plates and displays lower extracellular amylase activity. Additional metabolic fingerprinting on Biolog plates showed that the Δ XC_3388 mutant is affected in metabolism of glucose, glutamate, maltose and arbutin. Subsequent evaluation of growth on these carbon sources confirmed the deregulation of metabolic pathways, adding to the pleiotropic role of this putative regulator (**Figure S5**). Protein sequence analysis by BLAST revealed that XC_3388 is well-conserved within the gamma-proteobacteria genomes (> 25% identity on at least 50% sequence length). However, the only domain predicted in the sequence of XC_3388 is the domain of unknown function DUF1631 for which no information is available. Based on its wide impact on *Xcc* physiology and the fact that it was identified by RB-TnSeq with the same gain-of-fitness phenotype as major regulators, we conclude that XC_3388 is a novel regulator of virulence and adaptation in *Xcc*.

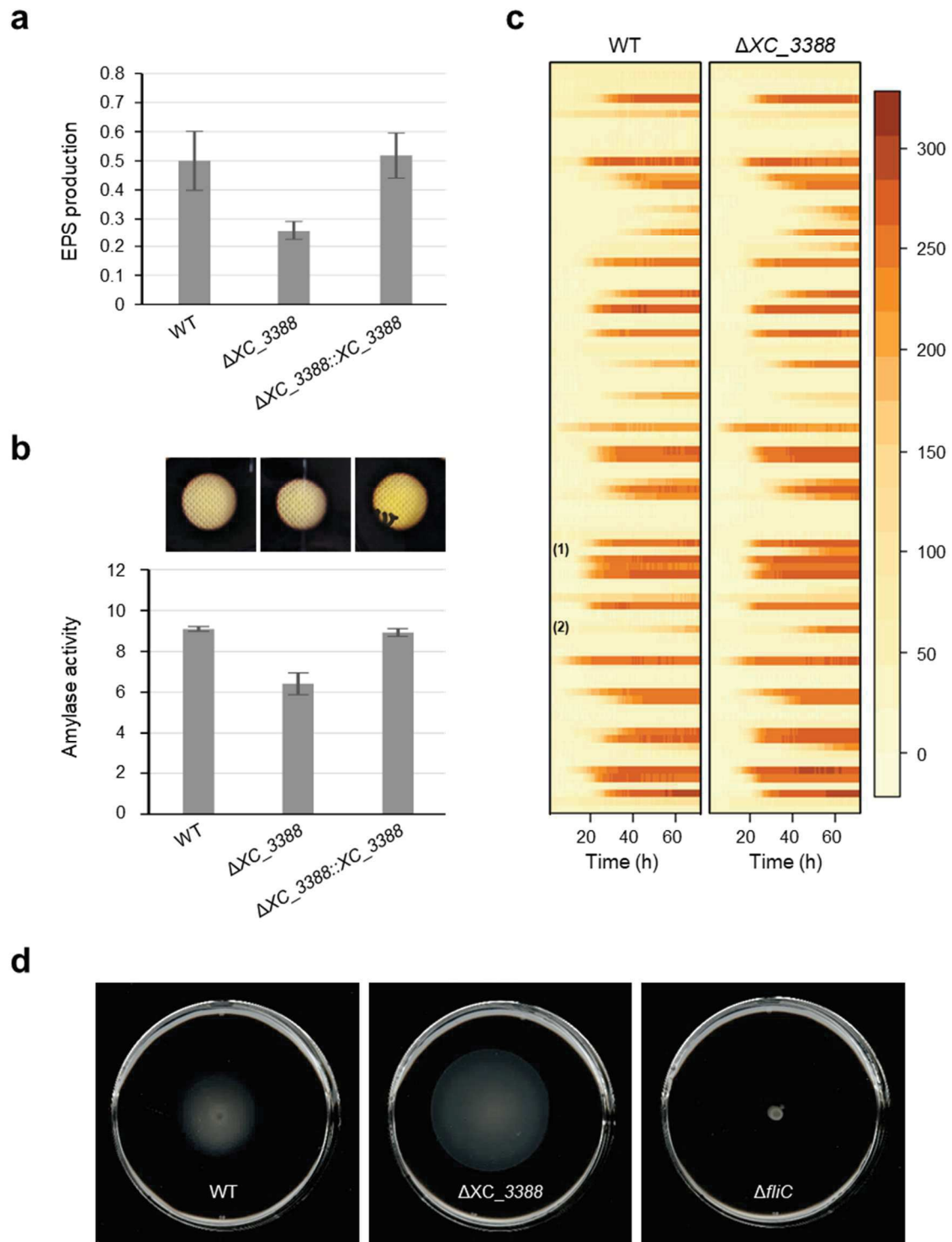


Figure 4 | Mutation of *XC_3388* leads to a pleiotropic deregulation of biological processes in *Xcc*. **a** Evaluation of exopolysaccharides (EPS) production by *Xcc* 8004, the ΔXC_3388 mutant and the $\Delta XC_3388::XC_3388$ complemented strain. **b** Evaluation of amylase activity in *Xcc* 8004, the ΔXC_3388 mutant and the $\Delta XC_3388::XC_3388$ complemented strain is obtained by quantifying the size of the degradation halo visible on plates as shown in the pictures. **c** Metabolic fingerprinting profiles of *Xcc* 8004 and the ΔXC_3388 mutant obtained with the Biolog PM1 plates (carbon sources). Each row shows the kinetics of metabolization for each individual compound. Numbers (1) and (2) indicate differences in glucose and glutamic acid metabolization respectively. **d** Photos of the plate motility assay used to investigate flagellar swimming abilities of *Xcc* 8004, the ΔXC_3388 mutant and the $\Delta fliC$ non-motile flagellin mutant.

Discussion

RB-TnSeq captures the importance of genes with unknown functions and provides new targets for pathogens control

The RB-TnSeq method is gaining in popularity thanks to its ability to screen at the genome-wide scale and provide phenotypic information about individual gene contribution to bacterial fitness. Price *et al.* (2018) exploited this feature to investigate the adaptive value of each gene from over 30 ecologically distant bacterial strains in multiple conditions. By measuring the contribution of each gene to specific conditions, they could produce co-fitness relationships and associate a functional relevance to 11,000 uncharacterized genes. Here, we chose to investigate the role of the conserved XC_3388 hypothetical protein and could show that it is a major regulator of adaptation and pathogenicity in *Xcc*. It was very recently shown that major pathogenicity regulators could be targeted by plant defense mechanisms to block the infection inside the bacterial cell. Indeed, (Wang et al., 2020) demonstrated that the sulforaphane secondary compound of *Arabidopsis thaliana* covalently modifies a residue of the HrpS T3SS activator in *Pseudomonas syringae* to impair disease development. In addition, (Singla-Rastogi et al., 2019) recently showed that plants direct small RNAs against pathogenic bacteria in a strategy called Antibacterial Gene Silencing (AGS). AGS against *P. syringae* triggered RNA interference in the production of the HrpL T3SS activator and significantly reduced the severity of disease symptoms. Expanding our knowledge of bacterial cell processes could therefore initiate the development of new biotechnology-derived control strategies against specific pathogens. In the same fashion, the list of essential genes that we provide for *Xcc* constitute an asset for the design of new antimicrobial compounds.

Amino acid biosynthesis is required for optimal fitness in plant-associated environments but each pathosystem is different

The main objective of this study was to identify bacterial fitness determinants involved in *Xanthomonas* adaptation to the *in planta* lifestyle. Using RB-TnSeq as a genome-wide screening method, we showed that over 180 genes are required for *Xcc* to fully thrive in hydathodes and xylem sap. The most represented function that we found to be important was amino acid biosynthesis. Consistently with previous TnSeq studies on plant pathogens, we

sorted out auxotrophic mutants as strongly affected in fitness. This observation suggests that certain metabolic pathways such as the biosynthesis of histidine are crucial for *in planta* fitness. Consequently, we can hypothesize that the apoplastic plant tissue environment is nutrient limited and that bacteria exploit to the best of their abilities the available sources of nutrients to sustain their growth. The same hypothesis was formulated by Helmann and colleagues (2019) who found that tryptophan, histidine and leucine/isoleucine/valine pathways mutants are limited in their growth during *Pseudomonas syringae* colonization of the bean leaf mesophyll. Interestingly they identified proline as an important biosynthetic pathway in leaf mesophyll, which we identified in xylem sap but not in hydathodes. On the other hand, Royet *et al.* (2019) identified the sulfur-containing amino acids methionine and cysteine as important requirements during *Dickeya dadantii* infection of chicory, which neither our study nor Helmann's did. Therefore, all these TnSeq results suggest that, even though amino acids are key cellular components, the needs of pathogenic bacteria are different and likely depend on their own metabolic capacities as well as the nutrient availability within the tissues of their host.

While it was recently shown that vascularization of phytopathogenic bacteria only relies on the presence of a single cellobiohydrolase (Gluck-Thaler *et al.*, 2020), hydathodes and xylem appear to be very different environments for which *Xcc* is adapted, at least from the nutrition standpoint. It could be argued that restarting the cultures in fresh xylem sap during the RB-TnSeq assay renewed the availability of nutritional compounds and thus prevented the detection of fitness defects in auxotrophic mutants. However true this remark is, it is important to keep in mind that the xylem environment *in planta* is characterized by a strong flux of sap which maintains a constant provisioning of nutrients (Brodersen *et al.*, 2019). We therefore conclude that the ability of *Xcc* to thrive in both hydathodes and xylem is a hallmark of its ability to adapt to the environments it colonizes during plant infection. Previous work on cabbage showed that xylem sap carries amino acids, organic acids and sugars in the low millimolar range and that most of these compounds are actively consumed by *Xcc* (Dugé de Bernonville *et al.*, 2014). However, there is no clear correlation between the abundance of amino acids or their utilization and the importance of biosynthetic genes for *Xcc* fitness in xylem sap. In the future, investigating the metabolomic composition of guttation fluids and xylem sap are needed to understand what is really available for *Xcc* in the cauliflower leaf. This would complement the current efforts spent on the reconstruction of bacterial metabolic networks and ultimately help comprehend the dynamics of plant infection by phytopathogenic bacteria (Kim *et al.*, 2019; Gerlin *et al.*, 2020).

Detection of cheaters highlights the ability of RB-TnSeq to investigate single strain fitness in a population context

An important observation of our study is the population behavior of the pool of *Xcc* mutants during hydathodes infection. Indeed, we could not detect any alteration of fitness in T3SS mutants. We suggested that this apparently intact fitness phenotype was in fact the consequence of cross-complementation at the population level. In a situation where a mutant defective in the production of a public good is surrounded by individuals carrying the WT phenotype, the producers mask the phenotype of the non-producer. This complementation in *trans* can then be seen as a problem for the evaluation of the fitness of individual mutants. However, it is a unique chance to study the real importance of genes for bacterial fitness in a population context. It is then normal to miss on the typical public goods such as quorum sensing signal production or T3SS-mediated immunity suppression that are shared between members of the community. Here, we obtain two interesting outcomes: (i) amino acids identified as required for fitness cannot be obtained by cross-feeding between *Xcc* individuals and (ii) mutants for costly processes that can be shared behave like cheaters and display a gain of fitness. This is the case for the transcriptional activators of the costly T3SS, *hrpG* and *hrpX*, for which mutants benefit from the cooperators without experiencing the cost of production as described for *Salmonella typhimurium* (Sturm et al., 2011). According to the Black Queen Hypothesis, it becomes evolutionarily more advantageous in the short term to lose these costly genes rather than carry them (Morris et al., 2012). Nevertheless, in the grand scheme of *Xcc* life cycle, losing the ability to repress host immunity appears as a weakness to initiate infection into the next host and is likely counter-selected. However, this observation suggests that it would be possible for non-pathogenic strains present in the phyllosphere to co-infect the host along a pathogenic one and take advantage of it to multiply efficiently.

Host and bacterial factors can counter-select cheaters emerging from social cooperative behaviors

Surprisingly, not all shared goods follow the Black Queen Hypothesis. Indeed, we observed a loss of fitness in T2SS-deficient mutants in our TnSeq assay. In *Xcc*, the T2SS allows the secretion of cell wall degrading enzymes into the environment which produces oligosaccharides-derived carbon sources and facilitates *Xcc* movement within the host. Given

the nature of the T2SS, enzymes secreted in the environment are expected to diffuse freely and thus benefit all the individuals of the community. Yet, it seems to be important for individual cells. One possibility would be that an important T2SS substrate is not secreted into the extracellular medium and remains anchored into the outer membrane. This phenomenon has been shown to happen in the *Dickeya dadantii* phytopathogen, wherein the PnlH outer membrane protein is exported through the TAT pathway but remains associated with the outer envelope of the cell (Ferrandez and Condemine, 2008). Another explanation could be the limited diffusion of either the enzymes or the degradative products in the medium.

Moreover, there is a growing amount of results showing the importance of spatio-temporal heterogeneity in the dynamics of microbial populations (Ackermann, 2015; Friesen, 2020). The physical environment of the host tissues could therefore play an important role in the viability of cheaters during the infection. While we showed that there is no strong bottleneck at the entry step into hydathodes, we know that *Xcc* can massively accumulate in the epithem which provides favorable conditions for the multiplication of cheaters. The passage from the hydathodes to the xylem then constitutes a putative bottleneck, in which the structure of the host could be the main driver to control the frequency of cheaters in the population. The same argument applies to mesophyll colonization from xylem vessels at later stages of the infection. The structural organization of the host tissues also conditions the isolation of bacterial individuals and therefore leads them to challenge their intrinsic fitness. It was for example nicely shown by Rufian and colleagues that *Pseudomonas syringae* infection of tomato leaves mesophyll counter-selects cheaters at low density but supports them at high density (Rufián et al., 2016). Similarly to what we suggest in *Xcc*, they showed that this opportunistic niche occurring throughout the colonization process allows the expression of phenotypic heterogeneity in an isogenic population. Division of labor, whereby bacterial sub-populations emerge by differentially expressing costly cellular components, could therefore constitute an important adaptive strategy leading *Xcc* to an increased fitness in hydathodes. This distribution of costly biological processes was observed once in *Xcc* during xylem colonization, where two subpopulations emerge that differ on their perception of the quorum sensing signals (Samal and Chatterjee, 2019). Interestingly, authors showed that the frequencies of each subpopulation changed during host colonization to favor heterogeneity during early disease stages and became more homogeneous at later stages when densely-packed cells all need to acquire nutrients. It is also worth noting that in the human pathogen *Salmonella typhimurium*, the expression of an

avirulent T3SS-deficient phenotype is necessary to control the emergence of genetic mutants that could have a deleterious effect on disease progression (Diard et al., 2013).

Methods

Bacterial strains and growth media

In this study, we used the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reference strain 8004 (Daniels et al., 1984), a spontaneous rifampicin-resistant derivative of the *Xcc* NCPPB No. 1145 isolated from cauliflower in Sussex, UK, in 1958, which had its genome sequenced by (Qian et al., 2005). We also used the *Xcc* 8004::GUS-GFP strain constructed by (Cerutti et al., 2017) as a recipient for the RB-TnSeq library and as a genetic background for all the deletion mutants. The *Xcc* 8004::GUS*-GFP* variant contains a point mutation inactivating the catalytic sites of both reporter protein as described in Luneau et al. (in press). We cultivated *Xcc* in MOKA rich medium (4 g.l⁻¹ Yeast extract, 8 g.l⁻¹ Casamino acids, 1 mM MgSO₄ and 2 g.l⁻¹ K₂HPO₄; Blanvillain et al., 2007), MME Glucose poor medium (10.5 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 4.5 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 0.15% (w/v) Casamino acids, 20 mM Glucose; Arlat et al., 1991) or MME Glucose complemented with DropOut -Leucine/Tryptophan/Histidine supplements instead of casamino acids (10.5 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 4.5 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 0.15% (w/v) DropOut -LTH, 20 mM Glucose) at 28°C under agitation at 200 rpm or on MOKA-agar plates.

To obtain clean deletion mutants, we used the SacB method (Schäfer et al., 1994) and constructed pK18 derivatives containing regions homologous to the genomic sequences upstream and downstream of the gene of interest to be removed by double-recombination. For *in trans* complementation, we constructed pK18_CompR3 plasmid derivatives to allow the genomic insertion of the complementation cassette in a neutral site between genes *XC_1301* and *XC_1302* (Luneau et al., in prep). We used the *Escherichia coli* strain TG1 as carrier for the plasmids and the helper strain pRK2073 to introduce plasmids into *Xcc* by triparental conjugation (Figurski and Helinski, 1979; Ditta et al., 1980). We grew *E. coli* strains at 37°C on LB-agar or liquid LB under shaking at 200 rpm. When appropriate, we used the antibiotics rifampicin (50 µg.ml⁻¹), kanamycin (50 µg.ml⁻¹), spectinomycin (40 µg.ml⁻¹) and the fungicide

pimaricin (30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). The lists of strains, plasmids and primers used in this study are presented in **Table S6** and **Table S7**.

Plant material and xylem sap harvest

We used *Brassica oleracea* var *botrytis* cv. Clovis F1 cauliflower as a plant host model because of its susceptibility to *Xcc* infection and the large size of its leaves which display thick hydathodes conveniently visible with the naked eye. We grew plants under greenhouse conditions and used them at 4 weeks after sawing. For all the RB-TnSeq, competition and pathogenicity assays, we inoculated the second true leaf of each plant (second leaf above the cotyledons). We then kept plants in classical growth chambers conditions until completion of the experiment: 9 h light; 22°C; 70% relative humidity. For RB-TnSeq screening of *Xcc* genes involved in the adaptation to xylem sap, we collected root-pressure exudates from cauliflower as described in Dugé de Bernonville *et al.* (2014). Briefly, we decapitated the cauliflower stem above the cotyledons, rinsed with distilled water and manually collected the excreted fluids (here called xylem sap). Though we discarded the two first rounds of collection to avoid plant debris contamination, we sampled xylem sap throughout the day, pooling the samples of multiple plants altogether and immediately storing them at -20°C.

Construction of the RB-TnSeq library and transposon insertion site sequencing

We constructed the RB-TnSeq barcoded transposon insertion library by (i) conducting transposon mutagenesis using a barcoded *mariner* transposon library and (ii) performing the mapping of transposon insertion sites as well as barcode association, as previously described (Wetmore *et al.*, 2015). The *E. coli* WM3064 donor library containing the barcoded mariner plasmid, pKMW3, was recovered from a glycerol stock in LB kanamycin containing 300 μM diaminopimelic acid (DAP) and conjugated into *Xcc* 8004::GUS-GFP overnight on MOKA plates containing DAP. The many separate conjugations were then resuspended as a single pooled mixture and spread on MOKA kanamycin plates for selecting mutants. Over 590,000 kanamycin-resistant *Xcc* colonies were pooled for the library. All colonies were resuspended in

250 mL MOKA kanamycin, diluted to a starting OD₆₀₀ 0.2 and grown at 28 °C with shaking to OD₆₀₀ 1.0. Finally, 250 µL 80% glycerol was added to 1-mL aliquots and frozen at -80 °C.

Fitness screening in hydathodes

The RB-TnSeq library is kept as aliquots at -80°C. For each biological replicate, we fully melted a single 2 ml-aliquot of the library and grew the culture overnight at 28°C with shaking at 200 rpm in 125 ml of MOKA medium. We washed twice the culture by serial centrifugation (6,000 x g, 10 min) and resuspension cycles in MgCl₂ 1mM. After measurement of OD₆₀₀, we pelleted 10⁹ *Xcc* cells by centrifugation at 13,000 x g for 5 min and stored them at -80°C to be used as T₀ samples. From the rest of the washed suspension, we adjusted the *Xcc* inoculum to OD₆₀₀ = 0.1 (10⁸ cfu/ml) in MgCl₂ 1mM + 0.5% v/v Tween 80 and we performed hydathodes inoculation by dipping cauliflower leaves for 15 s inside the bacterial suspension (Cerutti et al., 2017). Because infection of the hydathodes relies on the guttation process, we placed plants in growth chamber conditions and covered them with a mini-greenhouse lid to reach 100% relative humidity during 24h. We then removed the lids and allowed the infection to proceed for 3 or 6 days. After incubation, we retrieved *Xcc* populations by macro-dissection of hydathodes (16 per leaf) using a 1.5 mm-diameter Biopsy Punch (Miltex®, Electron Microscopy Sciences). In total, we collected around 1,650 hydathodes for each of the four biological replicates. During sampling, hydathodes were placed in MgCl₂ 1mM to be later bead-grinded for 2 min at 30 Hz. We performed DNA extraction using the Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit but we included an additional protein degradation step by incubating the samples with 400 µg/ml of proteinase K at 37°C for 1h before protein precipitation. Samples were stored at -80°C until preparation for barcode sequencing.

Fitness screening *in vitro*: Xylem sap & synthetic media

Similarly to the screening *in planta*, we prepared a culture of the RB-TnSeq library from stored aliquots, grew it in MOKA for 4 hours at 28°C with 200 rpm agitation and washed it twice in MgCl₂ 1mM. Again, we pelleted 10⁹ *Xcc* cells by centrifugation at 13,000 x g for 5 min and stored them at -80°C to be used as T₀ samples. From the rest of the washed suspension, we

adjusted the *Xcc* inoculum to $OD_{600} = 0.05$ ($5 \cdot 10^7$ cfu/ml) in 10 ml of either 0.22 μ m-filtrated cauliflower xylem sap, MOKA rich medium, MME + Glucose poor medium or MME - Casa + Glucose + DropOut -LTH. We incubated all cultures at 28°C under agitation at 200 rpm. Because the differences in fitness become more noticeable over time, it is important to keep in mind that the clarity of RB-TnSeq results depends on the number of generations. Therefore, we allowed bacterial growth to go up to 6-7 generations in all media. However, except in MOKA rich medium, *Xcc* growth could not attain such a number of generations before reaching the stationary phase. We therefore chose to restart cultures at the end of the exponential phase by centrifugation (6,000 x g, 5 min) and resuspension of the whole population in a larger volume of fresh medium at $OD_{600} = 0.05$. At the end of the growth, we pelleted 10^9 *Xcc* cells by centrifugation at 13,000 x g for 5 min and stored the pellets at -80°C until DNA extraction (same protocol as before).

Barcode sequencing and calculation of gene fitness

Barcode sequencing, mapping, and analysis to calculate the relative abundance of barcodes was done using the TnSeq methodology and computation pipeline developed by Wetmore *et al.* (2015); the code is available at <https://bitbucket.org/berkeleylab/feba/>. For each experiment, fitness values for each gene are calculated as a log2 ratio of relative barcode abundance after library growth in a given condition divided by relative abundance in the time0 sample. Fitness values are normalized across the genome so the typical gene has a fitness value of 0. Fitness values from sequencing replicates were averaged for each experiment.

Fitness data analysis

We considered genes to be important for *Xcc* fitness when the mutants were strongly affected, *i.e.* $|f| > 1$ and when this phenotype was deemed robust, *i.e.* $|t\text{-score}| > 3$ (Wetmore et al., 2015; Helmann et al., 2019). Because we did four independent biological replicates of each screening experiment, we decided to only retain genes that match those criteria in at least three of the four replicates. Such stringent requirements assured us to select robust and biologically relevant phenotypes with good confidence. We performed data mining and graphic representations with

R version 3.6.3. Enrichment analysis considering gene ontology was then conducted using the topGO package version 2.40.0 using Fischer's test and p-value < 0.01 (Alexa et al., 2006).

Competition assays

We used competition assays to validate the RB-TnSeq screening *in planta* by co-inoculation of two strains of interest in a 1:1 ratio. We mixed the *Xcc* strain 8004::GUS*-GFP* (reference strain, hereafter WT*) and deletion mutants in the 8004::GUS-GFP background (challengers) to assess the fitness of the latter as described in Luneau et al. (in press). Briefly, we inoculated cauliflower hydathodes with the same protocol as for the RB-TnSeq assay except that we adjusted the inoculum suspensions to OD₆₀₀ = 0.05 for each strain (final OD₆₀₀ = 0.1) in MgCl₂ 1mM + 0.5% v/v Tween 80. In order to maximize the throughput of the validation assays, we chose to inoculate only one plant for each of the mixes. We plated inoculation suspensions to use as T₀ reference samples as well as 6 dpi samples consisting of 16 pooled and grinded hydathodes. The Competitive Index (CI) of each strain was calculated as the ratio of the relative frequencies of mutant vs. reference strains in the 6 dpi infected sample compared to the T₀ inoculum (Taylor et al., 1987; Macho et al., 2007). Hence, we consider a CI > 1 as a gain of fitness of the mutant compared to the WT* reference strain and a CI < 1 as a loss of fitness. We performed 4 independent biological replicates of the competition assays for all strains tested.

Pathogenicity assays

We evaluated bacterial aggressiveness of the mutant strains by piercing-inoculation in the midrib of cauliflower leaves using a needle dipped in a *Xcc* inoculum adjusted at OD₆₀₀ = 0.1. We assessed disease progression at 7 and 10 days post-inoculation according to the annotation scale presented in Luneau et al. (in prep). We performed pathogenicity assays in three independent biological replicates of five individual plants each. Significance of differences observed in symptoms severity was assessed using the non-parametric Kruskal-Wallis test with $\alpha = 0.05$.

Motility

Overnight cultures of *Xcc* in MOKA were washed by centrifugation (4,000 x g; 5 min) and resuspended in sterile water. 2-μl of bacterial suspensions adjusted at 10⁸ cfu/mL were spotted on swimming plates (0.03% Bacto peptone, 0.03% yeast extract, 0.3% agar; Su *et al.*, 2016) and incubated 48 h at 28°C. Ability to perform flagellar motility was assessed by the presence and size of white halos expanding from the colonies.

Extracellular enzymes activity assay on plates

Extracellular enzymatic assays of *Xcc* strains were tested by spotting 5 μL of an overnight culture adjusted to 4.108 cfu/mL on plates containing 15-mL of different phenotypic agar-containing media. Plates were incubated at 28 °C and imaged 24 hours post inoculation. Diameters of colonies and halos of degradation were measured to calculate enzymatic activity as follows: $PrA = [\pi(r_{halo})^2 - \pi(r_{colo})^2] / [\pi(r_{colo})^2]$ with “r” corresponding to the radius. Each experiment was biologically replicated at least three times. For *protease activity* assays, *Xcc* cells were spotted on 0.5 % skimmed milk MOKA plates supplemented with 30 μg/mL pimaricin (Luneau *et al.*, in prep). For *Amylase activity* assays *Xcc* cells were spotted on 0.125 % potato starch (prolabo, VWR) MOKA plates supplemented with 30 μg/mL pimaricin. After a 24h incubation step at 28°C and colonies diameter measurement, bacterial cells were washed using distilled water and plates were stained using lugol solution until a strong blue coloration and starch degradation halo appeared.

Measurement of exopolysaccharide production

Extracellular EPS production was measured as described (Luneau *et al.*, in prep). Briefly, an overnight growth of each strain in MOKA was used to inoculate 20 mL of MOKA supplemented with 50 μg/mL of rifampicin at 2.10⁷ cfu/mL. After 24 hours of growth, 12 mL were centrifuged for 15 min at 6,500 x g. EPS present in the supernatant were precipitated with ethanol. Bacterial and EPS pellets were dried for 8 hours at 65°C before being weighed. EPS production corresponds to the ratio of dry weight EPS on dry weight bacterial cells.

Carbon and nitrogen substrates phenotyping

Metabolic properties of WT and mutant strains were characterized using OmniLog-Biolog technology. Carbon and nitrogen sources utilization were assayed using Biolog phenotype microarray plates PM1, PM2A and PM3B (PM; Biolog, Hayward CA) according to the manufacturer's protocol. *Xcc* cells were grown in rich MOKA medium overnight at 28°C. Cells were collected and resuspended in IF-0 (for PM1 and PM2A) or IF-0 20mM glucose (for PM3B) supplemented with 1× Biolog Redox Dye Mix H, at initial optical density (OD_{600nm}) of 0.08 for plates inoculation (100 µl/well). Incubation time was 72 h in the OmniLog instrument (Biolog, Hayward, CA) at 28°C. Two to three independent replicates were performed. Results were analyzed using the R opm script as previously described (Vaas et al., 2012; Vaas et al., 2013).

Growth measurements *in vitro*

In vitro growth curves were generated using a FLUOStar Omega apparatus (BMG Labtech, Offenburg, Germany) and 96-well flat-bottom microtiter plates (Greiner) with 200 µL of bacterial suspensions. After an overnight preculture in MOKA rich medium, cells were harvested by centrifugation at 9,500 x g for 4 minutes, washed and resuspended in MME minimal medium. Bacterial suspensions inoculated at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.15 were prepared in MME or MME supplemented with either glucose, glutamate, maltose or arbutin at 20 mM and MOKA media. For each experiment, we performed 4 replicates coming from 2 independent precultures. The microplates were shaken continuously at 700 rpm using the linear-shaking mode. Each experiment was repeated 3 times and a representative experiment is shown.

Conclusion

We identified over 180 genes as key fitness determinants that *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires to efficiently thrive into hydathodes and xylem sap. A further investigation of 12 genes validated our RB-TnSeq approach and uncovered the importance of uncharacterized

genes for the regulation of adaptive traits during host infection. We also retrieved major regulators of adaptation and pathogenicity and hypothesize that they are involved in social cooperative behaviors at the population level. In particular, we characterized the role of the XC_3388 hypothetical protein in the physiology of *Xcc* and show that it is a novel regulator of adaptation and pathogenicity. We also provide a list of 300 essential genes in *Xcc* which reinforces our understanding of fundamental cell processes. Complementary studies in leaf mesophyll tissue will enable the generation of a multi-environment map of genetic fitness determinants and thus address the questions of tissue specificity. Ultimately, it will deliver considerable insights into the dynamics of adaptive processes during the infection cycle of this major *Xanthomonas* pathogen.

References

- Ackermann M** (2015) A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **13**: 497–508
- Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T** (2006) Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* **22**: 1600–1607
- An S-Q, Potnis N, Dow M, Vorhölter F-J, He Y-Q, Becker A, Teper D, Li Y, Wang N, Bleris L, et al** (2019) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* fuz024
- Arlat M, Gough C, Barber CE, Boucher C, Daniels M** (1991) *Xanthomonas campestris* Contains a Cluster of *hrp* Genes Related to the Larger *hrp* Cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**: 593
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M** (2007) Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLOS ONE* **2**: e224
- Brodersen CR, Roddy AB, Wason JW, McElrone AJ** (2019) Functional Status of Xylem Through Time. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 407–433
- Büttner D, Bonas U** (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107–133
- Cain AK, Barquist L, Goodman AL, Paulsen IT, Parkhill J, van Opijnen T** (2020) A decade of advances in transposon-insertion sequencing. *Nature Reviews Genetics* 1–15
- Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noel LD** (2017) Immunity at cauliflower hydathodes controls infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiol* pp.01852.2016

642 **Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019)
643 Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. Annual
644 Review of Phytopathology **57**: 91–116

645 **Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyk MK, Byrde RJW, Fielding AH** (1984) Cloning of genes
646 involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid
647 pLAFR1. The EMBO Journal **3**: 3323–3328

648 **Diard M, Garcia V, Maier L, Remus-Emsermann MNP, Regoes RR, Ackermann M, Hardt W-D** (2013)
649 Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. Nature **494**: 353–356

650 **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR** (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative
651 bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. PNAS **77**: 7347–7351

652 **Dugé de Bernonville T, Noël LD, SanCristobal M, Danoun S, Becker A, Soreau P, Arlat M, Lauber E** (2014)
653 Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas*
654 *campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. FEMS Microbiol Ecol **89**: 527–541

655 **Ferrandez Y, Condemine G** (2008) Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative
656 bacteria. Molecular Microbiology **69**: 1349–1357

657 **Figurski DH, Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a
658 plasmid function provided in trans. PNAS **76**: 1648–1652

659 **Friesen ML** (2020) Social Evolution and Cheating in Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology **58**: null

660 **Gerlin L, Cottret L, Cesbron S, Taghouti G, Jacques M-A, Genin S, Baroukh C** (2020) Genome-Scale
661 Investigation of the Metabolic Determinants Generating Bacterial Fastidious Growth. mSystems. doi:
662 10.1128/mSystems.00698-19

663 **Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj**
664 **D, Merfa MV, Pesce C, Jauneau A, et al** (2020) Repeated gain and loss of a single gene modulates the
665 evolution of vascular plant pathogen lifestyles. Science Advances **6**: eabc4516

666 **He Y-Q, Zhang L, Jiang B-L, Zhang Z-C, Xu R-Q, Tang D-J, Qin J, Jiang W, Zhang X, Liao J, et al** (2007)
667 Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity
668 among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas*
669 *campestris* pv. *campestris*. Genome Biol **8**: R218

670 **Helmann TC, Deutschbauer AM, Lindow SE** (2019) Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae*
671 genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast. PNAS **201908858**

672 **Kim H, Joe A, Lee M, Yang S, Ma X, Ronald PC, Lee I** (2019) A Genome-Scale Co-Functional Network of
673 *Xanthomonas* Genes Can Accurately Reconstruct Regulatory Circuits Controlled by Two-Component
674 Signaling Systems. Mol Cells. doi: 10.14348/molcells.2018.0403

675 **Leong SA, Ditta GS, Helinski DR** (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding
676 for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. J Biol Chem **257**: 8724–8730

677 **Macho AP, Zumaquero A, Ortiz-Martín I, Beuzón CR** (2007) Competitive index in mixed infections: a
678 sensitive and accurate assay for the genetic analysis of *Pseudomonas syringae*–plant interactions.
679 Molecular Plant Pathology **8**: 437–450

680 **Meline V, Delage W, Brin C, Li-Marchetti C, Sochard D, Arlat M, Rousseau C, Darrasse A, Briand M,**
681 **Lebreton G, et al** (2019) Role of the acquisition of a type 3 secretion system in the emergence of novel
682 pathogenic strains of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **20**: 33–50

683 **Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER** (2012) The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through
684 Adaptive Gene Loss. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.00036-12

685 **van Opijnen T, Levin HL** (2020) Transposon Insertion Sequencing, a Global Measure of Gene Function. *Annual*
686 *Review of Genetics* **54**: null

687 **Powell JE, Leonard SP, Kwong WK, Engel P, Moran NA** (2016) Genome-wide screen identifies host
688 colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *PNAS* **113**: 13887–13892

689 **Price MN, Wetmore KM, Waters RJ, Callaghan M, Ray J, Liu H, Kuehl JV, Melnyk RA, Lamson JS, Suh**
690 **Y, et al** (2018) Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* **557**:
691 503–509

692 **Qian W, Han Z-J, Tao J, He C** (2008) Genome-Scale Mutagenesis and Phenotypic Characterization of Two-
693 Component Signal Transduction Systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913.
694 *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1128–1138

695 **Qian W, Jia Y, Ren S-X, He Y-Q, Feng J-X, Lu L-F, Sun Q, Ying G, Tang D-J, Tang H, et al** (2005)
696 Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas*
697 *campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**: 757–767

698 **Royet K, Parisot N, Rodrigue A, Gueguen E, Condemine G** (2019) Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii*
699 genes required for survival in chicory plants. *Molecular Plant Pathology* **20**: 287–306

700 **Rufián JS, Sánchez-Romero M-A, López-Márquez D, Macho AP, Mansfield JW, Arnold DL, Ruiz-Albert**
701 **J, Casadesús J, Beuzón CR** (2016) *Pseudomonas syringae* Differentiates into Phenotypically Distinct
702 Subpopulations During Colonization of a Plant Host. *Environmental Microbiology* **18**: 3593–3605

703 **Rundell EA, McKeithen-Mead SA, Kazmierczak BI** (2016) Rampant Cheating by Pathogens? *PLOS Pathogens*
704 **12**: e1005792

705 **Samal B, Chatterjee S** (2019) New insight into bacterial social communication in natural host: Evidence for
706 interplay of heterogeneous and unison quorum response. *PLOS Genetics* **15**: e1008395

707 **Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A** (1994) Small mobilizable multi-purpose
708 cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions
709 in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73

710 **Singla-Rastogi M, Charvin M, Thiébeauld O, Perez-Quintero AL, Ravet A, Emidio-Fortunato A, Mendu V,**
711 **Navarro L** (2019) Plant Small RNA Species Direct Gene Silencing in Pathogenic Bacteria as well as
712 Disease Protection. *bioRxiv* 863902

713 **Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M, Benecke A, Ackermann M, Benz M, Dormann J, Hardt W-D** (2011)
714 The Cost of Virulence: Retarded Growth of *Salmonella Typhimurium* Cells Expressing Type III
715 Secretion System 1. *PLOS Pathogens* **7**: e1002143

716 **Su H-Z, Wu L, Qi Y-H, Liu G-F, Lu G-T, Tang J-L** (2016) Characterization of the GntR family regulator
717 HpaR1 of the crucifer black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Scientific*
718 *Reports* **6**: 19862

719 **Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ** (1987) Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus
720 colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *PNAS* **84**: 2833–2837

721 **Thibault D, Jensen PA, Wood S, Qabar C, Clark S, Shainheit MG, Isberg RR, van Opijnen T** (2019) Droplet
722 Tn-Seq combines microfluidics with Tn-Seq for identifying complex single-cell phenotypes. *Nature*
723 *Communications* **10**: 5729

724 **Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones**
725 **JB** (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol*. doi:
726 10.1038/s41579-020-0361-8

727 **Vaas LAI, Sikorski J, Hofner B, Fiebig A, Buddhuhs N, Klenk H-P, Göker M** (2013) *opm*: an R package for
728 analysing OmniLog® phenotype microarray data. *Bioinformatics* **29**: 1823–1824

729 **Vaas LAI, Sikorski J, Michael V, Göker M, Klenk H-P** (2012) Visualization and Curve-Parameter Estimation
730 Strategies for Efficient Exploration of Phenotype Microarray Kinetics. *PLOS ONE* **7**: e34846

731 **Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the
732 genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* **14**: 2–18

733 **Wang W, Yang J, Zhang J, Liu Y-X, Tian C, Qu B, Gao C, Xin P, Cheng S, Zhang W, et al** (2020) An
734 *Arabidopsis* Secondary Metabolite Directly Targets Expression of the Bacterial Type III Secretion
735 System to Inhibit Bacterial Virulence. *Cell Host & Microbe* **27**: 601-613.e7

736 **Wetmore KM, Price MN, Waters RJ, Lamson JS, He J, Hoover CA, Blow MJ, Bristow J, Butland G, Arkin**
737 **AP, et al** (2015) Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-
738 coded transposons. *MBio* **6**: e00306-00315

739

Supplementary figures

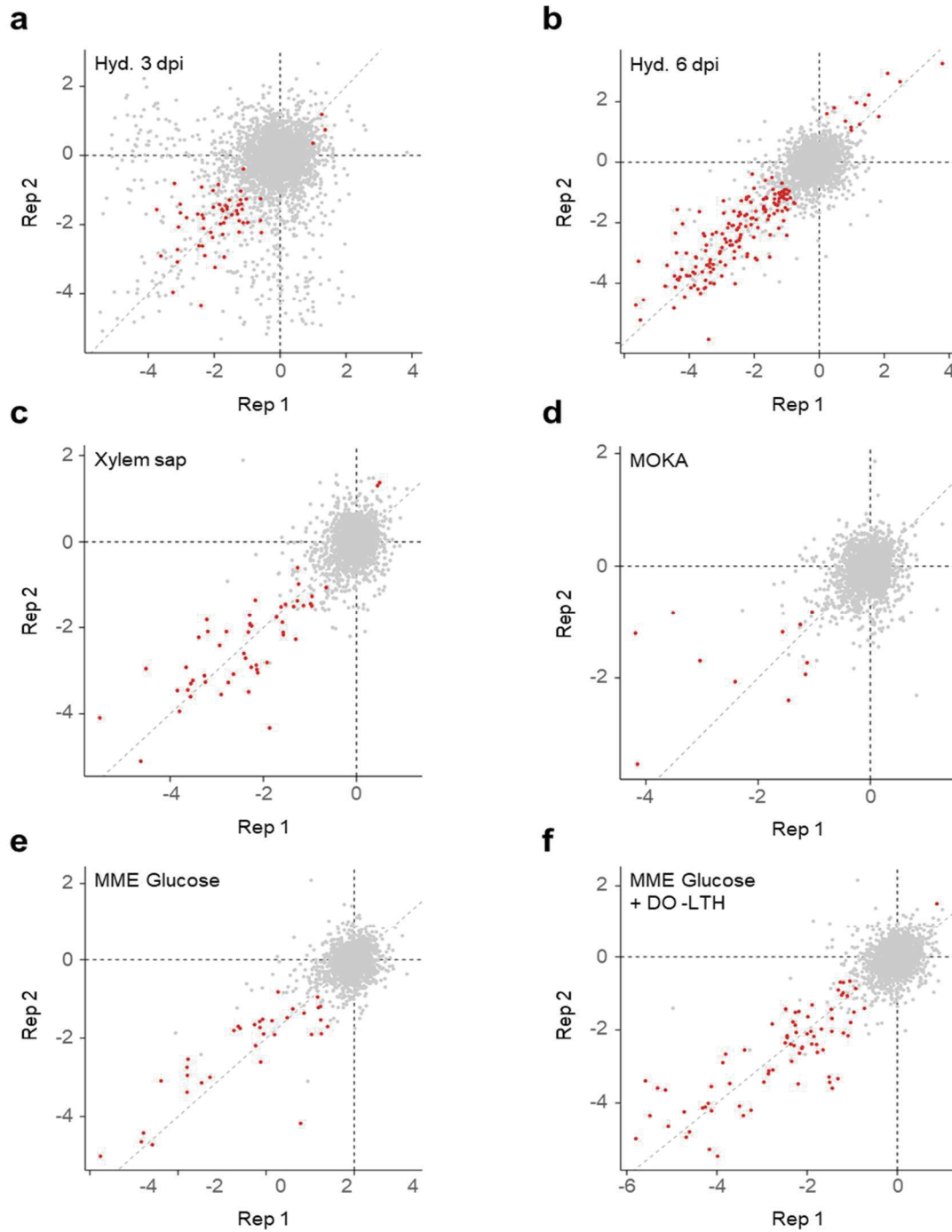


Figure S1 | Correlation between biological replicates of RB-TnSeq assays shows experimental reproducibility. We investigated the degree of correlation between biological replicates for all the environments tested in our study. **a** Hydathodes 3 dpi. **b** Hydathodes 6 dpi. **c** Xylem sap. **d** MOKA. **e** MME Glucose. **f** MME Glucose + DropOut –LTH. Each dot represents a gene. Red dots show the genes selected according to our criteria ($|f| > 1$ & $|t\text{-score}| > 3$). The grey dotted line traces the $y = x$ ideal correlation between the two replicates. Two out of four biological replicates are shown for each condition and are representative of the pair-wise correlations between all the replicates.

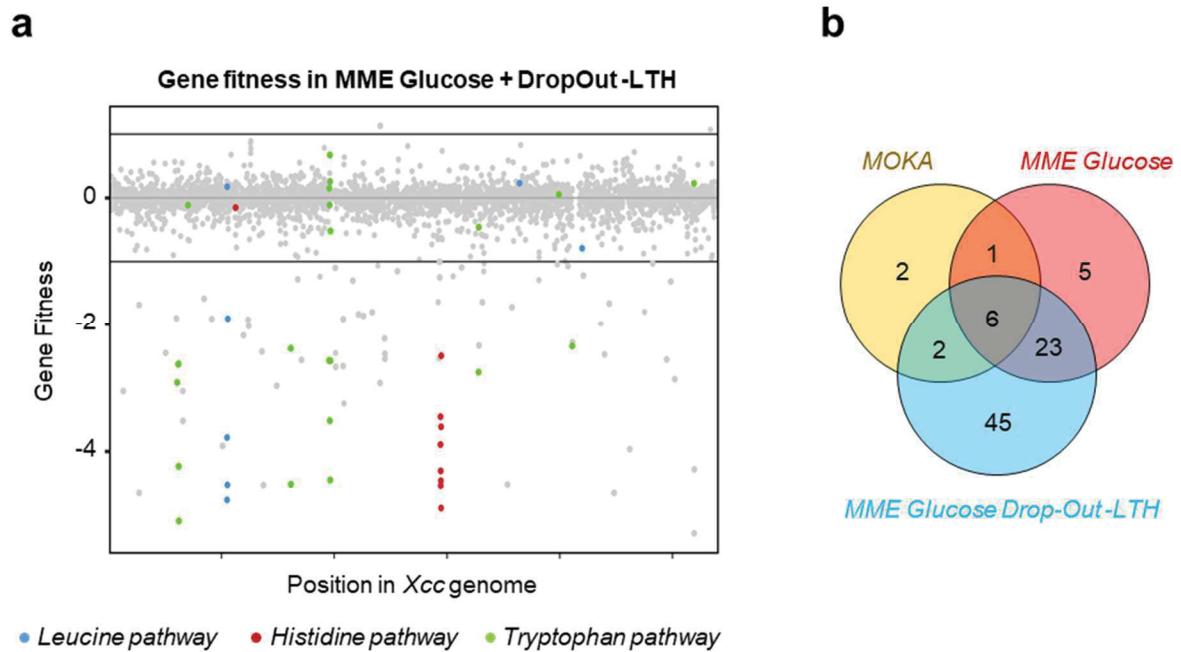


Figure S2 | RB-TnSeq results *in vitro*. **a** Genome-wide gene fitness assessment in MME Glucose DropOut –LTH medium. Genes related to the biosynthesis of Leucine, Histidine and Tryptophan are highlighted. We observe the expected loss of fitness of auxotrophic mutants in a medium lacking these three amino acids. This confirms the proper behavior of the *Xcc* RB-TnSeq library and the good quality of the readout for the evaluation of gene fitness. **b** Screening of *Xcc* genes important for *in vitro* growth identified quasi-essential genes and allowed us to exclude genes that are not specific to the plant-associated environments tested.

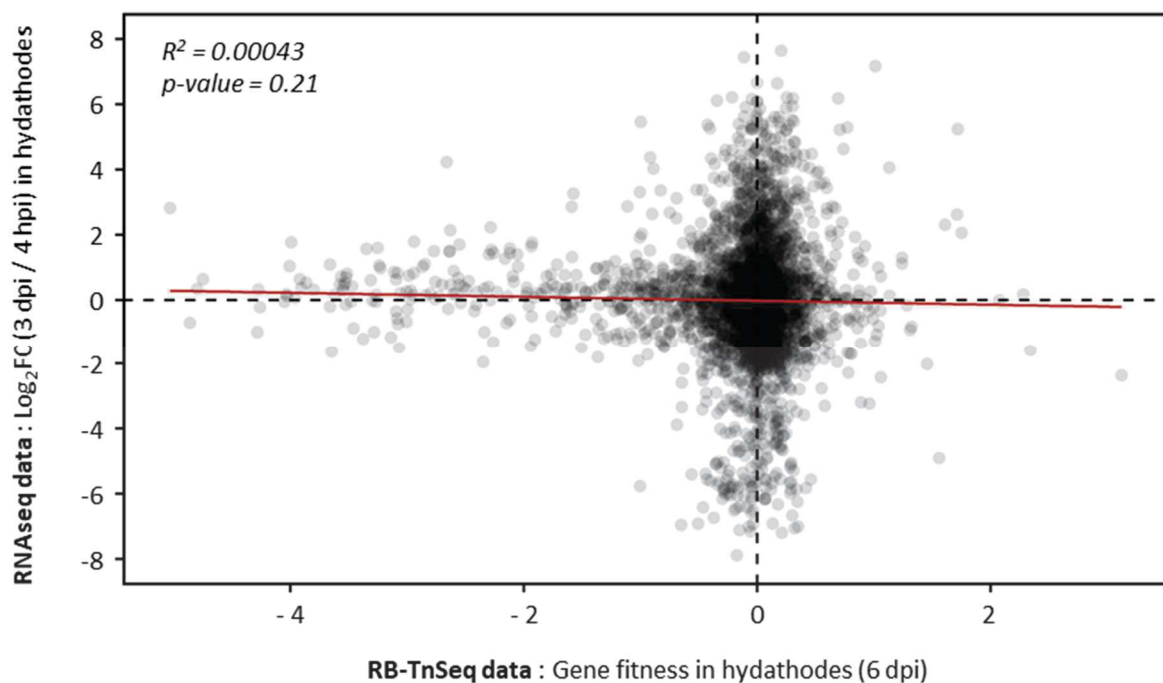


Figure S3 | Absence of correlation between *Xcc* RNAseq and RB-TnSeq data in hydatodes. We compared the fitness score associated with each gene in hydatodes at 6 dpi with the level of differential expression between 4 hours and 3 days post-inoculation in cauliflower hydatodes (Luneau et al., in prep). The red line shows the linear regression model ; R^2 : Pearson correlation coefficient.

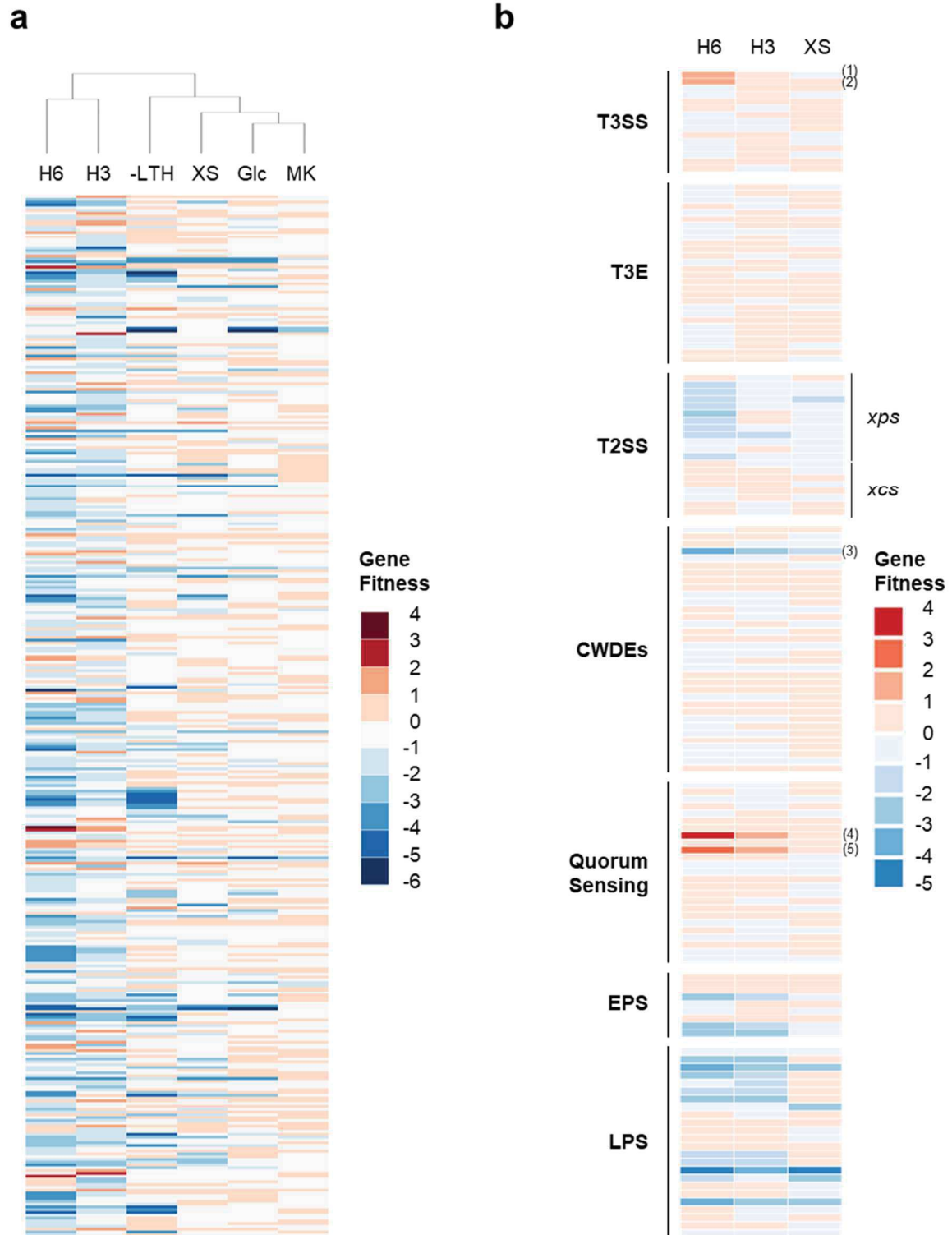


Figure S4 | Global fitness perturbations of *Xcc* mutants shows how stressful the plant environment is compared to *in vitro*. **a** Heatmap of *Xcc* genes found to be affected in fitness in at least one condition. H6: Hydathodes 6dpi; H3: Hydathodes 3dpi; -LTH: MME Drop-out -LTH; XS: Xylem sap; Glc: MME Glucose; MK: MOKA. **b** Heatmap of selected *Xcc* genes associated with virulence functions according to He et al., 2007. T3SS: Type III Secretion System; T3E: Type III Effector; T2SS: Type II Secretion System; CWDEs: Cell Wall Degradation Enzymes; EPS: Exopolysaccharides biosynthesis; LPS: Lipopolysaccharides biosynthesis. (1) XC_3077 (*hrpG*); (2) XC_3076 (*hrpX*); (3) XC_3886 (*bglX*); (4) XC_2335 (*rpfG*); (5) XC_2333 (*rpfC*).

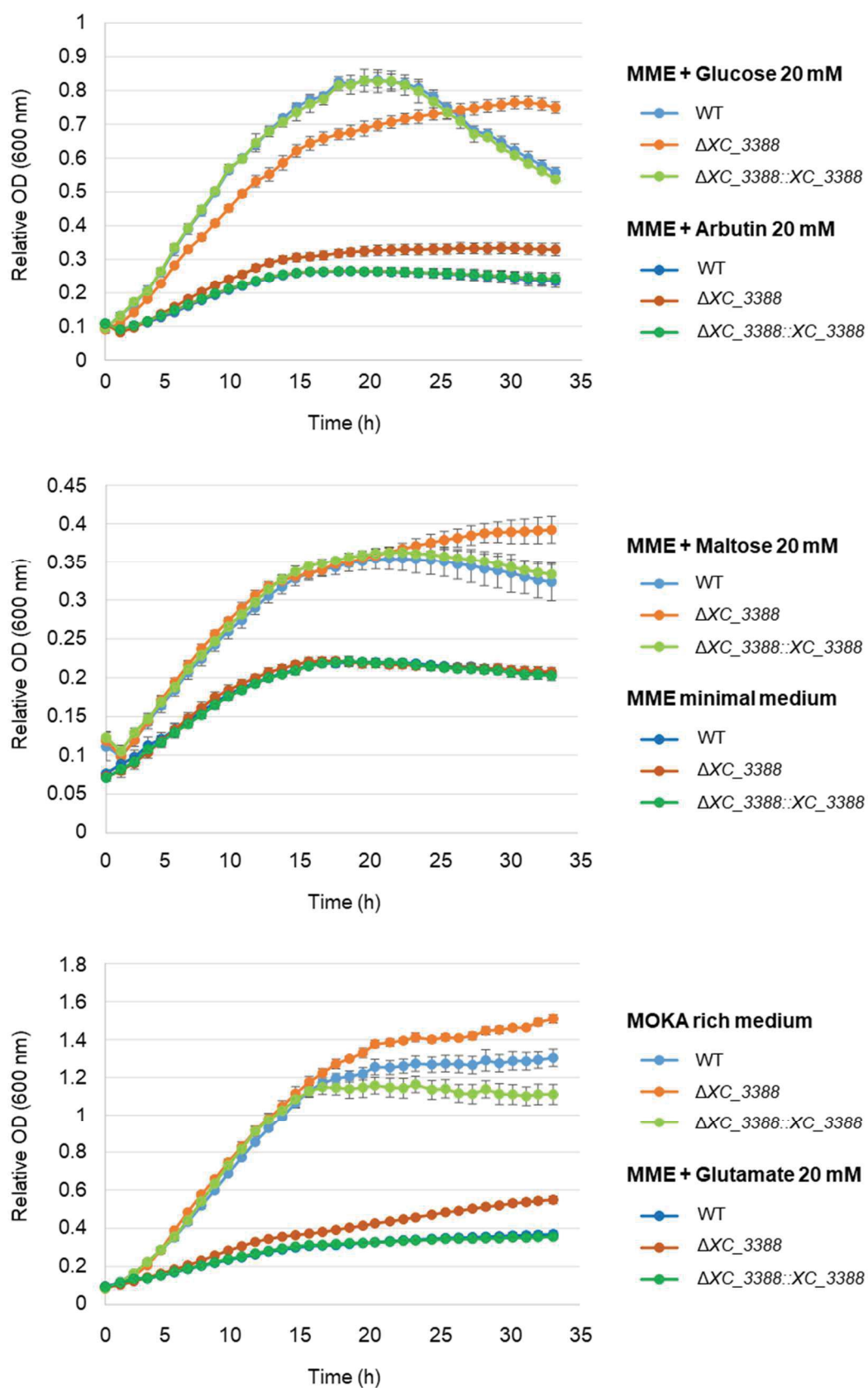


Figure S5 | Growth of the ΔXC_{3388} mutant on diverse carbon sources identified by metabolic fingerprinting.

Table S2 | 172 genes contribute to *Xcc* fitness during hydathodes colonization.

Gene 8004	locus_tag	Predicted Function	Hyd 3dpi	Hyd 6dpi	Xylem sap	MME Glucose DropOut -LTH	MME Glucose	MOKA
XC_0007	XCC8004_a00091	tetratricopeptide repeat domain protein	-0,69	-1,05	-0,19	-0,03	0,14	-0,22
XC_0012	XCC8004_a00161	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	-0,70	-1,94	-0,01	0,01	-0,11	0,27
XC_0031	XCC8004_a00421	glutamate synthase	-1,45	-2,76	-0,12	0,07	-0,11	-0,23
XC_0032	XCC8004_a00431	glutamate synthase large subunit	-1,31	-2,61	0,01	0,03	-0,15	-0,22
XC_0100	XCC8004_a01281	aromatic amino acid aminotransferase	-1,82	-2,85	-0,85	-1,93	-3,06	-1,55
XC_0143	XCC8004_a01841	1,4-alpha-glucan branching protein GlgB	-1,93	-2,66	-0,08	-0,15	-0,08	-0,08
XC_0186	XCC8004_a02321	cardiolipin synthase	-0,43	-1,58	-0,52	-0,65	-0,81	-0,70
XC_0196	XCC8004_a02471	ammonium transporter	-0,51	-1,20	0,07	0,01	-0,05	-0,01
XC_0198	XCC8004_a02501	nitrogen regulation protein NR(I)	-1,01	-1,14	-0,07	-0,08	-0,75	-0,22
XC_0213	XCC8004_a02681	preprotein translocase subunit SecB	-1,72	-2,14	-1,19	-1,36	-1,68	-0,75
XC_0329	XCC8004_a04001	DUF1852 domain-containing protein	-1,15	-1,28	-0,01	0,13	0,15	-0,64
XC_0356	XCC8004_a04481	dihydroxy-acid dehydratase	-1,38	-3,62	-0,05	0,18	0,01	0,12
XC_0399	XCC8004_a05011	8-amino-7-oxononanoate synthase	-0,30	-1,47	0,00	-0,34	-0,15	-0,02
XC_0400	XCC8004_a05021	biotin synthase	-1,28	-3,31	-0,04	-1,97	-2,46	-0,55
XC_0447	XCC8004_a05731	dihydroorotate dehydrogenase	-1,11	-1,27	-0,90	-0,55	-0,52	-0,45
XC_0449	XCC8004_a05761	MarR family transcriptional regulator	-1,52	-2,15	0,11	-0,22	-0,24	-0,44
XC_0467	XCC8004_a06001	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-1,67	-2,97	-0,30	-3,51	-1,89	-3,53
XC_0473	XCC8004_a06071	anthranilate synthase component I	-1,62	-3,00	-0,03	-0,03	-2,92	-0,06
XC_0483	XCC8004_a06201	anthranilate phosphoribosyltransferase	-1,93	-3,91	0,02	-0,28	-4,23	0,04
XC_0484	XCC8004_a06211	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-2,08	-4,80	-0,03	-0,19	-5,09	-0,18
XC_0486	XCC8004_a06231	transcriptional regulator	1,13	2,28	0,29	0,19	0,24	0,78
XC_0509	XCC8004_a06601	phosphoribosylamine-glycine ligase	-2,35	-3,26	-0,14	-3,18	-3,05	-3,25
XC_0522	XCC8004_a06761	XRE family transcriptional regulator	0,19	1,06	0,04	-0,05	0,04	0,15
XC_0657	XCC8004_a08411	putative exported protein	-0,25	-1,04	0,06	-0,10	0,04	-0,02
XC_0714	XCC8004_a09141	peptidase S41	-1,12	-1,31	-0,24	-1,11	-1,90	-0,22
XC_0753	XCC8004_a09561	iron dicitrate transport regulator FecR	-2,55	-4,28	0,00	0,00	-0,09	-0,34
XC_0754	XCC8004_a09571	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	-2,58	-3,14	0,10	0,28	0,22	-2,79
XC_0764	XCC8004_a09681	thioldisulfide interchange protein	-1,66	-2,52	-0,12	-0,17	-0,20	-0,70
XC_0800	XCC8004_a10101	aminotransferase	-0,94	-2,41	0,10	-0,20	-3,91	-0,90
XC_0805	XCC8004_a10161	amylsucrase	-1,40	-1,17	0,00	-0,06	0,11	-0,21
XC_0810	XCC8004_a10221	citrate transporter	-0,38	-1,38	0,08	0,09	0,17	-0,10
XC_0814	XCC8004_a10231	ABC transporter substrate-binding protein	-0,38	-1,38	-0,01	-0,22	-0,02	-0,12
XC_0833	XCC8004_a10491	isopropylmalate isomerase	-1,60	-4,03	0,03	-0,30	-4,76	-0,03
XC_0834	XCC8004_a10501	3-isopropylmalate dehydratase	-1,60	-2,97	0,01	-0,07	-3,78	-0,15
XC_0836	XCC8004_a10531	3-isopropylmalate dehydrogenase	-2,38	-3,66	-0,17	-0,02	-4,52	-0,35
XC_0837	XCC8004_a10561	2-isopropylmalate synthase	-0,65	-1,93	-0,01	-0,03	-1,90	0,27
XC_0838	XCC8004_a10571	threonine dehydratase	-0,69	-2,23	-0,01	0,04	-0,37	0,07
XC_0840	XCC8004_a10591	acetolactate synthase catalytic subunit	-1,04	-3,30	-0,05	0,12	-0,49	-0,13
XC_0841	XCC8004_a10601	keto-lacid reductoisomerase	-1,28	-3,48	-0,04	0,01	0,01	0,40
XC_0972	XCC8004_a10231	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,01	-2,70	-0,08	-0,26	-1,92	-2,27
XC_0976	XCC8004_a12381	phosphoglycerate kinase	-1,11	-1,85	-0,15	-0,01	-2,03	-2,46
XC_1015	XCC8004_a12811	thiazole synthase	-0,47	-1,11	-0,05	0,25	-0,47	-0,02
XC_1050	XCC8004_a13341	histidine kinase	-1,19	-2,94	-0,38	-0,98	-0,58	-0,16
XC_1067	XCC8004_a13571	NAD synthetase	-1,63	-2,12	-1,03	-0,73	-2,43	-2,62
XC_1078	XCC8004_a13701	trehalose-phosphatase	-1,72	-1,59	0,18	-1,89	-4,53	-0,39
XC_1113	XCC8004_a14101	TonB-dependent receptor	-0,46	-1,94	0,09	-0,05	-0,02	0,10
XC_1134	XCC8004_a14341	potassium transporter Kup	-1,87	-2,28	-0,53	0,02	-0,29	-1,73
XC_1175	XCC8004_a14901	glycosyl transferase	-1,15	-1,47	0,43	0,11	0,00	0,87
XC_1225	XCC8004_a15571	aminotransferase	-0,86	-1,76	-0,07	-0,54	-0,42	-0,08
XC_1235	XCC8004_a15711	beta-lactamase	-0,42	-1,36	0,10	0,11	0,27	0,05
XC_1307	XCC8004_a16551	nucleotide-binding protein	-1,92	-1,38	-0,09	-0,08	-0,13	-0,84
XC_1311	XCC8004_a16591	RNA polymerase sigma54 factor	-1,31	-1,65	-0,17	-0,06	-0,10	0,50
XC_1324	XCC8004_a16731	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (AIR synthase)	-3,02	-3,92	0,03	-3,14	-1,28	-3,42
XC_1328	XCC8004_a16771	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-0,74	-1,26	0,17	0,24	0,33	-1,09
XC_1404	XCC8004_a17601	phosphoglyceromutase	-2,28	-2,26	-0,01	0,38	-0,82	-2,20
XC_1431	XCC8004_a17891	TetR family transcriptional regulator	-0,98	-2,05	0,09	-0,19	-0,48	-0,05
XC_1567	XCC8004_a19511	chorismate synthase	-1,11	-2,84	-0,36	-0,06	-2,58	-1,64
XC_1575	XCC8004_a19601	tryptophan synthase subunit beta	-2,57	-3,96	-0,02	-0,01	-4,45	-0,13
XC_1577	XCC8004_a19631	tryptophan synthase alpha chain	-2,95	-4,28	-0,08	-0,04	-2,58	0,09
XC_1613	XCC8004_a20101	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	-4,25	-4,86	-0,50	-5,11	-2,46	-4,73
XC_1614	XCC8004_a20111	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	-1,75	-4,26	-0,10	-3,30	-2,68	-3,50
XC_1658	XCC8004_a20841	polysaccharide biosynthesis protein GumB	-2,06	-2,63	0,30	-0,99	-2,66	-0,63
XC_1659	XCC8004_a20861	polysaccharide biosynthesis protein GumC	-1,30	-2,64	0,15	-0,25	-1,90	-0,76
XC_1681	XCC8004_a21101	Putative secreted protein	-1,45	-1,38	-0,33	-0,54	-0,55	-0,45
XC_1782	XCC8004_a22241	membrane protein	-0,71	-2,09	-1,97	-2,09	-1,83	-1,13
XC_1783	XCC8004_a22261	magnesium transporter	-0,61	-1,59	-0,32	-0,42	-0,54	-0,69
XC_1821	XCC8004_a22691	beta-ketoacyl-ACP reductase	-1,37	-3,08	0,17	0,34	0,55	-0,75

XC_1868	XCC8004_a23231	hypothetical protein	-0,55	-1,17	-0,06	-0,39	-0,40	-0,05
XC_1869	XCC8004_a23251	acetylornithine carbamoyltransferase	-1,75	-3,53	-0,01	0,08	0,04	-0,42
XC_1871	XCC8004_a23271	argininosuccinate synthase	-1,70	-3,08	-0,10	-0,37	-0,30	-0,48
XC_1872	XCC8004_a23281	acetylornithine deacetylase	-1,94	-3,11	0,13	0,09	0,20	-0,70
XC_1873	XCC8004_a23291	acetylglutamate kinase	-2,17	-3,09	-0,30	-0,25	-0,03	-0,07
XC_1875	XCC8004_a23311	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-2,03	-3,57	-0,01	-0,12	0,07	-0,18
XC_1876	XCC8004_a23321	argininosuccinate lyase	-1,46	-3,52	0,08	0,06	0,03	-0,64
XC_1880	XCC8004_a23361	glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	-0,32	-1,17	-0,02	-0,05	-0,19	-1,26
XC_1906	XCC8004_a23681	rifampin ADP-ribosyl transferase	-1,09	-1,09	-0,37	-0,46	-0,33	-0,48
XC_1927	XCC8004_a23941	tetratricopeptide repeat protein	-1,41	-2,47	0,21	0,15	0,39	0,44
XC_1928	XCC8004_a23951	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-2,24	-2,94	0,43	0,15	0,07	0,54
XC_1929	XCC8004_a23961	multidrug MFS transporter	-1,93	-2,30	0,34	-0,03	-0,16	0,67
XC_1952	XCC8004_a24221	phosphoenolpyruvate synthase	-0,65	-1,71	-0,01	-0,18	-0,01	-3,27
XC_1958	XCC8004_a24301	PHA synthase subunit	-1,99	-2,95	0,10	0,31	0,44	-0,77
XC_1959	XCC8004_a24311	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	-1,79	-3,27	0,03	0,22	0,43	-0,90
XC_1977	XCC8004_a24701	glucose-6-phosphate dehydrogenase	-0,92	-1,11	-0,25	-1,80	-2,47	-0,13
	XCC8004_a25301	DUF4189 domain-containing protein	-0,95	-1,19	-0,03	-0,03	0,03	-0,02
XC_2059	XCC8004_a25851	MULTISPECIES: hypothetical protein	-1,76	-2,26	-0,56	-0,75	-1,15	-1,45
XC_2103	XCC8004_a26461	Fe/S biogenesis protein NfuA	-0,42	-1,20	-0,06	-0,04	-0,06	0,11
	XCC8004_a27231	stress-induced protein	1,23	1,24	0,28	0,02	0,02	1,23
XC_2208	XCC8004_a27671	voltage-gated chloride channel protein	-0,95	-2,12	0,02	-0,05	0,00	0,01
XC_2218	XCC8004_a27781	Clp protease ClpX	-1,36	-1,76	-0,28	-0,31	-0,96	-1,01
XC_2228	XCC8004_a27921	c-di-GMP phosphodiesterase	0,03	1,04	0,01	0,05	0,12	-0,06
XC_2252	XCC8004_a28231	chemotaxis protein CheY	0,34	1,06	-0,10	-0,28	-0,42	0,36
XC_2272	XCC8004_a28471	flagellar biosynthetic protein FlhR	1,38	1,56	0,02	0,02	0,07	0,24
XC_2333	XCC8004_a29211	hybrid sensor histidine kinase/response regulator	1,25	2,34	0,25	-0,07	-0,28	0,73
XC_2335	XCC8004_a29231	cation tolerance protein CutA	1,64	3,12	0,21	0,06	-0,12	0,50
XC_2354	XCC8004_a29431	iron transporter FeoB	-0,25	-1,20	-0,34	-0,67	-0,65	-0,93
XC_2364	XCC8004_a29541	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-0,36	-1,98	0,18	-0,15	-2,54	-2,48
XC_2375	XCC8004_a29661	imidazole glycerol phosphate synthase	-1,94	-3,06	-0,14	-0,22	-3,45	-0,31
		1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino) methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	-1,48	-3,55	0,04	-0,18	-4,53	-0,09
XC_2376	XCC8004_a29671							
XC_2377	XCC8004_a29681	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	-2,08	-4,04	0,20	0,18	-4,30	0,04
XC_2378	XCC8004_a29691	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	-0,89	-3,53	-0,15	0,13	-4,46	-0,27
XC_2379	XCC8004_a29701	histidinol-phosphate aminotransferase	-1,04	-2,65	-0,10	0,00	-4,88	-0,03
XC_2380	XCC8004_a29711	histidinol dehydrogenase	-2,44	-2,42	-0,01	-0,06	-3,61	0,12
XC_2386	XCC8004_a29771	threonine synthase	-0,89	-2,50	-0,07	0,07	0,09	-0,03
XC_2389	XCC8004_a29801	aspartate kinase	-1,15	-2,59	-0,10	-0,13	-0,05	-0,07
XC_2407	XCC8004_a30021	MULTISPECIES: hypothetical protein	-1,01	-3,35	0,04	0,03	0,06	-0,02
XC_2465	XCC8004_a30741	glucose-6-phosphate isomerase	-2,28	-2,76	-0,35	-0,09	-0,18	-1,86
XC_2524	XCC8004_a31621	protein-L-isopartate O-methyltransferase	-1,05	-1,51	-0,43	-1,42	-1,09	-0,58
XC_2643	XCC8004_a33121	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-1,53	-4,01	-0,32	-0,24	-2,76	-2,54
XC_2644	XCC8004_a33131	chorismate mutase	-1,61	-3,52	-0,04	-0,18	-0,46	-1,25
XC_2645	XCC8004_a33141	MFS transporter	-1,08	-2,56	-0,03	-0,24	-2,34	-2,49
XC_2667	XCC8004_a33411	chromosome segregation protein SMC	-0,55	-1,63	-0,57	-0,75	-0,76	-0,61
XC_2678	XCC8004_a33551	carbonate dehydratase	-2,03	-2,99	-2,12	-2,07	-0,59	-2,48
XC_2708	XCC8004_a33911	phosphate-binding protein	-1,09	-2,16	0,01	-0,29	0,08	0,02
XC_2709	XCC8004_a33921	phosphate ABC transporter permease	-1,05	-3,25	0,17	0,02	0,06	-0,01
XC_2710	XCC8004_a33931	phosphate ABC transporter permease	-1,32	-2,28	0,06	0,10	0,01	-0,01
XC_2711	XCC8004_a33941	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	-1,37	-2,12	-0,02	-0,01	0,14	0,01
XC_2768	XCC8004_a34661	membrane protein	-2,20	-2,55	-0,52	-0,66	-0,44	-0,57
XC_2827	XCC8004_a35451	MarR family transcriptional regulator	0,73	1,61	0,27	-0,02	0,04	0,41
XC_2847	XCC8004_a35711	right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein	-2,47	-5,03	-0,07	-0,03	-0,04	-1,55
XC_2848	XCC8004_a35721	asparagine synthase B	-0,81	-1,93	0,26	-0,54	-4,52	0,19
XC_2956	XCC8004_a36941	5'-methylthioadenosine phosphorylase	0,20	-1,13	0,05	-0,28	-0,18	-0,15
XC_3076	XCC8004_a38371	DNA-binding protein	0,29	1,71	0,00	-0,04	-0,11	0,13
XC_3077	XCC8004_a38401	transcriptional regulator	0,76	1,75	0,01	-0,19	-0,03	-0,02
XC_3083	XCC8004_a38471	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	-0,60	-1,12	-0,47	-0,81	-0,93	-0,04
XC_3114	XCC8004_a38881	polyketide cyclase	-3,27	-3,66	-0,69	-0,18	0,52	-0,76
XC_3121	XCC8004_a38951	septum formation inhibitor	-0,17	-1,65	-0,28	-0,36	0,12	-0,59
XC_3195	XCC8004_a39871	membrane protease HflC	-1,21	-1,31	-0,07	-0,75	-0,74	-0,22
XC_3196	XCC8004_a39881	membrane protein	-0,67	-1,12	-0,25	-0,63	-0,79	-0,19
XC_3210	XCC8004_a40081	3-methylitaconate isomerase	-0,58	-1,28	-0,92	-0,74	-0,67	-1,19
XC_3251	XCC8004_a40601	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid kinase	-1,63	-3,00	-0,31	-0,02	0,21	-0,77
XC_3252	XCC8004_a40611	lipopolysaccharide heptosyltransferase family protein	-2,52	-3,09	0,09	-0,24	-0,50	-2,97
XC_3253	XCC8004_a40621	hypothetical protein	-1,62	-4,05	0,05	-0,16	-0,63	-3,08

XC_3263	XCC8004_a40901	endopeptidase La	-0,75	-2,06	-0,45	-0,64	-0,99	-0,53
XC_3271	XCC8004_a41141	peptidase	-0,85	-1,17	-0,08	-0,17	-0,18	-0,35
XC_3272	XCC8004_a41161	transcriptional regulator PhoB	-0,97	-2,29	0,02	-0,07	-0,12	0,04
XC_3273	XCC8004_a41171	histidine kinase	-0,02	-1,04	0,04	0,02	-0,01	0,00
XC_3282	XCC8004_a41271	amidophosphoribosyltransferase	-2,05	-3,80	-0,03	-2,77	-1,07	-3,28
XC_3299	XCC8004_a41451	Putative secreted protein	-1,05	-0,96	-0,34	-0,21	-0,29	-0,30
XC_3313	XCC8004_a41641	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	-0,60	-1,35	0,06	0,09	-2,35	-0,46
XC_3314	XCC8004_a41651	disulfide bond formation protein B	-1,53	-1,97	-1,92	-2,43	-2,29	-2,05
XC_3388	XCC8004_a42701	DUF1631 domain-containing protein	0,36	1,28	-0,60	-0,89	-1,22	-0,35
XC_3439	XCC8004_a43301	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	-0,37	-1,19	-0,03	-0,11	-0,27	-0,05
XC_3526	XCC8004_a44361	dimethylmenaquinone methyltransferase	-0,89	-1,12	-0,11	-0,30	-0,55	-0,05
XC_3544	XCC8004_a44581	serine hydroxymethyltransferase	-1,16	-2,63	-0,20	-1,36	-2,48	-3,99
XC_3563	XCC8004_a44801	general secretion pathway protein GspD	-0,77	-1,20	-0,08	-0,19	-0,27	-0,70
XC_3566	XCC8004_a44851	general secretion pathway protein GspL	-1,08	-1,51	-0,02	-0,19	-0,34	-0,85
XC_3567	XCC8004_a44861	general secretion pathway protein GspK	-0,80	-1,43	-0,06	-0,30	-0,38	-0,73
XC_3572	XCC8004_a44911	general secretion pathway protein GspF	-0,50	-1,59	-0,37	-0,19	-0,23	-0,91
XC_3578	XCC8004_a44991	phosphoribosylformylglycinamide synthase	-2,25	-3,47	-0,10	-3,21	-1,66	-3,55
XC_3605	XCC8004_a45331	conserved protein involved in carbohydrate biosynthesis	-1,18	-1,60	0,45	-0,01	-0,35	0,89
XC_3608	XCC8004_a45401	phosphomannomutase	-0,94	-1,03	0,17	-0,68	-0,64	-2,46
XC_3609	XCC8004_a45411	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-3,34	-4,75	0,27	-2,82	-4,65	-4,80
XC_3612	XCC8004_a45451	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	-1,82	-1,82	0,28	0,13	-0,12	0,95
XC_3613	XCC8004_a45461	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	-1,33	-1,88	0,31	0,08	0,01	0,95
XC_3627	XCC8004_a45631	GDP-D-mannose dehydratase	-2,52	-2,40	0,29	-0,14	-0,12	0,35
XC_3630	XCC8004_a45671	glycosyl transferase	-1,37	-1,96	0,23	-0,36	-0,46	0,15
XC_3634	XCC8004_a45741	glycosyl transferase	-1,38	-2,34	0,46	0,06	-0,20	0,58
XC_3696	XCC8004_a46551	putative exported protein	-2,68	-3,23	-0,61	-0,21	0,62	-0,70
XC_3718	XCC8004_a46791	alanine racemase	-3,43	-3,65	-0,21	-0,35	-3,96	-3,29
XC_3745	XCC8004_a47121	amino acid transporter	-0,47	-1,01	-0,35	-0,19	-0,41	-0,22
XC_3760	XCC8004_a47281	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	0,75	1,06	0,30	0,02	0,18	1,14
XC_3813	XCC8004_a47981	CDP-glycerol glycerophosphotransferase	-1,77	-3,46	0,10	-0,02	-0,05	-1,73
XC_3814	XCC8004_a47991	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-2,35	-3,29	0,28	-0,18	-0,45	-2,24
XC_3815	XCC8004_a48001	polymerase	-2,26	-2,73	0,09	-0,02	-0,25	0,58
XC_3886	XCC8004_a48851	beta-glucosidase	-2,71	-3,55	-0,10	-1,20	-1,03	-1,82
XC_3896	XCC8004_a48971	protoheme IX farnesyltransferase	-0,84	-1,12	-0,60	-0,83	-0,78	-0,22
XC_3937	XCC8004_a49561	protein CapI	-0,87	-1,63	-0,07	-0,06	0,10	-1,60
XC_3938	XCC8004_a49571	dolichol-phosphate mannosyltransferase	-0,97	-1,55	-0,13	-0,12	-0,08	-1,01
XC_3939	XCC8004_a49581	membrane protein	-0,57	-1,31	0,02	0,05	0,16	-0,76
XC_4008	XCC8004_a50461	hypothetical protein	-1,56	-1,91	-0,34	-0,06	0,37	-0,57
XC_4041	XCC8004_a50911	shikimate dehydrogenase	-2,38	-3,08	-0,19	-0,27	-2,87	-1,04
XC_4281	XCC8004_a54181	ParA family protein	-1,19	-1,37	-0,49	-1,04	-0,94	-0,18

Table S3 | Genes important for *Xcc* growth in xylem sap but not in hydathodes.

Gene 8004	locus_tag	locus_tag_NCBI	Predicted function	Gene fitness
XC_0214	XCC8004_a02691	XC_RS01065	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	-2,11
XC_0510	XCC8004_a06621	XC_RS02595	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	-3,51
XC_0979	XCC8004_a12411	XC_RS04905	fructose-bisphosphate aldolase	-1,91
XC_1173	XCC8004_a14881	XC_RS05900	GTP pyrophosphokinase	-1,85
XC_1356	XCC8004_a17071	XC_RS06795	pyrroline-5-carboxylate reductase	-2,05
XC_1879	XCC8004_a23351	XC_RS09415	glutamate 5-kinase	-1,27
XC_1930	XCC8004_a23971	XC_RS09670	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-2,74
XC_3213	XCC8004_a40111	XC_RS16195	Fe/S-dependent 2-methylisocitrate dehydratase AcnD	-1,40
XC_3626	XCC8004_a45611	XC_RS18345	GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase	-2,16
XC_4297	XCC8004_a54401	XC_RS21765	ABC transporter permease	-1,17
XC_4301	XCC8004_a54441	XC_RS21785	lipoprotein	-1,02

Table S4 | Genes contributing to *Xcc* fitness in both hydathodes and xylem sap

Gene 8004	locus_tag	locus_tag_NCBI	Predicted Function	Hyd 3dpi	Hyd 6dpi	Xylem sap
XC_0972	XCC8004_a12331	XC_RS04870	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,01	-2,70	-2,27
XC_0100	XCC8004_a01281	XC_RS00505	aromatic amino acid aminotransferase	-1,82	-2,85	-1,55
XC_1324	XCC8004_a16731	XC_RS06635	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (AIR synthase)	-3,02	-3,92	-3,42
XC_1614	XCC8004_a20111	XC_RS08070	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	-1,75	-4,26	-3,50
XC_2059	XCC8004_a25851	XC_RS10360	MULTISPECIES: hypothetical protein	-1,76	-2,26	-1,45
-	XCC8004_a27231	XC_RS10905	stress-induced protein	1,23	1,24	1,23
XC_2218	XCC8004_a27781	XC_RS11165	Clp protease ClpX	-1,36	-1,76	-1,01
XC_2465	XCC8004_a30741	XC_RS12350	glucose-6-phosphate isomerase	-2,28	-2,76	-1,86
XC_2644	XCC8004_a33131	XC_RS13300	chorismate mutase	-1,61	-3,52	-1,25
XC_2645	XCC8004_a33141	XC_RS13305	MFS transporter	-1,08	-2,56	-2,49
XC_3252	XCC8004_a40611	XC_RS16405	lipopolysaccharide heptosyltransferase family protein	-2,52	-3,09	-2,97
XC_3282	XCC8004_a41271	XC_RS16600	amidophosphoribosyltransferase	-2,05	-3,80	-3,28
XC_3578	XCC8004_a44991	XC_RS18105	phosphoribosylformylglycinamide synthase	-2,25	-3,47	-3,55
XC_3609	XCC8004_a45411	XC_RS18260	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-3,34	-4,75	-4,80
XC_3718	XCC8004_a46791	XC_RS18800	alanine racemase	-3,43	-3,65	-3,29
XC_3814	XCC8004_a47991	XC_RS19280	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-2,35	-3,29	-2,24
XC_3886	XCC8004_a48851	XC_RS19645	beta-glucosidase	-2,71	-3,55	-1,82
XC_0467	XCC8004_a06001	XC_RS02370	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-1,67	-2,97	-3,53
XC_0509	XCC8004_a06601	XC_RS02590	phosphoribosylamine--glycine ligase	-2,35	-3,26	-3,25

Table S5 | Amino acid biosynthesis pathways are required for *Xcc* fitness in the host plant and *in vitro* media. Amino acids biosynthesis pathways required for *Xcc* fitness are indicated with (++) when all the genes of the pathway are important or (+) when only few genes are important, according to the BioCyc database.

[illegible]

Table S6 | List of strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
8004:: <i>GUS-GFP</i>	8004 strain derivative; constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	Cerutti et al., 2017
RB-TnSeq library	8004:: <i>GUS-GFP</i> transposon-insertion mutants ; Rif ^R ; Kan ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_0143</i>	<i>XC_0143</i> (<i>glgBI</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_0449</i>	<i>XC_0449</i> deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_0555</i>	<i>XC_0555</i> deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_0810</i>	<i>XC_0810</i> (<i>citM</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_1113</i>	<i>XC_1113</i> (<i>bfeA</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_1431</i>	<i>XC_1431</i> deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_1958-59</i>	<i>XC_1958-59</i> (<i>phaE-phcC</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_2377</i>	<i>XC_2377</i> (<i>hisH</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_2620</i>	<i>XC_2620</i> deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_3076</i>	<i>XC_3076</i> (<i>hrpX</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_3253</i>	<i>glgBI</i> (<i>XC_3253</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_3388</i>	<i>glgBI</i> (<i>XC_3388</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>XC_3388</i> :: <i>XC_3388</i>	<i>XC_3388</i> complemented mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	This study
8004:: <i>GUS-GFP</i> Δ <i>fliC</i>	<i>fliC</i> (<i>XC_2245</i>) deletion mutant, constitutive <i>GUS</i> and <i>GFP</i> expression; Rif ^R	Luneau et al., in prep
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rk⁻ mk⁻) [F' traD36 proAB lacI^q ZAM15]</i>	Stratagene
Plasmids		

pRK2073	Helper plasmid for triparental mating; Spec ^R ; Strep ^R	Leong et al., 1982
pK18mobSacB	Suicide vector in <i>Xcc</i> used for genome edition; Kan ^R	Schäfer et al., 1994
pK18_compR3	pK18mobsacB used for genomic insertion; Kan ^R	Luneau et al., <i>in prep</i>
pK18_XC0143_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_0143</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC0449_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_0449</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC0555_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_0555</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC0810_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_0810</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC1113_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_1113</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC1431_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_1431</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC1958-59_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_1958-59</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC2377_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_2377</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC2620_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_2620</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC3076_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_3076</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC3253_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_3253</i> ; Kan ^R	This study
pK18_XC3388_AmAv	pK18mobSacB derivative for deletion of <i>XC_3388</i> ; Kan ^R	This study
pK18_comp_XC3388	pK18_compR3 derivative used for complementation of Δ <i>XC_3388</i> ; Kan ^R	This study

Table S7 | List of oligos used in this study

Oligo name	Position	Locus	Sequence (5'-3')
pK18_0143Am	Fwd	Upstream <i>XC_0143</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT TTCCACCTGGGCCAGATCCTGGTGG
XC_0143AvAm	Rev	Upstream <i>XC_0143</i>	GGTGACGGTCGATCAGCCCTGCGGA TTCGTCACTGCAGTCATTACTCC
XC_0143AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_0143</i>	GGAGTAATGACTGCAGTGACGAATC CGCAGGGCTGATCGACCGTCACCG
pK18_0143Av	Rev	Downstream <i>XC_0143</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT CGGGCAAGAAGGTGTCGGGCATC
pK18_0449Am	Fwd	Upstream <i>XC_0449</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT TGTCGGCCGGGGTGCGGAAGCGG
XC_0449AvAm	Rev	Upstream <i>XC_0449</i>	AAGCTGCACCGCAAACCCGCACTCA AGGTTGAGCAGGACGGGATGCGGCG
XC_0449AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_0449</i>	GCCGCATCCCGTCCTGCTCAACCTTG AGTGCGGGTTTGCGGTGCAGCTTC
pK18_0449Av	Rev	Downstream <i>XC_0143</i>	AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC TAAGCCTGAGCACGGTTCCTGCTGG
pK18_0555Am	Fwd	Upstream <i>XC_0555</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT GGCGCCGTGTTGCAGACGCGACCGG
XC_0555AvAm	Rev	Upstream <i>XC_0555</i>	GCCGCCTAACCTGCCGTTCTGACAG CGCCATGATGGACAGCCATTGCCG
XC_0555AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_0555</i>	CGGCAATGGCTGTCCATCATGGCGC GTGCAGGAACGGCAGGTTAGGCGGC
pK18_0555Av	Rev	Downstream <i>XC_0555</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT GGATCGGCCGGGCAGCCCTGGCTGG
pK18_0810Am	Fwd	Upstream <i>XC_0810</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT GCGGCTACGACCGCAAGACCGGCCG
XC_0810AvAm	Rev	Upstream <i>XC_0810</i>	CCAGCAGATAGGTCGAGGGCACCAG CGGGCAAATCCTTTGAGGCGTGCAG
XC_0810AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_0810</i>	GCACGCCTCAAAGGATTTGCCCGCT GGTGCCCTCGACCTATCTGCTGGTC
pK18_0810Av	Rev	Downstream <i>XC_0810</i>	AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC TATCGGCGGCGTTGCCTTCGAGGC
pK18_1113Am	Fwd	Upstream <i>XC_1113</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT GCCTTCAGGCACACGATGTGGCG
XC_1113AvAm	Rev	Upstream <i>XC_1113</i>	GTTGCCGGCTGTCCTAGTGACTTAGG TCTTGCAATTCATGCGGTGACAAC
XC_1113AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_1113</i>	TTGTCACCGCATGAATTGCAAGACC TAAGTCACTAGGACAGCCGGCAACG

pK18_1113Av	Rev	Downstream <i>XC_1113</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT GGCGATTTCGGATTTCGGCCACGGTGC
pK18_1431Am	Fwd	Upstream <i>XC_1431</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT TGAGCCGTGCGGTGCGCAGGTTGGC
XC_1431AvAm	Rev	Upstream <i>XC_1431</i>	CTCCCCGCATCCGCAACCACATTAC GCGGTGCTCCTAGGGGCTCTTAAG
XC_1431AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_1431</i>	CTTAAGAGCCCCTAGGAGCACCGCG TGAATGTGGTTGCGGATGCGGGGAG
pK18_1431Av	Rev	Downstream <i>XC_1431</i>	AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC TAGCGCGCACTCACTCGCACATACG
pK18_1958-59Am	Fwd	Upstream <i>XC_1958-59</i>	
XC_1959Av-58Am	Rev	Upstream <i>XC_1958-59</i>	GCATCACTGCGTCAACCGTTGCCGTT GCCGTTGTCCGAACCGCTGGTTG
XC_1958Am-59Av	Fwd	Downstream <i>XC_1958-59</i>	CCAGCGGTTTCGGACAACGGCAACGG CAACGGTTGACGCAGTGATGCAAC
pK18_1959Av	Rev	Downstream <i>XC_1958-59</i>	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTCG TCATCGCCCCGCCCCGCCCCCATG
pK18_2377Am	Fwd	Upstream <i>XC_2377</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT GATATCCGCGCCGAAGGCGACCTGC
XC_2377AvAm	Rev	Upstream <i>XC_2377</i>	GTAAACGGTGAACTCATGGGAAGC TGCCGGCGTCGATGAGCGCGAGATC
XC_2377AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_2377</i>	GATCTCGCGCTCATCGACGCCGGCA GCTTCCCATGAGTTTCACCGTTTAC
pK18_2377Av	Rev	Downstream <i>XC_2377</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT CGCGTACTGCGTGGCCAGTTGATCC
pK18_2620Am	Fwd	Upstream <i>XC_2620</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT GGACATAGATCCAAGGTGCAAGTCG
XC_2620AvAm	Rev	Upstream <i>XC_2620</i>	ATGGCTCGCCTGTCATCCCCAATCAG CTGCTCACGGCAAGGCCGCATGCC
XC_2620AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_2620</i>	GCATGCGGCCCTTGCCGTGAGCAGCT GATTGGGGATGACAGGCGAGCCATG
pK18_2620Av	Rev	Downstream <i>XC_2620</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT CAGCCGACACAGCCGCATGGCTTAG
pK18_3253Am	Fwd	Upstream <i>XC_3253</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCT CGGCCCTGCCACTGCGGTCTCTGCG
XC_3253AvAm	Rev	Upstream <i>XC_3253</i>	CGCATCAGGCGCCGCTGGCGCGGTA CATGACAGACCTCCAACGAAGAATC
XC_3253AmAv	Fwd	Downstream <i>XC_3253</i>	CCGATTCTTCGTTGGAGGTCTGTCAT GTACCGCGCCAGCGGCGCCTGATG

pK18_3253Av	Rev	Downstream XC_3253	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT GGGCTGGCGGGTGGTGCTGTGCGGC
pK18_3388Am	Fwd	Upstream XC_3388	TAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTT CACCGCCGATTACTTCCGCAGGTTG
XC_3388AvAm	Rev	Upstream XC_3388	CGCAGCCGTTTTGACAGCGGCGCTT AAGGCTCCCCGCCTTTGCAGGCGTG
XC_3388AmAv	Fwd	Downstream XC_3388	CACGCCTGCAAAGGCGGGGAGCCTT AAGCGCCGCTGTCAAAACGGCTG
pK18_3388Av	Rev	Downstream XC_3388	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT GACCGCGAAACGCCGTGGGAAGAA G
pK18_CompR3_XC3388_Fwd	Fwd	Upstream XC_3388	
pK18_CompR3_XC3388_Rev	Rev	Downstream XC_3388	

3.2.3 Discussion & Perspectives

Les travaux présentés dans cet article apportent plusieurs éléments de réponses à notre question de départ qui portait sur l'identification des bases génétiques de l'adaptation à l'environnement chez *Xcc*. Dans un premier temps, la construction de la banque de mutants RB-TnSeq nous a fourni une liste de près de 300 gènes essentiels chez *Xcc*. Cette ressource permet d'une part de mettre à disposition une liste de cibles éventuelles pour de nouveaux traitements à l'encontre de *Xcc*, mais elle permet également d'approfondir nos connaissances fondamentales et s'ajoute aux outils de biologie synthétique dont l'objectif est de définir un set de gènes minimaux permettant le fonctionnement cellulaire.

Du point de vue de l'adaptation à l'hôte, l'étude de l'infection de l'hydathode n'a pas permis de cribler les mutants sur leur fitness individuelle pour faire ressortir les gènes nécessaires à la colonisation de cet organe. Cependant l'effet de population observé fournit une opportunité unique de comprendre le fonctionnement bactérien à l'échelle de la communauté. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons tirer plusieurs conclusions : en premier lieu, les voies de biosynthèse des acides aminés sont des déterminants de la fitness chez *Xcc* lors de l'infection de l'hydathode. Ce résultat indique que les individus n'échangent pas d'acides aminés entre eux, ou en tout cas pas suffisamment pour maintenir un niveau de croissance optimal. Ceci sous-entend que les bactéries ont accès à des sources de carbone et d'azote suffisantes pour assurer la biosynthèse des acides aminés nécessaires et la croissance dès le début de l'infection, et cela malgré les faibles concentrations en nutriments dans les fluides de guttation. Cependant, la croissance reste lente dans les hydathodes (une génération toutes les 24 heures), suggérant que, soit la biodisponibilité en nutriments dans le milieu est véritablement limitante, soit *Xcc* investit préférentiellement dans la production de facteur de virulence plutôt que dans la croissance. Plusieurs éléments supportent l'hypothèse qu'il s'agit probablement d'une combinaison de ces deux facteurs. En effet, nos données de transcriptomique obtenues lors de la colonisation de l'hydathode par *Xcc* indiquent à la fois une induction de l'expression des facteurs de virulence comme le T3SS et une induction de l'expression des transporteurs de nutriments haute-affinité. De plus, les mutants de notre banque RB-TnSeq associés aux multiples régulateurs du pouvoir pathogène montrent un gain de fitness à 6 dpi. Ce comportement typique de tricheur suggère que (i) les facteurs de virulence

nécessaires à l'infection sont produits par au moins une partie de la population, (ii) qu'ils sont coûteux à produire et (iii) que l'économie du coût de production chez les mutants résulte dans une multiplication accrue. Il y a donc bien un équilibre entre croissance et pathogénie lors de l'infection de l'hydathode par *Xcc*.

Le comportement de tricheur repéré chez certains mutants est commun dans les approches de type TnSeq puisque l'on travaille volontairement avec une population bactérienne (Powell et al., 2016; Thibault et al., 2019). Cependant, la coopération entre individus se traduit généralement par une incapacité à détecter les fonctions touchées (les mutants ont la même fitness que la souche sauvage). Ici, il est donc intéressant de noter que l'on a identifié des mutants, qui, au-delà de ne pas montrer de défaut de fitness, se caractérisent par un gain de fitness. En plus de l'intensité du phénotype observé, il est aussi important de souligner que la dizaine de gènes touchés codent pour divers régulateurs du pouvoir pathogène, et notamment HrpG et HrpX, les activateurs transcriptionnels des gènes codant le T3SS et les ET3. En ce sens, même si les mutants possédant un T3SS non-fonctionnel (par exemple $\Delta hrcV$) se comportent comme des tricheurs, le gain de fitness visible chez les mutants de régulateurs viendrait ainsi de leur capacité à se multiplier mieux que la souche sauvage : en plus de profiter des biens publics, ces mutants économiseraient l'énergie de production des protéines et l'investiraient préférentiellement dans la croissance (Sturm et al., 2011; Rundell et al., 2016). La multiplicité de mutants de régulateurs identifiés avec un gain de fitness suggère qu'il y aurait donc plusieurs processus biologiques coûteux activés lors de l'infection de l'hydathode. En effet les régulateurs du T3SS, mais également ceux du quorum sensing, du T2SS ou encore de l'homéostasie du fer font partie des gènes identifiés. Malheureusement, du fait de la complexité des réseaux de régulation, il reste compliqué d'identifier les fonctions précises qui sont responsables de ce coût pour chacune de ces voies. Un détail reste intrigant : le facteur de transcription *hpaR* (*XC_2827*), sous le contrôle de HrpG et HrpX mais non-impliqué dans l'expression du T3SS, fait également partie des gènes dont les mutants ont un gain de fitness dans l'hydathode. Ce résultat laisse penser que le gain de fitness observé pour *hrpG* et *hrpX* n'est pas, ou pas seulement, dû au coût d'expression du T3SS. Pour approfondir cette hypothèse, j'ai exploité le coût de fitness visible chez la souche *Xcc* 8004::*hrpG*^{*}, qui présente un défaut de croissance *in vitro* en milieu pauvre probablement dû à l'expression non nécessaire du T3SS (**Partie 1 - Figure S7**), et construit plusieurs mutants épistatiques. Selon

notre hypothèse, la délétion de *hrpX* et de *hpaR* devrait chacune aboutir à une restauration du niveau de croissance de *Xcc* par suppression de l'expression des éléments couteux. Bien que les données préliminaires indiquent que ce soit vrai pour la souche 8004::*hrpG** Δ *hrpX*, les résultats pour la souche 8004::*hrpG** Δ *hpaR* ne sont pas encore disponibles. Dans la mesure où le régulon de *hrpX* contient à la fois *hpaR* et les gènes du T3SS et des ET3, j'ai également construit la souche délétée des 25 gènes du cluster *hrp* codant le T3SS (8004::*hrpG** Δ *hrp_cluster*) et la souche délétée de 26 ET3 (8004::*hrpG** Δ 26*T3E*). Le phénotype de ces souches est en cours d'investigation et permettra d'affiner l'origine du coût de fitness porté par *hrpG* et *hrpX*.

Néanmoins, les éléments disponibles convergent pour appuyer l'hypothèse selon laquelle *Xcc* pourrait mettre en place une stratégie de division du travail lors de l'infection de l'hydathode. En effet, le maintien de la fitness chez les mutants génétiques lors du criblage RB-TnSeq suggère que dans une population isogénique, *Xcc* pourrait présenter une hétérogénéité phénotypique au sein de la population. Afin de tester cette hypothèse, j'ai initié la construction de bio-rapporteurs chez *Xcc*. J'ai ainsi inséré une cassette permettant l'expression du fluorophore mCherry dans le génome de *Xcc* sous contrôle de différents promoteurs. Dans un premier temps, j'ai souhaité faire la preuve de concept avec le facteur de transcription HrpX dont le rôle d'activation de l'expression du T3SS est bien établi. J'ai donc cloné le promoteur natif de *hrpX* ainsi que celui de l'opéron *hrpC* situé dans le cluster *hrp* et présentant le motif de fixation de *hrpX* à l'ADN. L'objectif de cette stratégie gène rapporteur est donc d'inoculer dans les hydathodes la souche *Xcc* 8004::*GFP* exprimant constitutivement la GFP et porteuse des cassettes mCherry inductibles afin de visualiser en microscopie confocale la proportion de cellules bactériennes exprimant le T3SS *in planta*. Cette stratégie n'a cependant pas pu être implémentée pour l'instant mais devrait s'avérer informative. Une stratégie similaire a en effet été développée avec succès par Samal et al. (2019) pour étudier la dynamique de sensibilité au quorum sensing chez *Xcc* lors de la colonisation du xylème et a effectivement montré la présence d'hétérogénéité phénotypique au cours de l'infection. Dans un second temps, l'objectif est d'étendre cette approche pour étudier le comportement des 3 régulateurs putatifs XC_3388, XC_0522 et XC_RS10905 lors de l'infection de la plante hôte, à commencer par les hydathodes. Le travail engagé sur XC_3388 apporte d'ores et déjà des preuves du rôle pléiotropique de cette protéine et laisse donc à croire qu'il s'agit d'un régulateur de l'adaptation

et du pouvoir pathogène. Au-delà des tests de caractérisation phénotypiques présentés dans l'article ci-dessus, nous voudrions capturer plus précisément les processus biologiques contrôlés par XC_3388 en analysant le transcriptome du mutant ΔXC_3388 en comparaison avec la souche sauvage et le sur-expresser $\Delta XC_3388::XC_3388$. A terme, le but serait également d'appliquer le même raisonnement avec XC_0522 et XC_RS10905. Le criblage RB-TnSeq pourrait avoir mis en évidence de nouveaux régulateurs de l'adaptation chez *Xcc* via le phénotype de gain de fitness des mutants dans un contexte de population. Le RB-TnSeq nous aura aussi permis de quantifier le coût de fitness porté par l'expression des facteurs de virulence. De plus, ces observations mettent en avant la possibilité de co-infection de l'hôte par des souches commensales qui profiteraient des atouts des souches pathogènes pour se multiplier sans payer le coût de virulence. Des souches non-pathogènes de *Xanthomonas* sont d'ailleurs régulièrement détectées dans la phyllosphère, y compris en association avec des souches pathogènes, même si peu d'études rapportent des co-infections entre souches pathogènes et non-pathogènes (Meline et al., 2019; Friesen, 2020).

Plusieurs autres gènes candidats ont été laissés en suspens au profit de XC_3388 mais sont également en cours de caractérisation. Le RB-TnSeq avait en effet aussi révélé deux facteurs de transcription (XC_0449 et XC_1431) et une protéine hypothétique (XC_3253) comme contribuant à la fitness de *Xcc* dans l'hydathode. Le travail est en cours pour essayer de déterminer, par la même approche de génétique inverse que pour XC_3388, le rôle biologique de ces gènes.

La question majeure qui reste cependant sans réponse est celle de la spécificité de tissu. En effet, dans la mesure où le criblage TnSeq n'a pas été fait dans le xylème mais *ex-planta* dans la sève de xylème, il est très probable que la liste de gènes requis pour la fitness de *Xcc* soit sous-estimée et même biaisée. Pour réellement comparer le mode de vie de *Xcc* dans l'hydathode au mode de vie vasculaire, il faudrait donc faire le criblage dans le xylème. Par ailleurs, le projet initial englobait également l'étude du mésophylle comme environnement colonisé par *Xcc*. Bien que l'optimisation méthodologique ait été réalisée, les échantillons du criblage RB-TnSeq n'ont pas encore été générés et ne le seront pas pendant ma thèse. Une expérience pilote a permis de confirmer que l'inoculation du mésophylle (réalisée par infiltration) ne présente pas de bottleneck, la quantité de bactéries inoculées dépendant

seulement de la concentration de la suspension d'inoculation. Il sera alors pertinent de réaliser le criblage à la fois à faible et à haute densité de population dans le mésophylle. Effectivement, une inoculation à faible densité (10^6 CFU/ml) permettrait de maximiser la croissance bactérienne dans la plante et de tester la fitness intrinsèque des mutants en s'assurant qu'ils sont isolés dans les tissus. Néanmoins, il ne serait pas réellement possible de répondre à la question de la spécificité des stratégies employées par *Xcc* pour coloniser les différents tissus de l'hôte avec cette condition seulement puisque l'on confondrait l'effet tissu (hydathodes *vs.* mésophylle) et l'effet densité de population (bactérie isolée *vs.* bactérie sociale). En ce sens, réaliser aussi le criblage à haute densité dans le mésophylle (10^8 CFU/ml) permettrait de tester l'effet « densité de population » d'un côté (mutant isolé dans le mésophylle *vs.* mutant en population dans le mésophylle) et l'effet « tissu » de l'autre (population concentrée dans l'hydathode *vs.* population concentrée dans le mésophylle) et ainsi d'adresser la question de la spécificité de tissu.

3.2.4 Élaboration d'un test de compétition pour évaluer la fitness bactérienne au cours de l'infection.

Afin de confirmer le phénotype des mutants obtenus lors du criblage RB-TnSeq, il était nécessaire d'établir un protocole pour étudier la fitness des mutants de *Xcc* lors de l'infection de la plante hôte. En nous appuyant sur la littérature, nous avons mis en place un test de compétition où chaque mutant est co-inoculé avec la souche sauvage en ratio 1 :1. Après infection, le comptage de l'abondance relative de chacune des souches permet de déterminer si la mutation a eu un effet, positif ou négatif, sur la fitness de *Xcc*. Ce test s'appuie sur l'utilisation du gène rapporteur GUS pour différencier les souches co-inoculées comme décrit en détails dans l'article à paraître dans la revue *Bio-protocol* ci-après.

A β -glucuronidase (GUS) Based Bacterial Competition Assay to Assess Fine Differences in Fitness during Plant Infection

Julien S. Luneau, Laurent D. Noël, Emmanuelle Lauber and Alice Boulanger*

Laboratory of Plant-Microbes Interactions, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, UPS, Castanet-Tolosan, France

*For correspondence: alice.boulanger@inrae.fr

[Abstract] Competition assays are a simple phenotyping strategy that confront two bacterial strains to evaluate their relative fitness. Because they are more accurate than single-strain growth assays, competition assays can be used to highlight slight differences that would not otherwise be detectable. In the frame of host-pathogens interactions, they can be very useful to study the contribution of individual bacterial genes to bacterial fitness and lead to the identification of new adaptive traits. Here we describe how to perform such competition assay by taking the example of the model phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* during infection of the mesophyll of its cauliflower host. This phenotypic assay is based on the use of a Competitive Index (CI) that compares the relative abundance of co-inoculated strains before and after inoculation. Since multiplication is a direct proxy for bacterial fitness, the evolution of the ratio between both strains in the mixed population is a direct way to assess differences of fitness in a given environment. In this protocol, we exploit the blue staining of GUS-expressing bacteria to count blue vs. white colonies on plates and estimate the competitiveness of the strains of interest in plant mesophyll.

Keywords: Competitive Index, Competition assay, Fitness, Mesophyll, *Xanthomonas*, Cauliflower, GUS, *Brassica oleracea*

[Background] Over the years, topics of ecology and evolution have been increasingly important when studying host-microbe interactions. In addition to simply assessing the virulence of bacterial pathogens, matters of fitness and adaptation to the environment are now being addressed. Recently, large-scale high-throughput screening tools, such as RB-TnSeq (Randomly-Barcoded Transposon insertion site Sequencing), have been developed to efficiently identify the genetic determinants of bacterial fitness. RB-TnSeq relies on the co-inoculation of a library of mutagenized bacteria, all carrying a unique barcode, to simultaneously evaluate the contribution of each gene to bacterial survival and growth (Wetmore *et al.*, 2015). Such studies result in the identification of genes putatively implicated in bacterial adaptation to the host that then need to be confirmed by reverse genetics using simpler fitness assays.

Early on, it was proposed that competition assays could be used as an answer to this need. Typically, such competition assays are performed by co-inoculating two strains in a 1:1 ratio into a given environment and following the evolution of this ratio over time. If one of the strains grows more than the other, it is considered as more fit (in this specific environment) than its counterpart. The main limiting factor is then to be able to count separately the two mixed populations. A quite straight forward solution

here is to use discriminating markers such as antibiotic resistances to count the abundance of each strain after plating on selective medium. Differential antibiotic resistances have been widely used in co-inoculation assays (Macho *et al.*, 2007 and 2010; Feng *et al.*, 2012) but it is known that such resistances often carry a strong cost of fitness that could interfere in studies that involve fine fitness mechanisms. Also, they require to plate the samples twice, once on each selective medium, which can introduce a bias in the evaluation of the strains relative frequencies. Fluorescent markers provide an alternative to antibiotics but require costly imaging equipment (Perrier *et al.*, 2019). Here we describe a visual blue/white screening using the enzymatic properties of the beta-glucuronidase (GUS) enzyme. The assay is then performed by co-inoculating a GUS-expressing strain in competition with a non-tagged strain: after plating on medium containing X-gluc (the substrate of the GUS enzyme), colonies of tagged bacteria will turn blue while the others will remain white. A similar Bio-protocol had been proposed before using *LacZ* as a marker in the *Vibrio cholerae* animal pathogen (Fu and Mekalanos, 2014). However, even though the concept is similar, we feel that a detailed protocol for plant inoculations is very much needed.

Here, we chose the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) as a model to illustrate this protocol. *Xcc* is particularly interesting because it has the specificity to infect multiple organs and tissues of its cauliflower host (*Brassica oleracea* pv. *botrytis* cv. Clovis). After entry through the hydathodes, *Xcc* spreads through the xylem sap-conducting vessels and colonizes the leaf mesophyll of its host where it causes the typical symptoms of the Black rot disease (Vicente and Holub, 2013; An *et al.*, 2019). We recently performed an RB-TnSeq screening on *Xcc* during cauliflower infection (unpublished data) that ultimately led us to set up a competition assay. In this protocol, we describe how this competition assay can be performed in the plant leaf mesophyll. We take the example of the well-described *hrpX* (transcriptional activator of the Type III Secretion System), *hrcV* (Type III Secretion System component) and *xopAC* (Type III Effector) mutants that display contrasted fitness phenotypes when confronted with the *Xcc* 8004 wild-type strain *in planta*. This protocol provides a basis that can be adapted for other plant compartments such as hydathodes or xylem as well as *in vitro* studies. Availability of such protocol is particularly relevant given the number of plant pathogens that enter through and thrive into their host leaves.

Materials and Reagents

1. 2-ml microcentrifuge tubes (Sarstedt, catalog number: 72.695.400)
2. 5-ml tubes (Sarstedt, catalog number: 72.701)
3. Petri dishes 92 x 16 mm (Sarstedt, catalog number: 82.1473)
4. 1-ml Blunt syringe (SOFT-JECT HSW, catalog number: 5010.200V0)
5. Sterile 4-mm diameter glass beads (Dutscher, catalog number: 068502)
6. Sterile 96-well V-bottom clear polystyrene microplates (Greiner Bio-One, catalog number: 651101)
7. Sterile pipette tips

8. Compost (Proveen, catalog number: 14926)
9. Cauliflower: *Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Clovis F1 (Vilmorin)
Note: Plants are grown under greenhouse conditions and used at 4 weeks after sowing. All inoculations were performed using the second true leaf (second leaf above the cotyledons). After inoculation, plants are kept in classical growth chamber conditions: 9 h light; 22 °C; 70% relative humidity.
10. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) strain 8004::GUS-GFP (WT hereafter; Cerutti et al., 2017) and variants: Xcc 8004::GUS*-GFP* (WT* hereafter, carrying the point mutations Y468A and Y66A inactivating the catalytic sites of the β -glucuronidase and GFP proteins respectively); Xcc 8004::GUS-GFP Δ hrpX; Xcc 8004::GUS-GFP Δ hrcV; Xcc 8004::GUS-GFP Δ xopAC
Note: With concerns to the cost of fitness related to the constitutive expression of the GUS-GFP cassette, we decided to create the non-functional version of the cassette for our reference strain. With this system, the two challenged strains carry and express the GUS-GFP cassette, but only one of them will actually appear as tagged. We thus remove the possibility of a fitness cost associated with the cassette while still being able to differentiate the two mixed strains.
11. Spectrophotometer cells (Standard Polystyrene Semi-micro Cuvettes, Sarstedt, catalog number: 67.742)
12. Sterile distilled water
13. Magnesium chloride (MgCl₂) (Merck, catalog number: 105832)
14. Yeast extract (Sigma-Aldrich, catalog number: Y1625)
15. Casamino acids (BD, BD Biosciences, catalog number: 223050)
16. Potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄) (Merck, catalog number: 105101)
17. Agar (BD, BD Biosciences, catalog number: 214010)
18. Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄·7H₂O) (Merck, catalog number: 105886)
19. X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt monohydrate) (BIOSYNTH, catalog number: B-7300)
20. DMF (N,N Dimethylformamide) (Sigma-Aldrich, catalog number: D4551)
21. Rifampicin (Euromedex, catalog number: 1059)
22. Methanol (VWR, catalog number: 20847.320)
23. Pimaricin (DSM, DEVLOCID Instant, catalog number: 00226)
24. MOKA medium (see Recipes)
25. 1 mM MgCl₂ solution (see Recipes)
26. X-gluc (see Recipes)
27. Rifampicin (see Recipes)
28. Pimaricin (see Recipes)

Equipment

1. 6-mm diameter Hollow punch (Harris, Uni-Core, Electron Microscopy Sciences, catalog number: 69039-60)
2. Hand-held colony counter (Heathrow Scientific, catalog number: HS120000)
3. 28 °C bacteria incubator
4. Centrifuge (Eppendorf, model: 5415D)
5. Beads-assisted grinder (Retsch, catalog number: MM400)
6. Spectrophotometer (Amersham Biosciences, model: Ultrospec 2100 pro)
7. Sterile environment (bunzen burner or microbiology hood)
8. Multi-channel pipette (10-100 µl)
9. Mono-channel pipettes

Procedure

A. Preparation of bacterial cells for the inoculation

1. Bacterial cells grown on MOKA plates with appropriate antibiotics (*i.e.*, Rifampicin 50 µg/ml here) are used to inoculate 5 ml of liquid MOKA medium (with same antibiotics) and grown overnight at 28 °C under agitation at 200 rpm.
2. Centrifuge 2 ml of bacterial preculture for 5 min at 6,000 rpm (*i.e.*, 3.3 x *g*) and wash twice in 1 mM MgCl₂. Resuspend in 1 mM MgCl₂ and measure OD_{600nm}.
3. Prepare 1 ml of bacterial suspension in a 2-ml tube so that for each strain OD_{600nm} = 0.1 final (*i.e.*, 1 x 10⁸ cfu/ml, note: this estimation has to be verified when working with other species by plating on solid medium) in 1 mM MgCl₂.
4. Dilute each suspension to 1/100 in a 5-ml tube to obtain a final inoculum at OD_{600nm} = 0.001 (*i.e.*, 1 x 10⁶ cfu/ml) in 5 ml of 1 mM MgCl₂. For the WT* reference strain, prepare 10 ml of suspension at OD_{600nm} = 0.001 as it will be used in all mixes.
5. Mix 2 ml of WT* suspension with 2 ml of each of the strains to test in another 5-ml tube (so that each mixed strain is at 5 x 10⁵ cfu/ml but the final concentration of the inoculum is 1 x 10⁶ cfu/ml).

B. Inoculation

1. Using a blunt syringe, filled with one milliliter of bacterial suspension, infiltrate the mesophyll of the 2nd true leaf of cauliflower (for pictures of the procedure, see Cohn *et al.*, 2015). A large enough area should be infiltrated in order to later be able to sample a 6-mm leaf disc without taking any of the tissues damaged by the syringe. Typically, up to seven separate spots can be infiltrated on the same cauliflower leaf, thus allowing the inoculation of multiple strains or mixes on the same leaf. In this case, be careful to well separate infiltration areas to exclude cross-contamination.
2. Circle the infiltrated area on the lower side of the leaf to mark the infected tissue for later sampling.
3. Place the plants in the growth chamber and water them appropriately.

- C. Plating of the inoculation suspensions and counting of the initial relative frequencies in mixed populations
1. Transfer 100 μ l of inoculation suspension into a 96-well plate with conical bottom.
 2. Perform serial 1/10 dilutions (10 μ l in 90 μ l of 1 mM MgCl_2) using a multichannel pipette.
 3. Take 100 μ l of dilution 10^{-3} and spread out them on round 92-mm MOKA plates containing the appropriate antibiotics (*i.e.*, Rifampicin 50 μ g/ml here) and fungicide (*i.e.*, Pimaricin 30 μ g/ml here) as well as X-Gluc 200 μ M. In our case, spreading is performed by shaking using 4-mm glass beads until homogeneous repartition of the suspension.
 4. Incubate 4-5 days at 28 °C to allow bacterial growth and blue staining of GUS-expressing colonies.
 5. Count blue and white colonies, *e.g.*, using a hand-held colony counter, to determine the ratio of mixed strains at T_0 . This is necessary for proper normalization during later calculation of the CI (see Data analysis section).
- D. Sampling, plating and counting of relative frequencies in mixed populations after incubation
1. Three days after inoculation, sample mesophyll tissues by punching out a 6-mm leaf disc in the infiltrated area defined by the marker label and placing it in 200 μ l of 1 mM MgCl_2 .
 2. Grind leaf samples using 4-mm glass beads in 2-ml tubes (2 beads per tube) using the beads-assisted grinder for 2 min at 30 Hz.
 3. Centrifuge shortly (five seconds) the tubes containing the ground material to gather it at the bottom.
 4. Transfer 100 μ l of ground tissue in a 96-well plate with conical bottom.
 5. Proceed as described in Steps C2 to C5. However, because each strain displays a different phenotype and to ensure the presence of colonies from both strains, plate 50 μ l of dilutions 10^{-2} and 10^{-3} .

Note: Classically, we advise to collect bacterial titers by counting the plates displaying between 30 and 300 colonies. However, because competition assays require to finely determine the number of CFU for each of the mixed strains, we recommend to count plates where there are at least 100 colonies for mix-inoculated samples.

Data analysis

For reproducibility purposes, experiments should be performed in at least four biological replicates. A biological replicate is defined as a replication of complete experimental procedure with fresh buffers, fresh bacterial cells suspension prepared from cells grown on new solid medium and new batches of plants. Results of competition assays are displayed as a Competitive Index (CI), which is defined as the ratio of the relative abundance of mutant over WT* strain after incubation normalized by the relative abundance of mutant over WT* strain in the inoculum (Taylor *et al.*, 1987;

Macho *et al.*, 2007):

$$CI = \frac{\left(\frac{N(\text{mutants})}{N(WT)} \right)_{3dpi}}{\left(\frac{N(\text{mutants})}{N(WT)} \right)_{T0}}$$

N: number of colonies

dpi: days post inoculation

Here, we used the *Xcc* 8004::GUS-GFP $\Delta hrpX$, $\Delta hrpV$ and $\Delta xopAC$ mutants as an example for this protocol. These three strains are Type III Secretion System-related mutants that exhibit contrasted fitness *in planta* (Feng *et al.*, 2012; Guy *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Competitive indices of these three strains when co-inoculated with the WT* strain are shown in Figure 1. *Xcc* 8004::GUS-GFP is a negative control whose fitness should be the same as the WT* reference strain (*i.e.*, $CI \sim 1$). Strains with $CI < 1$ are considered less fit than the WT strain in the mesophyll environment.

We used four independent biological replicates of one plant sample each. The plot was generated using the ggplot2 package of the R software (Wickham, 2016; <https://github.com/tidyverse/ggplot2>). We purposely set a log10-based scale to stretch out low CI values that would be hardly differentiable otherwise. Statistical treatment of the data was also achieved with R using the Kruskal-Wallis test. Groups identified as significantly different ($P < 0.05$) are displayed using the letters 'a', 'b' and 'c' in Figure 1A.

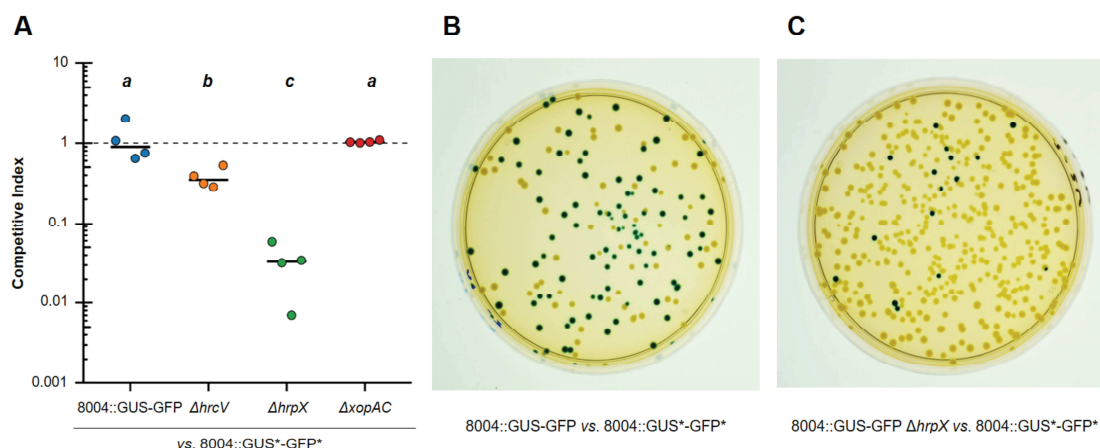


Figure 1. Competition assay of *Xcc* 8004::GUS-GFP strain and related mutants in cauliflower mesophyll. All competition assays were performed by co-inoculating the *Xcc* 8004::GUS*-GFP* reference strain with *Xcc* 8004::GUS-GFP derivatives in a 1:1 ratio. Mesophyll discs were sampled at 3 days post-inoculation. A. Graphical representation of competition assays results. Strains showing $CI \sim 1$ are considered as fit as the WT strain while strains with $CI < 1$ are considered less fit than the WT strain in the mesophyll environment. Horizontal bars show the median for four

independent biological replicates of one plant sample each. Statistical significance of fitness differences was evaluated by a Kruskal-Wallis test. Groups identified as significantly different ($P < 0.05$) are displayed using the letters 'a', 'b' and 'c'. Results showing the same letter belong to the same statistical group. B. Photo of a plate displaying colonies from the WT vs. WT* sample at 3 dpi in the mesophyll. Visually, the two populations are roughly present in a 1:1 ratio, illustrating the expected equivalent fitness of both strains. The same 1:1 ratio is obtained after plating any of the inoculation suspensions. C. Photo of a plate displaying colonies from the $\Delta hrpX$ vs. WT* sample at 3 dpi in the mesophyll. Blue-stained colonies of the $\Delta hrpX$ strain are strongly under-represented, clearly exposing the large deficit of fitness of this strain.

Recipes

1. MOKA medium
 - a. Mix 4 g of yeast extract, 8 g of casamino acids, 2 g of K_2HPO_4 and 0.3 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 - b. Add distilled water to 1 L
 - c. Mix until complete dissolution of the reagents
 - d. Sterilize 250-ml aliquots of the mixture by autoclaving at 120 °C for 20 min
 - e. Store at room temperature
 - f. Solid MOKA medium for plates is prepared identically and complemented with 3.75 g of agar added to each individual 250-ml aliquot before autoclaving
2. 1 mM $MgCl_2$ solution
 - a. Prepare a stock solution of 1 M $MgCl_2$ by dissolving 2.033 g of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ in 10 ml of dH₂O
 - b. Sterilize by autoclaving at 120 °C for 20 min
 - c. Prepare 1 mM $MgCl_2$ by diluting the stock solution 1/1,000 in sterile dH₂O
 - d. Both solutions are stored at room temperature
3. X-gluc
 - a. Prepare X-gluc 500x stock solution by dissolving 0.54 g of X-gluc in 10 ml of DMF
 - b. Store at -20 °C
 - c. Add 500 μ l of X-gluc stock solution to 250 ml of MOKA + Agar solution to get a final concentration of 200 μ M of X-gluc in plates used for CI measurement
4. Rifampicin
 - a. Dissolve rifampicin powder in methanol to obtain a stock solution at 10 mg/ml
 - b. Store at -20 °C
 - c. Dilute rifampicin stock solution to 1/200 in MOKA media to obtain a final concentration of 50 μ g/ml
5. Pimaricin
 - a. Resuspend pimarin powder in water to obtain a stock solution at 30 mg/ml
 - b. Store at 4 °C

- c. Dilute pimarin stock solution to 1/1,000 in MOKA media to obtain a final concentration of 30 µg/ml

Acknowledgment

This work was supported by a PhD grant from the French Ministry of National Education and Research to JSL. JSL, LDN, EL and AB are supported by the ANR (ANR-19-CE20-0014-01). LIPM is part of the French Laboratory of Excellence project (TULIP ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Competing interests

There are no competing interests.

References

1. An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L. and Tang, J. L. (2019). [Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*](#). *FEMS Microbiol Rev.*
2. Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M. C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S., Leonhardt, N., Berthome, R. and Noel, L. D. (2017). [Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris*](#). *Plant Physiol* 174(2): 700-716.
3. Cohn, M., Shybut, M., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B. (2015). Assays to Assess Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* on Cassava. *BIO-Protoc.* 5.
4. 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(7396): 114-118.
5. Fu, Y. and Mekalanos, J. J. (2014). [Infant rabbit colonization competition assays](#). *Bio-protocol* 4(11): e1147.
6. Guy, E., Lautier, M., Chabannes, M., Roux, B., Lauber, E., Arlat, M. and Noel, L. D. (2013). [xopAC-triggered immunity against *Xanthomonas* depends on Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase genes PBL2 and RIPK](#). *PLoS One* 8(8): e73469.
7. Macho, A. P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzón, C. R. and Genin, S. (2010). [A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants](#). *Mol Plant Microbe Interact* 23(9): 1197-1205.
8. Macho, A. P., Zumaquero, A., Ortiz-Martin, I. and Beuzón, C. R. (2007). [Competitive index in mixed infections: a sensitive and accurate assay for the genetic analysis of *Pseudomonas syringae*-plant interactions](#). *Mol Plant Pathol* 8(4): 437-450.

9. Perrier, A., Barlet, X., Rengel, D., Prior, P., Poussier, S., Genin, S. and Guidot, A. (2019). [Spontaneous mutations in a regulatory gene induce phenotypic heterogeneity and adaptation of *Ralstonia solanacearum* to changing environments](#). *Environ Microbiol* 21(8): 3140-3152.
10. Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. and Mekalanos, J. J. (1987). [Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(9): 2833-2837.
11. Vicente, J. G. and Holub, E. B. (2013). [Xanthomonas campestris pv. campestris \(cause of black rot of crucifers\) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops](#). *Mol Plant Pathol* 14(1): 2-18.
12. Wang, G., Roux, B., Feng, F., Guy, E., Li, L., Li, N., Zhang, X., Lautier, M., Jardinaud, M. F., Chabannes, M., Arlat, M., Chen, S., He, C., Noel, L. D. and Zhou, J. M. (2015). [The decoy Substrate of a pathogen effector and a pseudokinase specify pathogen-induced modified-Self recognition and immunity in plants](#). *Cell Host Microbe* 18(3): 285-295.
13. Wetmore, K. M., Price, M. N., Waters, R. J., Lamson, J. S., He, J., Hoover, C. A., Blow, M. J., Bristow, J., Butland, G., Arkin, A. P. and Deutschbauer, A. (2015). [Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-coded transposons](#). *MBio* 6(3): e00306-00315.
14. Wickham, H. (2016). [ggplot2: elegant graphics for data analysis](#). In: Wickham, H. (Ed.). *ggplot2*. Springer-Verlag New York. ISBN: 978-3-319-24277-4.

Partie 3

XopJ6 : Identification d'une nouvelle source de résistance à Xcc chez le chou-fleur ?

3.3.1 Entre sérendipité et gros coup de chance : l'effecteur de type III XopJ6 sécrété par Xcc est reconnu par le chou-fleur Clovis F1

Lors de la mise au point des conditions expérimentales nécessaires à la réalisation du criblage RB-TnSeq dans le mésophylle du chou, nous avons fait une observation surprenante. En effet, afin de déterminer quelle concentration d'inoculum utiliser, j'ai effectué des infiltrations dans le mésophylle foliaire de Clovis F1 avec des suspensions bactériennes allant de 10^5 CFU/ml à 10^8 CFU/ml et suivi la croissance de Xcc sur plusieurs jours. Cependant, à partir de 2 jours post-inoculation, un assèchement de la zone infiltrée est apparu sur les zones inoculées avec la suspension la plus concentrée (10^8 CFU/ml). Ce phénotype s'est intensifié le jour suivant et a commencé à se développer progressivement sur les zones infiltrées avec des suspensions moins concentrées. Toutefois ce phénotype ne correspondait pas aux symptômes classiquement associés à la maladie provoquée par Xcc dans le mésophylle, où l'on voit d'abord une chlorose d'un jaune intense suivi d'une nécrose foncée. Nous nous sommes donc demandé si cette réponse rapide de la feuille à l'infection par Xcc pouvait être une réponse hypersensible.

La réponse hypersensible (HR) est une réaction immunitaire forte et rapide qui survient suite à la reconnaissance d'un agent pathogène et qui se caractérise par le déclenchement d'une mort cellulaire localisée (Goodman and Novacky, 1994; Balint-Kurti, 2019). Elle aboutit à l'endiguement généralement total de l'infection en provoquant un ralentissement de la multiplication du pathogène pouvant aller jusqu'à la mort. Dans la nature, la HR est généralement non visible à l'œil nu puisqu'elle ne concerne que quelques cellules autour de l'agent infectieux. Cependant cette manifestation immunitaire a été utilisée par la communauté scientifique pour étudier la reconnaissance de certains facteurs de virulence par la plante hôte.

Table 1 | Symptômes de collapse observés chez tous les mutants d'effecteurs de type III de *Xcc* 8004. Tous les mutants présentent un profil similaire à la souche sauvage 8004 avec un collapse complet à 3 dpi. Chaque souche a été inoculée sur 2 plantes, le résultat de chaque plante est présenté dans une colonne à chaque jour d'observation. **0** : Aucun symptômes ; **SC** : Début de collapse avec seulement quelques points éparpillés dans la zone infiltrée ; **C** : Collapse de toute la zone infiltrée.

Nom du gène	ID du gène (<i>Xcc</i> 8004)	1 dpi		2 dpi		3 dpi		4 dpi	
8004 WT	-	0	0	SC	SC	C	C	C	C
8004 $\Delta hrcV$	XC_3013	0	0	0	0	0	0	0	0
$\Delta xopAC$	XC_1553	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta avrBs1-xopH$	XC_2081 / XC_2082	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopX1-xopX2$	XC_0541 / XC_0542	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta hrpW-xopF$	XC_3023 / XC_3024	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopD$	XC_1213	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopAN-xopQ$	XC_3176 / XC_3177	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopK$	XC_1210	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopJ$	XC_3802	0	SC	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopG$	XC_0967	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta avrXccA1$	XC_4318	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta avrXccA2$	XC_1716	SC	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopAM$	XC_3160	0	0	0	0	C	C	C	C
$\Delta xopE2$	XC_2602	0	SC	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopAH$	XC_2004	0	SC	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopR$	XC_0268	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopL$	XC_4273	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopZ$	XC_2210	SC	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopAL2$	XC_3915 / XC_3916	SC	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopN$	XC_0241	0	0	SC	SC	SC	SC	SC	C
$\Delta xopAG$	XC_0563	0	0	SC	SC	C	C	C	C
$\Delta xopP-xopAL1$	XC_2994 / XC_2995	0	0	SC	SC	C	C	C	C

En particulier, la reconnaissance des effecteurs de type 3 (ET3), des protéines injectées par les bactéries directement dans le cytoplasme des cellules de leur hôte, a souvent été associée à une HR chez des hôtes résistants. Le test de reconnaissance se fait alors par infiltration à forte concentration (de l'ordre de 10^8 CFU/ml) dans la feuille de l'hôte et observation d'un effondrement et assèchement rapide des tissus inoculés (appelé collapse), qui survient entre 1 et 2 jours post-inoculation. Chez *Xanthomonas campestris* c'est par exemple ce que l'on observe pour l'ET3 AvrBs1 qui est reconnu par le poivron (*Capsicum annuum*) ECW-10R (Hibberd, 1987).

Les symptômes observés avec *Xcc* correspondant plus à du collapse de type HR qu'à de la maladie, nous avons fait l'hypothèse que *Xcc* 8004 contient un facteur d'avirulence reconnu par la variété de chou-fleur Clovis F1. Un criblage des ET3s de *Xcc* 8004 a donc été réalisé par inoculation des mutants de délétion de chaque ET3 par infiltration dans le mésophylle foliaire. 25 mutants d'ET3 sur les 29 effecteurs connus chez *Xcc* 8004 étant déjà disponibles dans l'équipe, la mise en place de l'expérience a été facilitée. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Table 1**. Aucun des mutants de délétion des ET3 connus n'a montré d'effet fort amenant à la perte du phénotype de collapse. Cependant, le mutant $\Delta hrcV$ possédant un T3SS non-fonctionnel ne déclenche pas de collapse. Il semble donc que les effecteurs sécrétés par le T3SS puissent être collectivement impliqués dans l'apparition de ces symptômes. Il est néanmoins également possible qu'un ET3 non identifié sécrété par le T3SS soit responsable du collapse.

Aucun gène d'avirulence bactérien n'ayant été identifié sur le chou-fleur, et en absence de contrôle positif, nous avons criblé l'intégralité de notre collection de souches de *Xcc* par infiltration dans le mésophylle foliaire. Ce test sans *a priori* avait pour but de déterminer si le phénotype de collapse observé avec la souche 8004 est une exception ou un phénotype répandu chez les *Xcc*. Parmi les 37 souches testées, toutes présentent un phénotype de collapse, mais deux groupes distincts se sont très vite dégagés (**Figure 1**). D'un côté, le groupe I montre un fort collapse 24h après inoculation, et de l'autre, le groupe II montre des symptômes de collapse plus tardifs, qui apparaissent à 2 dpi et sont complets à 3 dpi, de manière similaire à la souche 8004.

Nom de souche Xcc	1 dpi		2 dpi		3 dpi		4 dpi		
8004 WT	0	0	0	0	C	C	C	C	I
8004 $\Delta hrcV$	0	0	0	0	0	0	SC	0	I
CN07	C	C	C	C	C	D	C	D	I
CN08	C	C	C	C	C	C	C	C	
CN06	C	C	C	C	C	C	C	C	
CN12	SC	C	C	C	C	C	C	C	
CN02	C	C	C	C	C	C	C	C	
CN18	C	C	C	C	C	C	C	C	
CN17	C	C	C	C	C	C	C	C	
CN03	SC	SC	C	C	C	C	C	C	II
B100	0	0	0	0	SC	C	C	C	
CFBP4953	0	0	0	SC	SC	SC	C	C	
CN01	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP1869	0	0	0	SC	C	C	C	C	
CFBP1119	0	0	0	SC	C	C	C	C	
CN11	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP5130	0	0	0	SC	C	C	C	C	
147	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CN19	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CN10	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP5817	0	0	0	0	0	SC	SC	C	
CN20	0	0	SC	SC	C	D	C	D	
CFBP4956	0	0	SC	SC	SC	SC	C	C	
CFBP1124	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP6863	0	0	SC	SC	SC	SC	C	C	
ATCC33913	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CN05	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CN13	0	0	0	SC	C	C	C	C	
CFBP4955	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP6865	0	0	C	C	C	D	C	D	
CFBP4954	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP5683	0	0	0	SC	C	C	C	C	
CFBP1712	0	0	SC	SC	C	C	C	C	
CFBP1713	0	0	C	C	C	C	C	C	
CFBP12824	0	SC	C	C	C	C	C	C	
CN16	0	0	C	C	D	D	D	D	
CN14	0	0	0	SC	C	C	C	C	
CN15	0	0	C	C	D	D	D	D	

Figure 1 | Symptômes de collapse observés en réponse à l'infiltration des souches de Xcc disponibles dans l'équipe. Deux groupes se dégagent avec (I) des souches provoquant un collapse rapide visible à 1 dpi et (II) des souches qui présentent le même profil que la 8004 avec un collapse complet à 3 dpi. Chaque souche a été inoculée sur 2 plantes, le résultat de chaque plante est présenté dans une colonne à chaque jour d'observation. **0** : Aucun symptôme ; **SC** : Début de collapse avec seulement quelques points éparpillés dans la zone infiltrée ; **C** : Collapse de toute la zone infiltrée ; **D** : Décoloration de la zone infiltrée qui nécrose et présente un aspect « papier à cigarette ».

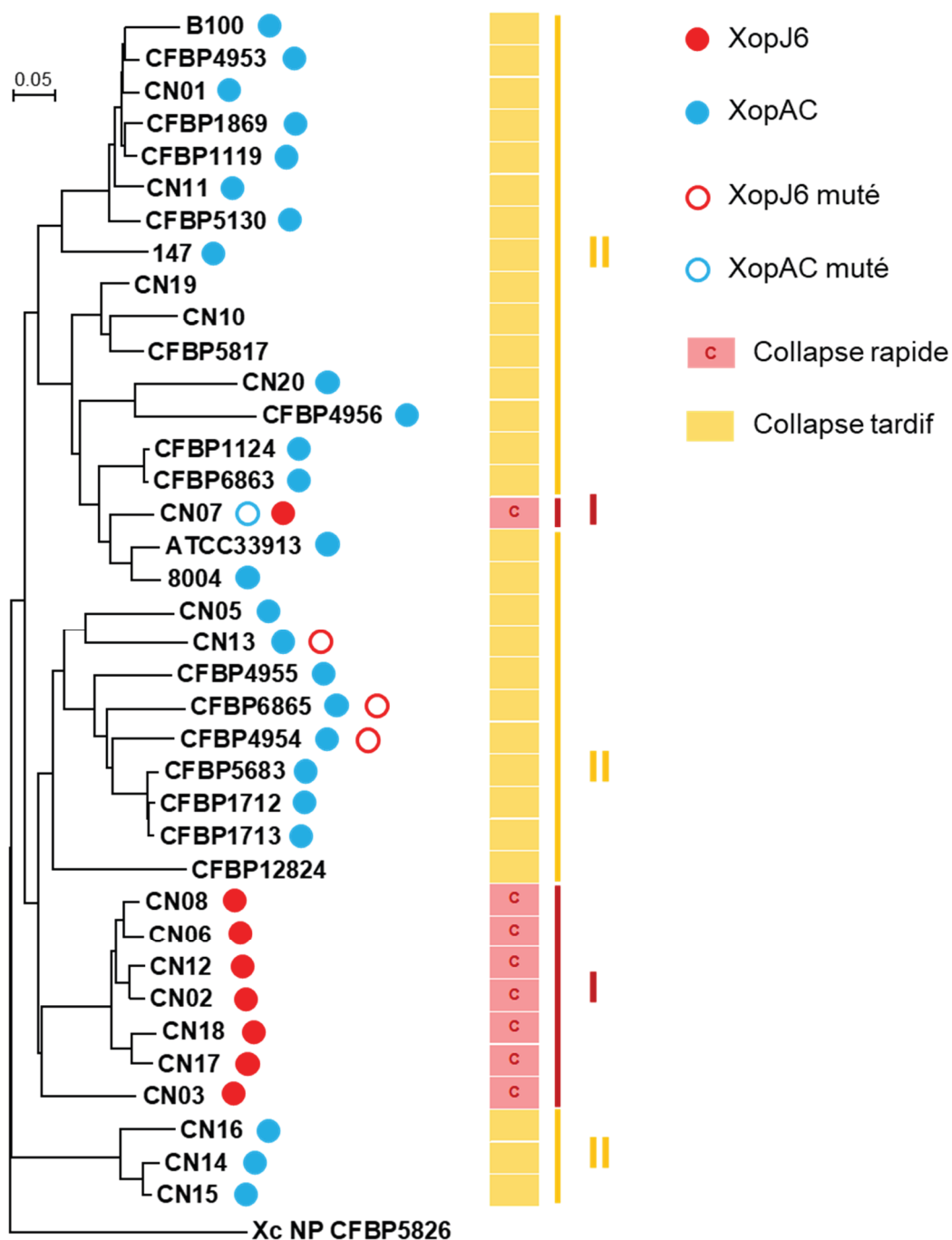


Figure 2 | Les symptômes de collapse observés chez Clovis F1 sont obtenus exclusivement avec des souches possédant *xopJ6*. Phylogénie des souches de *Xcc* comme décrit dans Denancé et *al.* 2018. La souche non-pathogène *Xanthomonas campestris* CFBP5826 a été utilisée pour enraciner l'arbre. La présence de *xopJ6* (*xopJ6*_{CN06}) et de *xopAC* est représentée par les points rouge et bleu respectivement. Les cercles vides indiquent la présence des gènes contenant au moins une mutation ponctuelle. Les rectangles jaunes et rouges indiquent le phénotype de collapse causé par chaque souche sur Clovis F1 et leur répartition dans les groupes I et II identifiés précédemment (Figure 1).

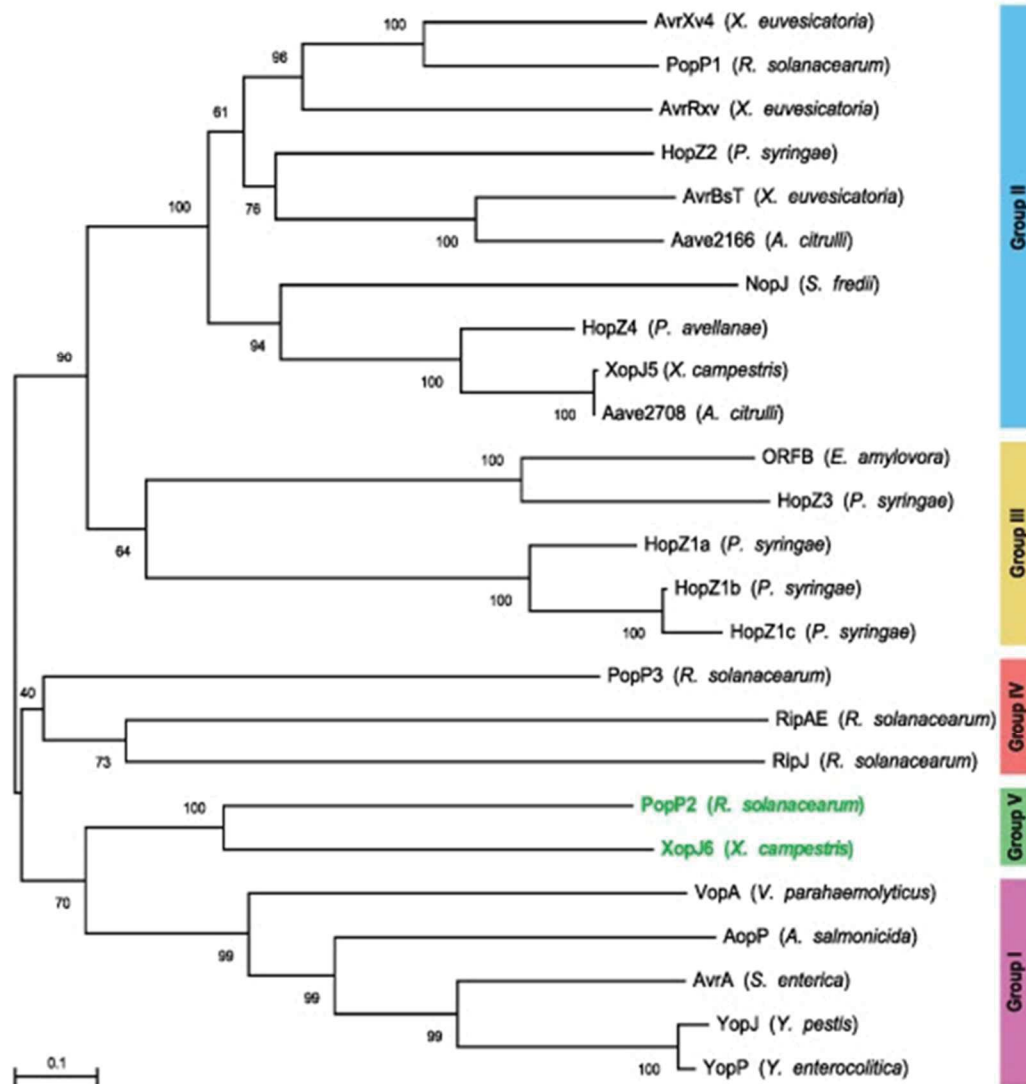


Figure 3 | Arbre phylogénétique des 25 membres de la famille d'effecteurs bactériens YopJ. La position de XopJ6 et de son plus proche orthologue PopP2 est indiquée en vert (groupe V). Les valeurs de bootstrap associées à l'arborescence sont indiquées au niveau de chaque nœud. La barre d'échelle indique la distance évolutive calculée selon le nombre de substitutions d'acide aminé pour chaque position avec une correction de Poisson. La division des groupes I à V est basée sur l'étude de Ma & Ma (2016). Les identifiants GenBank des accès pour les protéines utilisées pour construire l'arbre sont les suivantes : AAG39033 pour AvrXv4 (*Xanthomonas euvesicatoria*), CAF32331 pour PopP1 (*Ralstonia solanacearum*), AAA27595 pour AvrRxv (*X. euvesicatoria*), CAC16700 pour HopZ2 (*Pseudomonas syringae*), AAD39255 pour AvrBsT (*X. euvesicatoria*), ABM32744 pour Aave2166 (*Acidovorax citrulli*), NP_443964 pour NopJ (*Sinorhizobium fredii*), EKG29639 pour HopZ4 (*P. syringae*), WP_011347382 pour XopJ5 (*X. campestris*), ABM33278 pour Aave2708 (*A. citrulli*), AAF63400 pour ORFB (*Erwinia amylovora*), AAF71492 pour HopZ3 (*P. syringae*), AAR02168 pour HopZ1a (*P. syringae*), WP_004661226 pour HopZ1b (*P. syringae*), AAL84243 pour HopZ1c (*P. syringae*), CAF32358 pour PopP3 (*R. solanacearum*), CAD13849 pour RipAE (*R. solanacearum*), CAD15839 pour RipJ (*R. solanacearum*), CAD14570 pour PopP2 (*R. solanacearum*), AAT08443 pour VopA (*Vibrio parahaemolyticus*), NP_710166 pour AopP (*Aeromonas salmonicida*), AAL21745 pour AvrA (*Salmonella enterica*), AKN09807 pour YopJ (*Yersinia pestis*) et AAN37537 pour YopP (*Y. enterocolitica*). La séquence en acides aminés de XopJ6 (*X. campestris*) correspond à la traduction du gène CN06-G2_01.2135 dans la version privée de l'annotation du génome de la souche CN06 (L. Noël, données non publiées). L'arbre a été construit avec MEGA X (Kumar et al., 2018). Figure tirée de la thèse de Manuel González-Fuente.

Par chance, un travail indépendant en cours dans notre équipe sur la caractérisation d'un nouvel ET3, appelé XopJ6, et l'investigation de son rôle dans l'avirulence de *Xcc* chez certains écotypes d'*Arabidopsis thaliana* a permis de faire le lien entre la présence de cet effecteur et le phénotype de collapse du groupe I (**Figure 2**). En effet, la répartition de XopJ6 dans ces souches correspond exactement à la dichotomie des résultats obtenus sur Clovis F1 : l'intégralité des souches possédant XopJ6 ont provoqué un collapse rapide et l'intégralité des souches qui ont provoqué un collapse rapide possède XopJ6. Il semble donc que XopJ6 soit reconnu par le chou-fleur Clovis F1. Nous avons alors fait l'hypothèse que XopJ6 puisse être un facteur d'avirulence de *Xcc* chez le chou-fleur.

La sérendipité se définit comme l'art de faire une découverte par hasard (Dictionnaire Larousse). Par extension, il s'agit du hasard heureux de faire une découverte inattendue d'importance supérieure à l'objet de la recherche initiale. Ce terme, fréquemment utilisé pour justifier l'intérêt de la recherche fondamentale, décrit bien notre situation. Effectivement, en cherchant à savoir si le phénotype de collapse observé chez *Xcc* 8004 était une exception, nous avons probablement trouvé un gène d'avirulence chez *Xcc* et donc potentiellement identifié la première source de résistance à *Xcc* chez le chou-fleur.

3.3.2 Un deuxième gros coup de chance : XopJ6 est l'orthologue de PopP2, un effecteur de type III de *Ralstonia solanacearum* extensivement caractérisé

Le gène *xopJ6* code pour une acétyltransférase putative. Par une étude phylogénétique, XopJ6 a été identifié comme membre de la famille YopJ, famille qui regroupe majoritairement des ET3 de bactéries pathogènes d'animaux et de végétaux (**Figure 3**). L'orthologue le plus proche de XopJ6 est PopP2, un ET3 présent chez un autre phytopathogène majeur, *Ralstonia solanacearum*, dont la fonction moléculaire a été étudiée en détail depuis plus de 20 ans (Deslandes et al., 1998; Deslandes et al., 2003; Tasset et al., 2010; Le Roux et al., 2015; Zhang et al., 2017). PopP2 est une acétyltransférase qui est injectée dans les cellules hôtes où elle va bloquer l'activation des réponses immunitaires par interaction directe avec des facteurs de transcriptions eucaryotes de la famille WRKY (Deslandes and Genin, 2014). Du point de vue

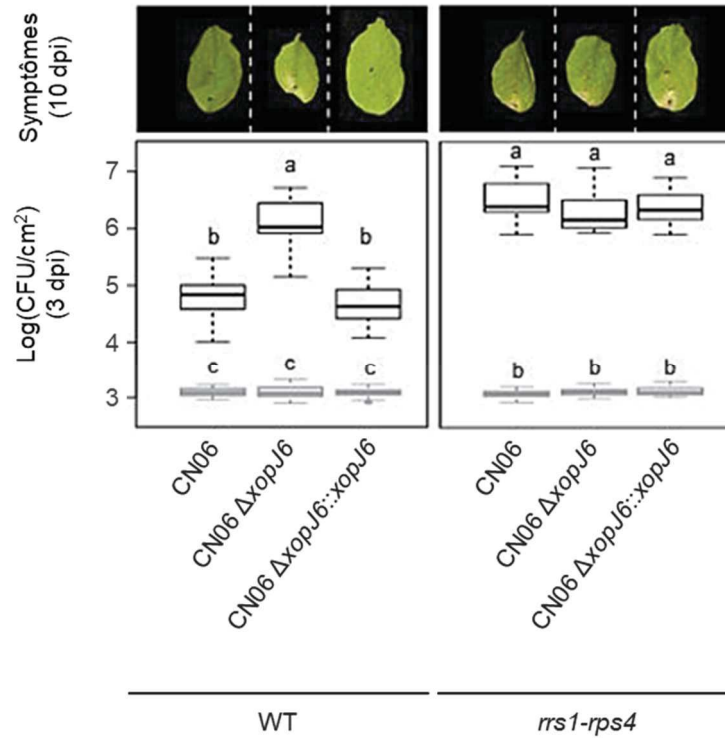


Figure 4 | XopJ6 est un facteur d'avirulence reconnu par la paire de récepteurs RRS1/RPS4 chez *Arabidopsis thaliana*. Symptômes visibles à 10 dpi (en haut) après inoculation par piqûre de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* Ws-0 sauvage (WT) ou du mutant *rrs1-rps4* (inoculum à 10^8 CFU/ml). Les photos sont représentatives de la sévérité des symptômes observés sur 24 feuilles issus de 3 réplicas biologiques indépendants. Populations bactériennes (en bas) à 0 dpi (en gris) et 3 dpi (en noir) dans les feuilles d'*A. thaliana* des mêmes génotypes après infiltration d'une suspension bactérienne à 10^5 CFU/ml. Les boxplots représentent les données obtenues au cours de 3 réplicas biologiques avec 17 échantillons à 0 dpi et 27 échantillons à 3 dpi. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents selon le test de Kruskal-Wallis (p-value < 0.01). Résultats produits par Emmanuelle Lauber et figure adaptée de la thèse de Manuel González-Fuente (LIPM).

mécanistique, PopP2 stabilise la fixation du facteur de transcription RRS1 à l'ADN et maintient ainsi une répression de l'expression des gènes de défense (Noutoshi et al., 2005; Deslandes and Genin, 2014). Cependant, l'activité d'acétylation de PopP2 peut être perçue chez certains hôtes par la paire de co-récepteurs intracellulaires RRS1-R/RPS4 et conduire à l'avirulence de la bactérie (Deslandes et al., 2002; Tasset et al., 2010). Dans ce cas, la version allélique 'Résistante' RRS1-R se comporte comme un leurre qui, après acétylation de son domaine WRKY, active le complexe RRS1-R/RPS4 et déclenche une forte réponse immunitaire (Le Roux et al., 2015). Plusieurs résidus sont impliqués dans l'activité catalytique de PopP2 et certains sont même nécessaires pour sa reconnaissance par la plante hôte. En particulier, la triade catalytique composée des résidus H260, D279 et C321, conservée chez les membres de la famille YopJ (Orth et al., 2000), sont indispensables pour l'acétylation du domaine WRKY de RRS1-R (Tasset et al., 2010; Le Roux et al., 2015). Le résidu N296 est lui aussi important pour l'interaction avec RRS1-R puisque la mutation simultanée des trois résidus E284, D292 et N296 empêche l'acétylation de RRS1-R et l'activation de la réponse immunitaire (Zhang et al., 2017). De la même manière que PopP2, XopJ6 pourrait avoir un rôle dans la répression des défenses des hôtes sensibles par une activité d'acétylation qui serait reconnue chez des hôtes résistants. Par chance, Laurent Deslandes, le spécialiste mondial de la biologie de PopP2, qui a caractérisé sa fonction et sa reconnaissance chez l'hôte, travaille au sein du LIPM. Une collaboration avec son équipe a permis de mettre en place une étude comparative de XopJ6 et PopP2. Dans un premier temps, Emmanuelle Lauber (LIPM) a pu montrer que XopJ6 est reconnu chez *Arabidopsis thaliana* par la même paire de récepteurs nucléaires que PopP2, RRS1-R/RPS4, et que cette reconnaissance aboutit à la perte totale de virulence chez *Xcc* (**Figure 4**). Les travaux menés dans l'équipe de Laurent Deslandes ont par ailleurs mis en évidence que XopJ6 interagit directement avec RRS1-R et que cette interaction empêche la fixation de RRS1-R à l'ADN végétal. Cependant, l'activité acétyltransférase de XopJ6 n'a pas encore été expérimentalement démontrée.

Parmi notre collection de souches de *Xcc*, un variant naturel de XopJ6, appelé XopJ6^{CN13}, n'est pas reconnu par RRS1-R/RPS4. Ce variant possède deux mutations ponctuelles, C72G et N382K. La substitution C72G n'intervient dans aucun site catalytique pré-identifié et ne semble pas avoir de conséquence sur la reconnaissance de XopJ6 chez

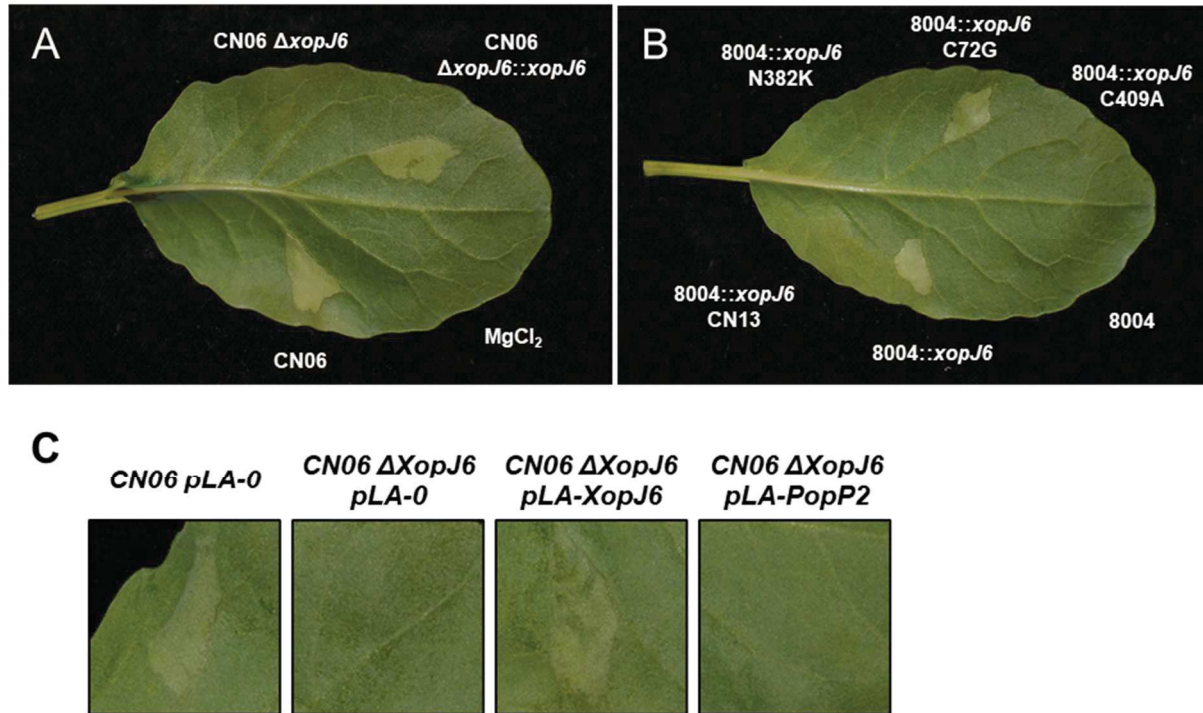


Figure 5 | La présence de XopJ6 chez *Xcc* entraîne un collapse rapide du mésophylle foliaire du chou-fleur Clovis F1. Le mésophylle du chou-fleur Clovis F1 a été inoculé par infiltration avec une suspension à 10^8 CFU/ml de **A)** la souche CN06 contenant ou non *xopJ6*, **B)** la souche 8004 contenant les différents variants alléliques de *xopJ6* et **C)** les souches CN06 et CN06 $\Delta xopJ6$ portant le plasmide pLAFR6 vide (pLA-0), avec *xopJ6* (pLA-J6) ou avec *popP2* (pLA-PopP2).

Arabidopsis thaliana. En revanche la substitution N382K, qui intervient sur le résidu homologue au N296 chez PopP2 impliqué dans l'interaction avec RRS1-R (Zhang et al., 2017), aboutit à la perte de reconnaissance de XopJ6 par *A. thaliana*. Par ailleurs, l'introduction d'une mutation ponctuelle C409A dans la triade catalytique (équivalent de C321A chez PopP2) abolit également la reconnaissance de XopJ6 chez *A. thaliana*. Dans la mesure où les domaines catalytiques sont conservés entre PopP2 et XopJ6, il est rassurant de voir que des substitutions sur des résidus cruciaux aboutissent aux mêmes phénotypes chez les deux protéines.

Les travaux menés dans notre équipe par Emmanuelle Lauber et Laurent Noël, ainsi que dans l'équipe de Laurent Deslandes, semblent donc indiquer une similarité totale, aussi bien dans la structure que la fonction de XopJ6 et de PopP2. De manière assez intéressante, le phénotype d'avirulence porté par XopJ6 chez *Xcc* est complété par l'introduction de *popP2* dans une souche mutante dépourvue de *xopJ6*. Ces résultats semblent donc indiquer que XopJ6 et PopP2 sont fonctionnellement interchangeables.

3.3.3 XopJ6 : facteur de virulence ou d'avirulence chez le chou-fleur ?

XopJ6 est-il responsable du collapse observé sur le chou-fleur Clovis F1 ? Afin de tester cette hypothèse, la souche CN06 et la souche mutante CN06 $\Delta xopJ6$ ont été inoculées par infiltration dans le mésophylle foliaire. La délétion de *xopJ6* abolit complètement la réponse rapide de collapse sur les feuilles de Clovis F1 (**Figure 5A**). De plus, la complémentation génomique en *trans* du mutant restaure intégralement le phénotype sauvage chez la souche CN06 $\Delta xopJ6::xopJ6$. Il semblerait donc bien que XopJ6 soit l'unique responsable du collapse observé sur le chou-fleur Clovis F1 à 24 h. La souche 8004, naturellement dépourvue de XopJ6, et la souche 8004::*xopJ6* dans laquelle a été introduite une copie du gène *xopJ6* de la souche CN06 ont également été testées. Alors que le collapse rapide n'est pas visible avec la souche sauvage 8004, la souche 8004::*xopJ6* conduit bien aux symptômes de collapse attendus (**Figure 5B**). Ces deux expériences de perte puis de gain de fonction nous apportent ici la preuve que XopJ6 est bien responsable du collapse de type HR observé sur le chou-fleur Clovis F1.

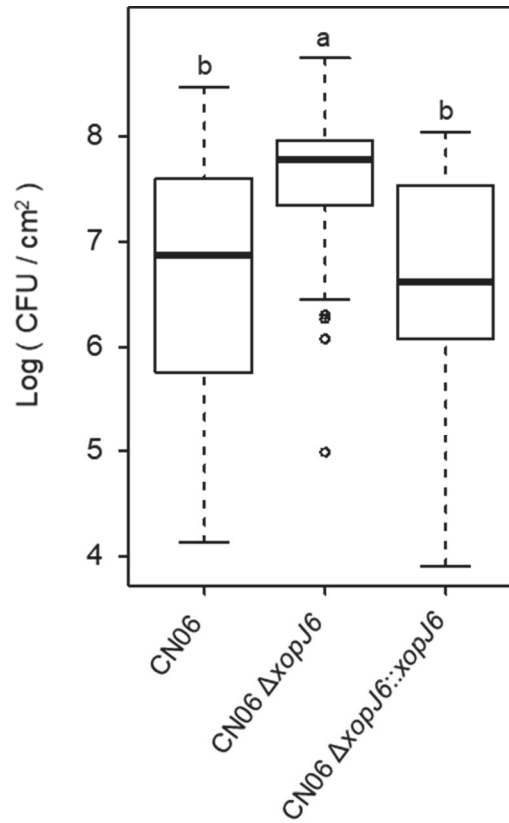


Figure 6 | XopJ6 limite la multiplication de Xcc dans les hydathodes du chou-fleur. Les populations bactériennes dans les hydathodes de Clovis F1 ont été dénombrées à 3 dpi (n = 36) après inoculation par trempage dans une suspension ajustée à 10^8 CFU/ml. La fitness de la souche sauvage CN06 est améliorée chez le mutant CN06 $\Delta xopJ6$ et retrouvée chez la souche complémentée CN06 $\Delta xopJ6::xopJ6$. Les lettres représentent les groupes statistiquement différents selon le test de Kruskal-Wallis (p-value < 0.05). Résultats obtenus par Emmanuelle Lauber (LIPM).

Le collapse causé par XopJ6 chez le chou-fleur est-il dû au même mécanisme de reconnaissance que celui identifié chez *A. thaliana* pour PopP2 ? Dans la mesure où le chou-fleur Clovis F1 est un hybride commercial, la séquence de son génome n'est pas disponible. Il est donc impossible de déterminer la présence ou non d'orthologues du couple de récepteurs RRS1/RPS4. Cependant, les souches de *Xcc* 8004 dans lesquelles ont été insérées les différentes versions alléliques de *xopJ6* étant disponibles, les souches contenant (i) le variant naturel *xopJ6_{CN13}*, (ii) les versions alléliques avec chacune des mutations individuelles *xopJ6_{C72G}* et *xopJ6_{N382K}* et (iii) la version contenant la mutation dans le site catalytique *xopJ6_{C409A}* ont été testé sur le chou-fleur (**Figure 5B**). De manière identique aux résultats obtenus sur *Arabidopsis thaliana*, l'addition de *xopJ6_{C72G}* provoque un collapse du tissu foliaire et indique que la mutation C72G n'affecte pas la reconnaissance de XopJ6 par l'hôte. Également, tout comme chez *A. thaliana*, les versions alléliques *xopJ6_{N382K}*, *xopJ6_{CN13}* et *xopJ6_{C409A}* n'induisent pas de collapse rapide. Les mutations N382K et C409A abolissent donc la reconnaissance de XopJ6 par le chou-fleur Clovis F1. Également, il semble que comme sur *A. thaliana*, le variant naturel présent dans la souche CN13 (qui cumule les mutations C72G et N382K) échappe à la reconnaissance de l'hôte grâce à la mutation N382K (la mutation C72G n'ayant pas d'effet). L'ensemble de ces résultats indiquent que *A. thaliana* est un bon proxy pour l'étude de l'interaction génétique entre *Xcc* et le chou-fleur Clovis F1. Cependant, alors que PopP2 pouvait compléter le phénotype d'avirulence en l'absence de XopJ6 sur *A. thaliana*, le chou-fleur ne répond pas à la présence de PopP2 (**Figure 5C**). Cette observation pourrait s'avérer importante puisqu'elle souligne une première différence dans les mécanismes de reconnaissance entre les deux hôtes naturels de *Xcc*, *Arabidopsis thaliana* et *Brassica oleracea*.

Par ailleurs, puisque Clovis F1 semble pouvoir détecter la présence de XopJ6 et déclencher une réponse immunitaire forte, les souches portant XopJ6 sont-elles pathogènes sur chou-fleur ? Les résultats préliminaires obtenus lors d'inoculations vasculaires par piqure en veine centrale, montrent que la maladie semble pouvoir se développer avec les souches contenant XopJ6, suggérant ainsi que la présence de XopJ6 et sa détection ne sont pas complètement rédhibitoires pour l'infection du xylème. De plus, l'inoculation des hydathodes par trempage montre que la souche CN06, possédant XopJ6, est capable de se multiplier dans les hydathodes (**Figure 6**). La présence de XopJ6 semble cependant être délétère puisque le

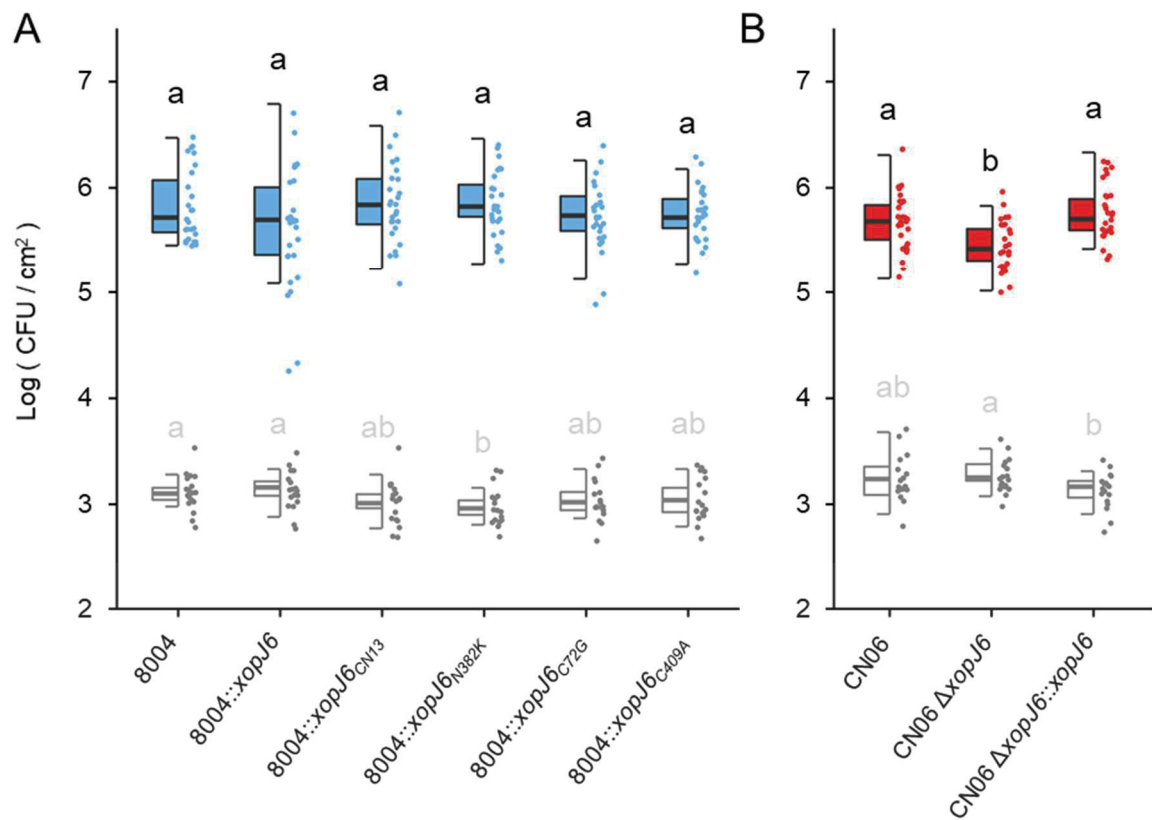


Figure 7 | XopJ6 contribue à la multiplication de *Xcc* dans le mésophylle du chou-fleur. Les populations bactériennes dans le mésophylle foliaire de Clovis F1 ont été dénombrées à 0 dpi (n = 18) puis à 3 dpi (n = 27) après inoculation par infiltration avec un inoculum ajusté à 10⁵ CFU/ml. **A)** La souche sauvage 8004 et les souches complémentées avec les différents variants de XopJ6 ne présentent pas de différence significative après 3 jours de croissance *in planta*. **B)** La fitness de la souche sauvage CN06 est affectée chez le mutant CN06 Δ*xopJ6* et restaurée chez la souche complémentée CN06 Δ*xopJ6*::*xopJ6*. Les lettres représentent les groupes statistiquement différents selon le test de Kruskal-Wallis (p-value < 0.05).

mutant CN06 $\Delta xopJ6$ se multiplie mieux que la souche sauvage CN06. XopJ6 semble donc représenter un coût de fitness pour *Xcc* dans les hydathodes.

Néanmoins, par définition, une réaction de HR, même si elle ne bloque pas complètement l'infection, doit *a minima* limiter la multiplication de l'agent pathogène (Goodman and Novacky, 1994; Balint-Kurti, 2019). Des mesures de croissance bactérienne ont donc été réalisées dans le mésophylle du chou-fleur après inoculation par infiltration. Trois jours après inoculation, aucune différence n'est observable entre la souche 8004 sauvage et celles contenant les variants de XopJ6 (**Figure 7A**). Cependant, la perte de XopJ6 dans la souche CN06 diminue significativement le niveau de multiplication des bactéries (**Figure 7B**). Dans ce cas, on peut donc considérer que XopJ6 est un facteur de virulence de *Xcc*. Il y a donc une contradiction entre le comportement de *Xcc* avec XopJ6 dans le mésophylle et les hydathodes de Clovis F1 : XopJ6 contribue à la fitness de *Xcc* CN06 dans le mésophylle mais est délétère dans les hydathodes.

XopJ6 est-il reconnu lors de l'infection de *Xcc* chez d'autres brassicacées que le chou-fleur Clovis F1 ? Pour le savoir, j'ai inoculé par infiltration (10^8 CFU/ml) les feuilles de *Brassica napus* (colza), *Brassica rapa* R-o-18 (chou chinois dans lequel a été généré une banque de mutants TILLING ; Stephenson *et al.*, 2010), *Brassica oleracea* DH1012 (haploïde doublé, chou modèle pour la transformation génétique de Brassicacées ; Sparrow *et al.*, 2004) et *Brassica oleracea* To1000 (chou kale, haploïde doublé, séquencé ; Parkin *et al.*, 2014). Aucune de ces Brassicacées n'a montré de collapse similaire à celui observé chez *B. oleracea* var. Clovis F1 (**Figure 8**), suggérant que XopJ6 n'est pas reconnu chez ces génotypes.

3.3.4 Discussion & Perspectives

L'identification d'un phénotype de HR lors de l'inoculation de *Xcc* sur le chou-fleur *Brassica oleracea* cv. botrytis var. Clovis F1 laissait entrevoir la découverte d'un premier gène de résistance totale à la pourriture noire sur cet hôte. Malheureusement, au-delà de cette observation, tous les résultats semblent indiquer que la reconnaissance de XopJ6 est

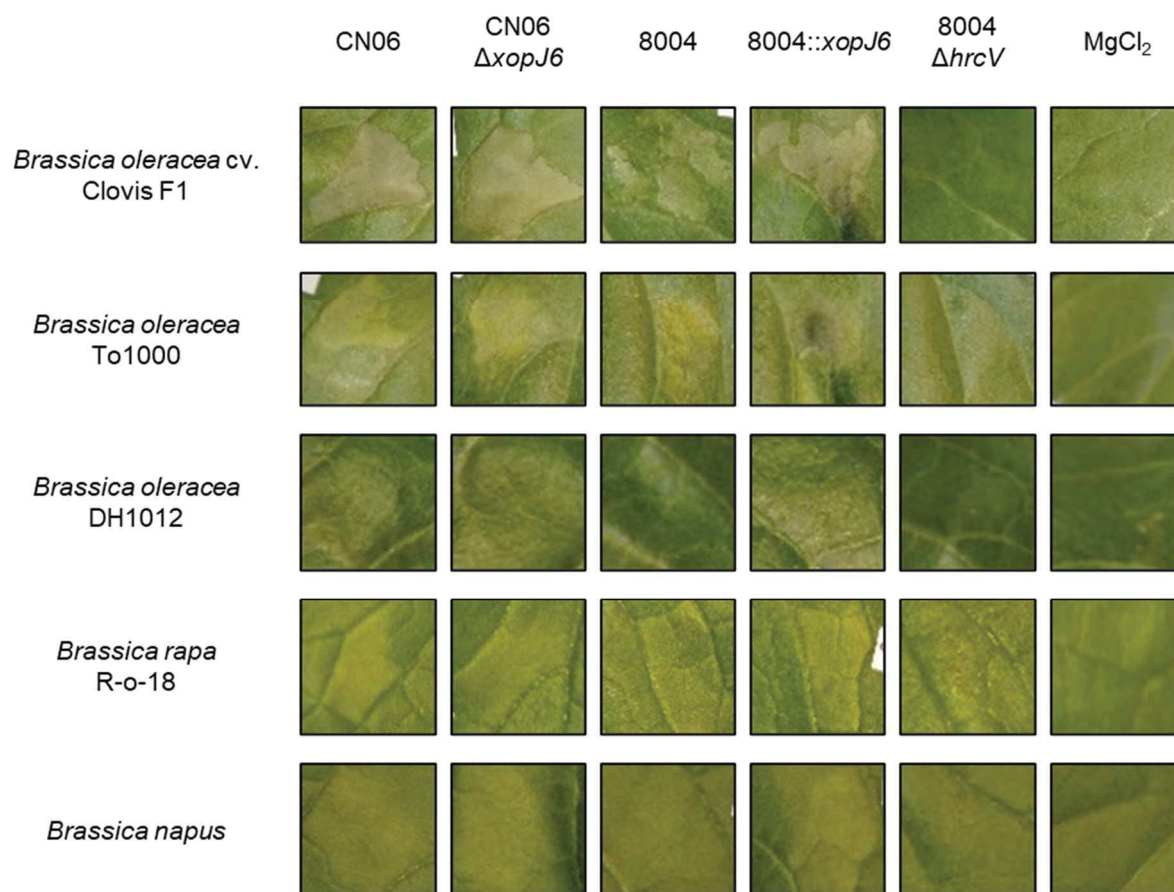


Figure 8 | XopJ6 ne semble pas être reconnu chez les autres Brassicacées d'intérêt testées. Deux jours post-inoculation les symptômes de collapse sec observés chez Clovis F1 ne sont pas visibles chez les autres Brassicacées infiltrées avec un inoculum ajusté à 10⁸ CFU/ml. Il semblerait donc que Clovis F1 soit le seul à pouvoir reconnaître la présence de XopJ6. Résultats représentatifs de deux réplicas biologiques avec 3 échantillons par souche.

compatible avec le développement de la maladie par *Xcc* sur Clovis F1. Cependant, il est intéressant de noter que XopAC, dont les mécanismes de reconnaissance ont été élucidés chez *A. thaliana*, ne se comporte comme un facteur d'avirulence que dans certains tissus. En effet, lorsque *Xcc* est inoculé dans le mésophylle par infiltration à 10^5 CFU/ml, les bactéries sont capables de se multiplier et donner de la maladie, sans regard sur la présence ou l'absence de XopAC (Xu et al., 2008; Guy et al., 2013b). En revanche, l'inoculation du xylème par piqûre en veine centrale ne débouche sur de la maladie qu'en l'absence de XopAC. XopAC est donc considéré comme un facteur d'avirulence, même si les phénotypes associés ne permettent pas tous d'aboutir à cette conclusion. XopJ6 pourrait donc être un facteur d'avirulence dans les hydathodes, où sa présence est délétère, mais ne pas être pour autant un frein au développement de *Xcc* dans le reste de la plante hôte. Cette observation pourrait s'avérer très intéressante puisque les hydathodes sont le point d'entrée naturel de *Xcc* où il serait donc particulièrement pertinent pour la plante de reconnaître la présence du pathogène et développer une réponse immunitaire forte.

Au-delà de ce constat, la reconnaissance de XopJ6 dépend de plusieurs résidus clés, dont le résidu N382 ou le résidu C409 au sein de la triade catalytique. De plus, l'existence d'un variant naturel de XopJ6 dans la souche CN13 est très intrigante. En effet, la substitution N382K rend XopJ6 non-déTECTable par la plante hôte et confère donc un gain de fitness à *Xcc* chez l'écotype d'*A. thaliana* Ws-0, habituellement résistant. Il semblerait donc qu'il y ait un avantage évolutif pour *Xcc* de porter la version allélique *xopJ6*_{CN13} : en contournant les mécanismes de reconnaissance de l'hôte, *Xcc* assure l'infection des hôtes capables de détecter *xopJ6*_{CN06} et exploite une nouvelle niche. Par ailleurs, on observe une exclusion mutuelle parfaite des ET3 XopJ6 et XopAC dans les souches de *Xcc* présentes dans notre collection (**Figure 2**). XopAC est à ce jour le seul ET3 de *Xcc* identifié dans la littérature comme étant un facteur d'avirulence sur *Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2015a). Les résultats obtenus dans l'équipe sur XopJ6 suggèrent que ce serait aussi un facteur d'avirulence lors de l'interaction entre *Xcc* et les écotypes d'*A. thaliana* contenant RRS1-R comme Ws-0. On aurait donc une exclusion mutuelle de deux gènes d'avirulence chez *Xcc*. Il serait alors tentant de proposer qu'il n'existe pas de niche pour une bactérie portant à la fois *xopJ6* et *xopAC* puisqu'elle s'avèrerait avirulente sur tous les hôtes qu'elle rencontre. Cependant, ces observations ne se basent que sur quelques dizaines de souches bactériennes et une gamme

d'hôtes très limitée. Un effort d'échantillonnage massif, des bactéries et de leurs hôtes, serait donc nécessaire pour appuyer cette hypothèse. Il est néanmoins intéressant de noter que *xopJ6* et *xopAC* co-existent chez certaines souches, comme la CN13, mais chez lesquelles soit *xopJ6*, soit *xopAC*, présente au moins une mutation. De plus, des travaux en cours sur l'histoire évolutive de *xopJ6* menés dans l'équipe par Manuel González-Fuente montrent que le gène codant l'effecteur est inclus dans un transposon qui aurait été acquis par transfert horizontal de gène lors de plusieurs événements indépendants. Tous ces éléments soulignent la pression de sélection vraisemblablement importante qui existe sur les gènes d'avirulence chez *Xcc*. L'étude que nous avons menée ici insiste donc sur la capacité importante d'adaptation de *Xanthomonas campestris* qui, à l'échelle d'un gène, présente des stratégies évolutives variées se manifestant par un contenu génétique différent selon les hôtes qu'il infecte.

L'intrigue reste cependant entière vis-à-vis de l'éventuelle résistance du chou-fleur à *Xcc*. Dans la mesure où l'on n'a pas accès à la séquence du génome de Clovis F1, la présence des gènes de résistance RRS1 et RPS4 reste énigmatique. Une recherche par BLAST des séquences de RRS1 et RPS4 chez *Brassica oleracea* To1000, dont la séquence est disponible, a été infructueuse. Par ailleurs, nous avons essayé par une réflexion de génétique mendélienne de tester l'hypothèse selon laquelle la reconnaissance de XopJ6 reposerait sur un seul locus de résistance. Par autofécondation de Clovis F1, le criblage des individus de la génération F2 aurait permis de mesurer la proportion de descendants qui auraient conservé la capacité de reconnaissance de XopJ6. Malheureusement, Clovis F1 est un hybride stérile ne permettant pas l'autofécondation. Cependant, nous avons pu récemment obtenir les parents de Clovis F1 utilisés pour le croisement. Des résultats préliminaires suggèrent que les deux parents reconnaissent activement la présence de XopJ6 (présence de collapse rapide après infiltration). Le croisement de chacun des parents avec le chou *B. oleracea* To1000 (haploïde doublé ; ne fait pas de collapse en présence de XopJ6) est donc envisagé pour essayer de ségréger le gène responsable de la reconnaissance, s'il existe.

Même si la mécanistique de reconnaissance de XopJ6 par le chou-fleur semblait très proche de celle qui a été élucidée chez *Arabidopsis thaliana*, l'absence de reconnaissance de PopP2 laisse tout de même penser qu'il y a des disparités entre ces deux Brassicacées. Il est aussi intéressant de noter que la résistance des plantes à l'infection par un agent pathogène peut être dépendante de la température. Effectivement, une étude récente a montré que les

gènes impliqués dans la résistance à *Ralstonia solanacearum* chez *A. thaliana* étaient différents selon si l'infection avait lieu à 27°C ou 30°C (Aoun et al., 2017). Il se pourrait donc ici que la température utilisée pour les inoculations du chou-fleur ne soit pas adéquate pour l'expression de la résistance due à XopJ6, et qu'elle ne soit donc visible que sous forme de collapse lorsque l'on force le système en inoculant massivement le mésophylle foliaire. Il est donc vraisemblable que nous ayons identifié une source de résistance à la pourriture noire chez *Brassica oleracea* mais son effet sur le développement de la maladie reste limité. A long terme, l'introgession des gènes responsables de la reconnaissance de XopJ6 pourrait toutefois être envisagée pour établir une stratégie de pyramidage des résistances à Xcc chez les Brassicacées.

Chapitre 4

Discussion Générale

Les résultats obtenus pendant ma thèse ont été présentés et discutés dans chacun des chapitres précédents. Dans cette partie, je voudrais donc rappeler les principaux résultats et les replacer dans le contexte global de l'étude pour montrer comment ils apportent des réponses à notre question de départ. Également, je profite de cette partie pour étendre la réflexion aux travaux envisageables pour approfondir les résultats obtenus et répondre aux questions qui en découlent.

4.1 Conclusions générales : ce que nous ont appris ces travaux de thèse

Quels gènes sont impliqués dans l'adaptation de *Xcc* aux différents environnements colonisés au cours du cycle infectieux ? Cette question a été au centre de mes travaux de thèse pendant trois ans. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au comportement de *Xcc* dans les hydathodes, point d'entrée naturel de *Xcc* dans les plantes, lors de la colonisation de son hôte naturel, le chou-fleur. Nous avons approché cette question par l'analyse du profil transcriptomique de *Xcc* 8004 lors de l'infection précoce de l'hydathode, à 4 heures post-inoculation, et plus tardive, 3 jours post-inoculation (**Chapitre 3 - Partie 1**). La comparaison de ces deux étapes de l'infection a montré un remaniement massif des niveaux d'expression de plus de 800 gènes. *Xcc* met donc en place une stratégie adaptative d'envergure lors de l'installation dans les hydathodes (3 dpi) qui contraste avec la réponse au premier contact avec l'hôte (4 hpi). En particulier, les fonctions de mobilité exprimées à 4 hpi sont fortement réprimées 3 jours plus tard. Par ailleurs, le programme infectieux de *Xcc* se traduit par une activation des gènes de virulence et un ajustement du métabolisme. Nous avons ainsi démontré que la quasi-totalité des 95 gènes sous le contrôle du régulateur de réponse HrpG, dont font partie le T3SS et les T3E associés, sont différentiellement exprimés entre 4 hpi et 3 dpi. Plusieurs systèmes moléculaires d'import de nutriments sont également induits pour répondre aux besoins de *Xcc* et permettre sa multiplication dans un milieu vraisemblablement carencé. Par exemple, les transporteurs haute affinité de phosphate (*pstSCAB*) et de soufre (*cysPUWA*), ainsi que les voies d'assimilation de l'azote (*nisADE*) et des sucres (TBDTs), sont induits à 3 dpi. Étonnamment, alors qu'il y a un combat actif entre la plante hôte et l'agent

pathogène, peu de mécanismes de réponse aux stress (oxydatif et osmotique) sont activés à des stades tardifs.

Par la suite, nous avons choisi d'aborder la question de l'adaptation de *Xcc* à son environnement par la mise en place d'un criblage RB-TnSeq (**Chapitre 3 - Partie 2**). Contrairement au RNAseq qui fournit une image à un temps fixé du transcriptome, le RB-TnSeq met en compétition des mutants génétiques et évalue leur fitness tout au long de l'infection d'un environnement. Pour compléter l'étude transcriptomique, nous nous sommes donc d'abord focalisés sur les hydathodes. Nous avons montré que plus de 170 gènes sont requis pour la multiplication de *Xcc* dans cet organe. Les fonctions métaboliques centrales associées à la biosynthèse d'acides aminés, de purines et de cofacteurs sont ressorties comme cruciales. Les mutants affectés dans l'import haute affinité de phosphate ont aussi été impactés, ce qui confirme les résultats de notre approche transcriptomique, et prouve là encore que *Xcc* doit pallier aux faibles concentrations de phosphate disponibles dans les hydathodes. Dans la mesure où *Xcc* est un pathogène vasculaire nous avons également réalisé le criblage RB-TnSeq dans la sève de xylème. La majorité des gènes identifiés comme importants sont communs avec l'environnement « hydathode ». Seule la biosynthèse de proline semble spécifiquement nécessaire dans la sève de xylème. Le phosphate, lui, ne semble cependant pas limitant dans ce milieu. Par ailleurs, la validation expérimentale du gène candidat *XC_3388* a montré qu'il s'agit d'un gène codant pour un régulateur de l'adaptation et du pouvoir pathogène. Une analyse des gènes sous l'influence de *XC_3388* par étude de son profil transcriptomique (RNAseq *in vitro*) est en cours et devrait permettre de préciser son rôle dans la physiologie de *Xcc*. La réalisation du criblage RB-TnSeq dans l'environnement mésophylle, maintenant imminente, permettra d'apporter des éléments supplémentaires concernant les stratégies d'adaptation développées spécifiquement par *Xcc* dans chacun des tissus colonisés au cours du cycle infectieux.

Enfin, nous avons étudié les mécanismes de reconnaissance d'un nouvel ET3, XopJ6, par le chou-fleur (**Chapitre 3 - Partie 3**). Nous avons ainsi pu montrer que le chou est capable de détecter la présence de XopJ6 et que cette détection dépend de plusieurs acides aminés cruciaux. Les inoculations sur le chou-fleur Clovis F1 ont montré que la présence de XopJ6 est délétère pour la multiplication de *Xcc* dans les hydathodes mais nécessaire pour une croissance optimale dans le mésophylle. Malgré la reconnaissance par l'hôte, la présence de

XopJ6 chez *Xcc* n'est pas complètement rédhibitoire pour la maladie. XopJ6 n'est donc pas réellement un gène d'avirulence sur le chou-fleur Clovis F1 et ne semble donc pas représenter, contrairement à notre hypothèse de départ, une source majeure de résistance pour cette variété de Brassicacées. Toutefois, l'introggression dans des variétés commerciales d'une résistance quantitative peut être bénéfique. Le pyramidage de plusieurs résistances est une stratégie actuellement employée pour limiter l'impact des agents pathogènes et ralentir le contournement de résistances. Dans le cas de XopJ6, la résistance observée se développe tôt dans le processus infectieux, lors de l'entrée dans la plante via les hydathodes : elle pourrait donc malgré tout s'avérer intéressante pour restreindre la multiplication du pathogène et ainsi limiter sa propagation systémique dans la plante et sa propagation entre plantes au sein du champ.

L'ensemble de ces travaux de thèse s'incluent dans un effort de groupe et apporte des éléments de réponse aux questions entourant l'adaptation de *Xcc* au cours du cycle infectieux. Au bilan, nous avons pu montrer que *Xcc* s'adapte à son environnement aussi bien à l'échelle de la population, que de l'individu ou même du gène. Nous avons identifié les bases génétiques qui sous-tendent les stratégies adaptatives de *Xcc* dans 2 des 3 principaux tissus infectés chez la plante hôte : les hydathodes et le xylème. L'étude du mésophylle reste à ce jour inachevée. Notre utilisation de la génomique fonctionnelle nous a ainsi permis d'apporter des réponses sur l'écologie de *Xanthomonas campestris* et d'ouvrir des pistes pour améliorer notre compréhension des interactions hôtes-pathogènes. A terme, mieux comprendre ces interactions permettra de développer de nouvelles solutions pour la lutte contre la nervation noire des Brassicacées.

4.2 Perspectives : maintenant quoi ?

4.2.1 La banque RB-TnSeq : un outil précieux pour comprendre l'écologie de *Xcc*

L'utilisation d'outils de criblage haut-débit et la réalisation d'analyses fonctionnelles à l'échelle du génome restent encore très rares chez les bactéries associées aux plantes. En particulier, les études du comportement des bactéries *in planta*, comme lors de l'infection par *Xanthomonas*, présentent encore aujourd'hui des contraintes techniques et biologiques qui les

rendent difficiles à mettre en œuvre. Cependant, l'arrivée du TnSeq a révolutionné les approches fonctionnelles en permettant de déterminer l'importance de chaque gène pour la fitness bactérienne en une seule expérience. A ce jour, seulement cinq études se sont intéressées aux déterminants de la fitness chez des bactéries phytopathogènes par des approches TnSeq : Duong *et al.* (2018) chez *Pantoea stewartii* sur le maïs, Royet *et al.* (2019) chez *Dickeya dadantii* sur l'endive, Gonzalez-Mula *et al.* (2019) chez *Agrobacterium tumefaciens* sur la tomate et Helmann *et al.* (2019 ; 2020) chez *Pseudomonas syringae* sur le haricot et le poivron. Le travail présenté ici est donc le premier chez le large groupe des *Xanthomonas* et également le premier sur les Brassicacées. Parmi ces études, seule celle de Helmann *et al.* (2019) et la nôtre ont étudié le comportement bactérien dans plusieurs environnements chez la plante hôte. Néanmoins, même si nous avons obtenu des données dans les hydathodes et la sève de xylème, des travaux complémentaires pourront être réalisés dans d'autres conditions, en plus du mésophylle. En effet, pour entièrement couvrir les environnements colonisés par *Xcc* lors du cycle infectieux, il faudrait aussi s'intéresser à la phase épiphyte, avant l'entrée dans les hydathodes, et à la transmission du xylème à la graine. Initialement incluse dans le projet de thèse, l'étude de la phase épiphyte a été écartée par manque de temps, mais reste l'une des priorités de l'équipe. Il serait effectivement crucial de savoir quels gènes permettent à *Xcc* de survivre et de se multiplier à la surface des feuilles. Il est très probable que les facteurs contribuant à la fitness de *Xcc* dans la phyllosphère facilitent également la colonisation de l'organe foliaire, l'entrée dans les hydathodes et donc le déclenchement du cycle infectieux. Les étapes tardives de l'infection systémique de l'hôte et la transmission à la graine sont tout aussi importantes puisque *Xcc* est principalement disséminée par voie verticale, d'une plante infectée à sa descendance. Cependant l'étude du passage du xylème à la graine est techniquement très difficile. En effet, au même titre que pour l'étude de l'environnement « xylème » *in planta*, il faudrait pouvoir s'affranchir du goulot d'étranglement massif lors de l'inoculation. Au-delà de l'inoculation, le passage du xylème à la graine constitue vraisemblablement un second goulot d'étranglement très fort. En y ajoutant le fait que le chou-fleur met plusieurs mois pour produire des fleurs puis des graines, cette expérience s'annonce extrêmement difficile.

Dans un premier temps, se concentrer sur l'étude du xylème *in planta* pourrait déjà être très intéressant. Les résultats viendraient compléter les données obtenues en sève de xylème

in vitro et aideraient ainsi à déterminer la part de l'hôte, aussi bien du point de vue de la structuration du milieu que des réponses immunitaires, dans l'adaptation de *Xcc* à l'environnement vasculaire. A terme, l'idéal serait de pouvoir réaliser le criblage RB-TnSeq, non pas dans chacun des environnements colonisés indépendamment, mais sur un cycle infectieux complet. En effet, après inoculation des hydathodes, les mutants enrichis dans le mésophylle seraient les plus à même de constituer une source d'inoculum secondaire et les mutants enrichis dans la vasculature de la tige seraient les plus à même d'être transmis verticalement par la graine. Cette expérience présenterait donc un intérêt majeur pour l'étude de l'écologie de *Xcc* au cours du cycle infectieux, mais également pour replacer notre recherche dans un contexte plus large de dynamique épidémique. Malheureusement, le frein majeur reste la présence de goulot d'étranglement au cours de la colonisation de la plante hôte, ce qui nous forcerait à multiplier massivement le nombre de plantes inoculées pour distinguer l'effet « gène muté » de l'effet « enrichissement stochastique ». Il apparaît très clairement que la question des goulots d'étranglement est limitante pour ces approches de TnSeq. Toutefois, il serait envisageable de retourner la situation et d'utiliser la banque RB-TnSeq pour évaluer l'importance des goulots d'étranglement dans le cadre de l'infection. Il s'agit ici d'utiliser la banque en tant qu'outil « code-barre » plus que pour l'analyse des mutations. L'idée serait ainsi de compter le nombre de codes-barres avant et après un goulot d'étranglement pour estimer le nombre de bactéries capables de traverser le point critique. Le premier goulot d'étranglement potentiellement rencontré au cours de l'infection est l'entrée dans les pores de l'hydathode. Nous avons déjà estimé ce goulot et déterminé qu'environ 1 000 bactéries étaient capables de rentrer simultanément dans chaque pore (soit ~ 35 000 par hydathode). Biologiquement, ce chiffre signifie qu'il n'y a pas de réelle sélection lors de l'entrée dans les hydathodes, puisqu'il paraît improbable qu'autant de bactéries soient présentes en même temps à cet endroit. En revanche, plus tard dans l'infection, la vascularisation de *Xcc* à partir des hydathodes semble être un vrai goulot d'étranglement. Effectivement, 6 jours post-inoculation *Xcc* peut atteindre une densité de l'ordre de 1 000 000 d'individus par hydathodes. Dans la mesure où la transition des hydathodes nécrosées vers le réseau du xylème dépend de la dégradation de leur paroi (Gluck-Thaler et al., 2020), les individus les plus proches des vaisseaux seraient favorisés. Les vaisseaux du xylème étant essentiellement des tuyaux sans accès latéraux, on peut faire l'hypothèse que les premières bactéries à accéder au xylème seront

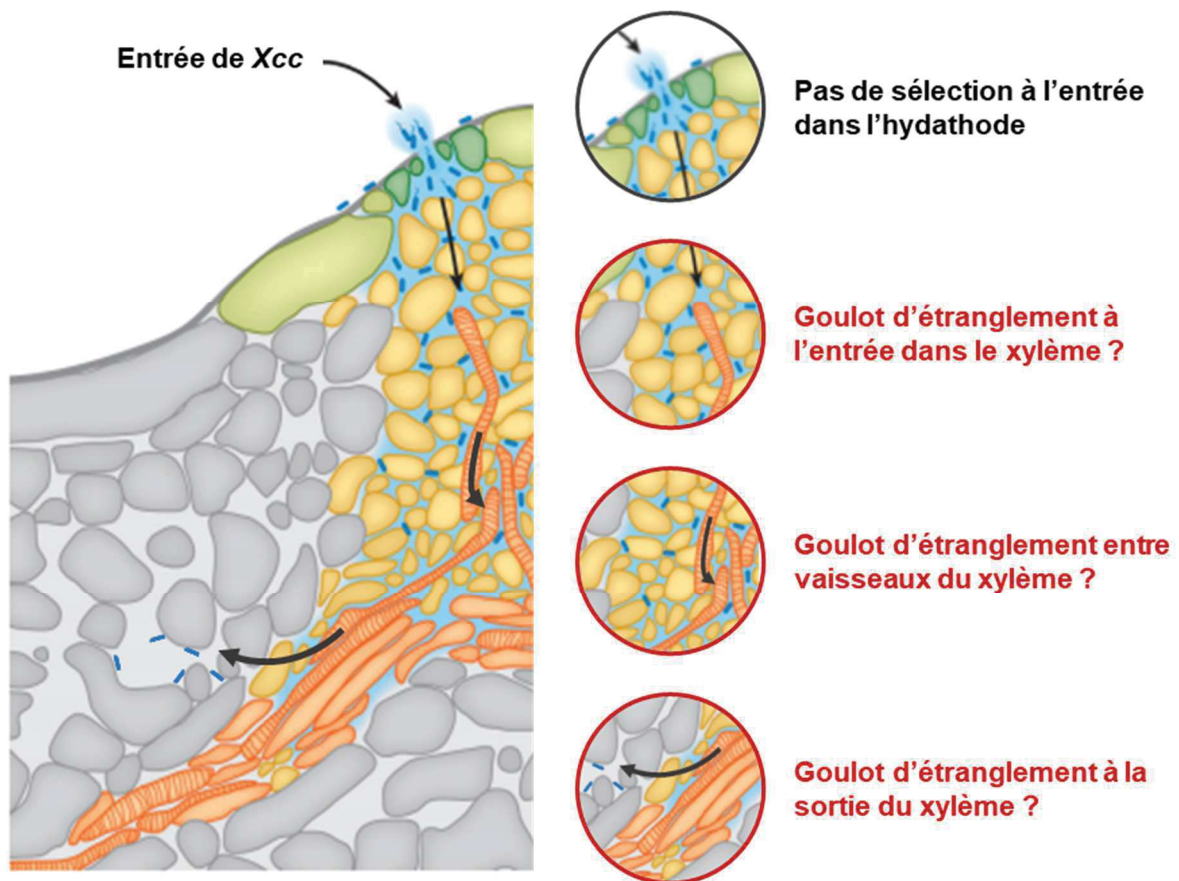


Figure 1 | Goulots d'étranglement potentiellement rencontrés par Xcc lors de la colonisation du xylème. L'entrée de Xcc dans les hydathodes au niveau des pores n'impose pas de sélection sur le nombre d'individus fondateurs. Les étapes de vascularisation, de propagation entre vaisseaux du xylème et de sortie des vaisseaux sont des sites putatifs de goulot d'étranglement. Figure adaptée de Cerutti et *al.*, 2019.

celles qui vont coloniser cette nouvelle niche et devenir considérablement plus abondantes. Cette sélection *a priori* stochastique des individus pourrait se produire tout au long de la colonisation de l'hôte, par exemple lors du passage d'un vaisseau du xylème à un autre, lors du passage du pétiole à la tige ou encore lors de l'évasion du xylème vers le mésophylle (**Figure 1**). On pourrait alors de la même manière évaluer le goulot d'étranglement lors du passage du xylème à la graine.

4.2.2 Combiner RNAseq et TnSeq pour produire une image haute définition de la physiologie de *Xcc* lors de l'infection

De la même manière que pour l'étude de l'adaptation de *Xcc* dans les hydathodes, il sera intéressant de générer des données transcriptomiques par RNAseq dans chacun des environnements *in planta* étudiés en RB-TnSeq. Ces expériences ne demandent pas de mises au point supplémentaires et pourraient être réalisées à court terme. A plus long terme, il me paraîtrait pertinent d'adopter une approche *single-cell* pour approfondir notre connaissance du fonctionnement des populations bactériennes pendant l'infection. Le *single-cell RNAseq*, ou scRNAseq, est une méthode qui consiste à analyser le transcriptome de cellules uniques à haut-débit et permet ainsi d'identifier des sous-populations aux comportements différents, autrement indiscernables en RNAseq classique (Blattman et al., 2020; Imdahl et al., 2020). Le développement de cette approche irait dans la continuité des résultats obtenus au cours de ma thèse qui montrent la présence de tricheurs dans la population de *Xcc* au cours de l'infection de l'hydathode. Nos résultats préliminaires semblent montrer que la stratégie de « division du travail » existe pour l'expression du T3SS chez *Xcc* mais il est très probable que d'autres fonctions biologiques soient également impactées. Une approche scRNAseq permettrait alors d'identifier ces fonctions et de comprendre les mécanismes de régulation et d'optimisation de la fitness chez *Xcc*.

Par ailleurs, il est évident que mes travaux de thèse ne se sont focalisés que sur un seul côté de l'interaction *Xcc* / chou-fleur. L'objectif de la thèse étant d'identifier les bases génétiques de l'adaptation de *Xcc* lors du cycle infectieux, la physiologie de l'hôte et ses réponses à l'infection n'ont pas été étudiées. Il s'agit néanmoins d'un aspect important pour (i)

comprendre pourquoi l'hôte constitue une niche intéressante pour *Xcc*, (ii) comprendre comment il lutte contre l'infection et (iii) déterminer des pistes concrètes pour limiter l'impact de la maladie. Plusieurs autres membres de l'équipe, dont Caroline Bellenot et Jean-Marc Routaboul, se concentrent actuellement sur ces questions. A ce titre, ils ont récemment obtenu le profil transcriptomique des hydathodes du chou-fleur lors de l'infection par *Xcc* 8004. Les données générées vont donc être confrontées à nos données bactériennes pour dégager une vision intégrative de l'infection des Brassicacées par *Xcc*.

4.2.3 Quelques candidats à approfondir...

L'un des intérêts majeurs du RB-TnSeq réside dans la capacité à évaluer l'importance des gènes pour la fitness bactérienne sans *a priori* sur leur fonction. Parmi les 13 gènes identifiés dans les hydathodes du fait du gain de fitness des mutants associés, 10 étaient des régulateurs majeurs de l'adaptation et la virulence de *Xcc*. Les 3 gènes restants (*XC_0522*, *XC_RS10905* et *XC_3388*) étaient décrits assez vaguement comme des régulateurs transcriptionnels ou des protéines hypothétiques. Dans la mesure où les mutants de ces trois gènes ont présenté le même phénotype que les régulateurs pré-identifiés chez *Xcc*, j'ai fait l'hypothèse que ces 3 gènes pouvaient également coder des régulateurs de l'adaptation et de la virulence. De plus, puisque les mutants de régulateurs connus présentent un défaut de fitness lorsqu'ils sont inoculés seuls, nous avons fait l'hypothèse que nos 3 candidats se comportent comme des tricheurs, profitant de l'expression des facteurs de virulence par le reste de la population sans en payer le coût de production. Dans la mesure où ce comportement de tricheur a déjà été identifié pour l'expression du T3SS chez d'autres bactéries, y compris le phytopathogène *Pseudomonas syringae* (Rufian et al., 2016 ; 2018), j'ai voulu m'y intéresser lors de l'infection des hydathodes par *Xcc*. L'idée était donc de faire la preuve de concept avec le mutant $\Delta hrpX$ et d'étendre le travail aux autres gènes non-caractérisés mais qui présentent ce phénotype atypique de gain de fitness dans notre expérience de TnSeq. Alors que le gène *XC_3388* a déjà été décrit en détail (cf. **Chapitre 3 – Partie 2**), les deux autres sont pour l'instant restés en attente. J'ai d'ores et déjà construit les mutants de délétion des gènes *XC_0522* et *XC_RS10905* et leur validation expérimentale a été débutée. Les résultats préliminaires semblent indiquer que ces gènes ne sont pas importants pour l'apparition des

symptômes de la maladie. La capacité de ces mutants à se multiplier dans les hydathodes et leur comportement de tricheur en présence de la souche sauvage n'ont cependant pour l'instant pas encore été évalués. Dans un second temps, si leur phénotype de tricheur est effectivement confirmé, le même travail d'analyse du transcriptome *in vitro* fait pour le mutant ΔXC_3388 sera réalisé et conduira certainement à préciser le rôle de chacun de ces gènes dans la réponse adaptative de *Xcc* durant l'infection. De manière plus générale, nos résultats de RB-TnSeq ont généré une liste de gènes sans fonction connue et pour lesquels on sait maintenant qu'ils sont importants pour la fitness de *Xcc* dans les conditions étudiées. Ces gènes pourraient ainsi se révéler être des candidats intéressants à approfondir, notamment à la lumière de futurs résultats.

L'ensemble de ces travaux entre également dans un effort d'équipe consistant à valoriser les données expérimentales pour dégager une vision intégrative et holistique de l'interaction *Xcc* / Brassicacées. Le développement d'une base de connaissance a ainsi été récemment amorcé pour regrouper les données de génomique fonctionnelle (aussi bien chez l'hôte que chez le pathogène), les résultats expérimentaux de validation sur des voies ciblées et les données disponibles dans la littérature. A terme, l'idée est donc de disposer d'une ressource publique permettant de rapidement naviguer parmi les phénotypes associés à chaque gène dont le comportement et / ou la fonction ont été étudiés.

Chapitre 5

Matériels &
Méthodes

La majorité des matériels et méthodes utilisés au cours de ma thèse ont été décrits dans les chapitres de résultats correspondants (cf. **Chapitre 3 - Parties 1 & 2**). Ici je ne détaillerai donc que les matériels et méthodes non décrits précédemment, en particulier ceux utilisés pour la **Partie 3** du **Chapitre 3**.

5.1 Matériels biologiques

5.1.1 Les plantes

La plante modèle pour l'intégralité de mon travail de thèse est le chou-fleur *Brassica oleracea* var *botrytis* cv. Clovis F1. Ce choix est basé sur plusieurs critères : (i) notre souche de référence Xcc 8004 a été isolée sur chou-fleur, (ii) Clovis F1 est une variété commerciale (donc d'intérêt agronomique) qui est (iii) très sensible à la nervation noire (il est plus facile d'évaluer des différences de pouvoir pathogène lorsque la gamme de symptômes observables est large) et iv) les hydathodes sont visibles à l'œil nu, ce qui favorise le travail d'échantillonnage. Les choux sont cultivés pendant 4 semaines en serre. Après inoculation, les plantes sont placées en chambre de culture en conditions contrôlées : 22°C ; 70% d'humidité relative ; 9h de photopériode.

5.1.2 Les bactéries

5.1.2.1 Souches bactériennes & Milieux de culture

La souche de référence utilisée comme modèle pendant ma thèse est la souche Xcc 8004 (Daniels et al., 1984). Il s'agit d'un mutant spontané résistant à la rifampicine dérivé de la souche Xcc NCPPB No. 1145 qui a été isolée sur chou-fleur en 1958 dans la région de Sussex en Angleterre, et dont le génome a été séquencé en 2005 (Qian et al., 2005). Dans le cadre de l'étude de l'effecteur XopJ6 (cf. **Chapitre 3 – Partie 3**), plusieurs autres souches de Xcc ont été utilisées dont la souche chinoise CN06 également séquencée (He et al., 2007). Les souches de Xcc ont toutes été cultivées sur milieu riche MOKA-agar ou MOKA liquide (4 g.l⁻¹ extrait de

levure, 8 g.l⁻¹ acides casaminés, MgSO₄ 1 mM et 2 g.l⁻¹ K₂HPO₄ ; Blanvillain *et al.*, 2007) à 28°C sous agitation à 200 rpm. Les souches d'*Escherichia coli* TG1 et pRK2073 ont été cultivées sur milieu LB-agar ou LB liquide at 37°C sous agitation. Si nécessaire, les milieux ont été rendus sélectifs par l'ajout des antibiotiques rifampicine (50 µg.ml⁻¹), kanamycine (50 µg.ml⁻¹), spectinomycine (40 µg.ml⁻¹) et du fongicide pimarinine (30 µg.ml⁻¹).

5.1.2.2 Clonages & Conjugaison

Les constructions des plasmides de délétion et de complémentation génomique ont été effectués par assemblage de Gibson avec les amorces et les protocoles décrits dans la partie résultats (Gibson *et al.*, 2009). Les constructions gènes rapporteurs développés pour étudier l'hétérogénéité phénotypique ont également été effectuées par assemblage de Gibson. Dans un premier temps, le plasmide pJL_mCherry a été assemblé par insertion de la cassette mCherry-T7, issue du pRCG_Pps-mCherry (Marchetti *et al.*, 2017), dans le plasmide d'insertion génomique sans promoteur pCZ1013. L'ajout d'un site de restriction NdeI en amont du gène mCherry a permis l'insertion des différents promoteurs P_{tac} (constitutif), P_{hrpX} (promoteur natif de hrpX) et P_{hrpC} (promoteur natif de l'opéron *hrpC* du cluster *hrp*). Les amorces utilisées et les plasmides construits sont listés dans les **Annexes 1 & 2**. L'insertion des constructions gènes rapporteurs a été classiquement réalisée par conjugaison tri-parentale puis double recombinaison par la méthode SacB (cf. **Chapitre 3 – Partie 1**, section Methods).

5.2 Test de HR

Les tests de HR sur chou-fleur ont été réalisés par infiltration d'une suspension bactérienne concentrée dans le mésophylle foliaire. 2 ml de cultures de nuit sont lavés dans du MgCl₂ 1 mM et ajustés à OD₆₀₀ = 0.1 (10⁸ cfu/ml). L'infiltration est réalisée sur la face inférieure des feuilles à l'aide d'une seringue sans aiguille et les plantes sont placées en chambres de culture. Après 24h et 48h d'infection, l'apparition de collapse foliaire est évaluée.

5.3 Test de croissance *in planta*

Afin d'évaluer la fitness des souches de *Xcc* lors de la colonisation du mésophylle foliaire, des tests de croissance ont été réalisés *in planta*. Les cultures de nuit sont lavées puis ajustées à $OD_{600} = 0.0001$ (10^5 cfu/ml) dans du $MgCl_2$ 1mM. Les suspensions bactériennes sont infiltrées dans le mésophylle à l'aide d'une seringue sans aiguille et les zones inoculées sont entourées. Après assèchement de la zone inoculée (T_0) et après 3 jours d'incubation en chambre de culture (3 dpi), les tissus infectés sont prélevés grâce à un emporte-pièce de Ø 6 mm (Harris, Uni-Core, Electron Microscopy Sciences) et broyés dans 200 µl de $MgCl_2$ 1mM (broyeur à billes Retsch MM400). Après dilutions en cascade, 5 µl d'échantillons sont déposés sur boîtes MOKA-rif-pim en triplicats puis incubés 48h à 28°C. La moyenne du nombre de colonies pour chaque triplicat permet d'évaluer le niveau de multiplication des bactéries dans le mésophylle.

5.4 Tests de compétition

Les tests de compétition permettent d'évaluer la fitness relative de deux souches en les co-inoculant ensembles et en suivant leur croissance. La mise en place de ces tests est extensivement détaillée dans le *Bio-protocol* présenté dans le **Chapitre 3 Partie 2.4** pour la colonisation du mésophylle. Le même principe s'applique pour l'étude d'autres compartiments comme les hydathodes. L'inoculation se fait alors par trempage de la feuille dans une suspension bactérienne comme expliqué précédemment (cf. **Chapitre 3 – Partie 2**, section Methods).

Annexes

Annexe 1 | Liste des souches et plasmides construits pour l'étude du coût de virulence et de l'hétérogénéité phénotypique chez *Xcc*

Souche ou Plasmide	Description	Référence or source
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
8004::GUS-GFP	Wild-type; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cerutti et al., 2017
8004::GUS-GFP $\Delta hrcV$	Mutant de délétion de <i>hrcV</i> (<i>XC_3013</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cerutti et al., 2017
8004::GUS-GFP $\Delta hrcV::hrcV$	Mutant $\Delta hrcV$ complémenté (<i>XC_3013</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP $\Delta hrpX$	Mutant de délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP $\Delta hrpX::hrpX$	Mutant $\Delta hrpX$ complémenté (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP $\Delta hrpG$	Mutant de délétion de <i>hrpG</i> (<i>XC_3077</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Luneau et al., <i>in prep</i>
8004::GUS-GFP $\Delta hrpG::hrpG$	Mutant $\Delta hrpG$ complémenté (<i>XC_3077</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Luneau et al., <i>in prep</i>
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> *	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Luneau et al., <i>in prep</i>
8004::GUS-GFP $\Delta HRP_cluster$	Mutant de délétion du cluster <i>hrp</i> (<i>XC_3001</i> – <i>XC_3025</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP $\Delta hpaR$	Mutant de délétion de <i>hpaR</i> (<i>XC_2827</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> * $\Delta hrcV$	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; mutant de délétion de <i>hrcV</i> (<i>XC_3013</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> * $\Delta hrpX$	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; mutant de délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> * $\Delta HRP_cluster$	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; mutant de délétion du cluster <i>hrp</i> (<i>XC_3001</i> – <i>XC_3025</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> * $\Delta hpaR$	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; mutant de délétion de <i>hpaR</i> (<i>XC_2827</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP P0::mCherry	Wild-type; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sans promoteur; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP Ptac::mCherry	Wild-type; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sous promoteur constitutif Ptac; Rif ^R	Cette étude

8004::GUS-GFP PhrpC::mCherry	Wild-type; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sous promoteur natif de <i>hrpC</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP Δ <i>hrpX</i> P0::mCherry	Mutant de délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sans promoteur; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP Δ <i>hrpX</i> Ptac::mCherry	Mutant de délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sous promoteur constitutif Ptac; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP Δ <i>hrpX</i> PhrpC::mCherry	Mutant de délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sous promoteur natif de <i>hrpC</i> ; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP <i>hrpG</i> * Ptac::mCherry	Mutant ponctuel <i>hrpG</i> *; expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sous promoteur constitutif Ptac; Rif ^R	Cette étude
8004::GUS-GFP Δ <i>hrpG</i> P0::mCherry	Mutant de délétion de <i>hrpG</i> (<i>XC_3077</i>); expression constitutive <i>GUS</i> et <i>GFP</i> ; cassette mCherry sans promoteur; Rif ^R	Cette étude
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rk⁻ mk⁻) [F' traD36 proAB lacI^q ΔM15]</i>	Stratagene
Plasmids		
pRK2073	Plasmide Helper pour conjugaison triparentale; Spec ^R ; Strep ^R	Figurski & Helinski, 1979
pK18mobSacB	Vecteur suicide pour l'édition du génome chez <i>Xcc</i> ; Kan ^R	Schäffer et al., 1994
p Δ 13	Dérivé du pK18mobsacB compatible GoldenGate; Kan ^R	Guy et al., 2013
pK18_compR3	Dérivé du pK18mobsacB pour complémentation génomique; Kan ^R	Luneau et al., <i>in prep</i>
p Δ 13- <i>hrpX</i>	Dérivé du p Δ 13 pour la délétion de <i>hrpX</i> (<i>XC_3076</i>); Kan ^R	Lauber et al., <i>in prep</i>
pK18_Comp_XC3076	Dérivé du pK18_compR3 pour la complémentation de <i>hrpX</i> ; Kan ^R	Cette étude
p Δ 13- <i>hrpG</i> *	Dérivé du pK18mobSacB pour la substitution de <i>hrpG</i> (<i>XC_3077</i>) par <i>hrpG</i> * (<i>XC_3077_{E44K}</i>); Kan ^R	Guy et al., 2013
p Δ 13- <i>hrcV</i>	Dérivé du pK18mobSacB pour la délétion de <i>hrcV</i> (<i>XC_3013</i>); Kan ^R	Cerutti et al., 2017
pK18_Comp_XC3013	Dérivé du pK18_compR3 pour la complémentation de <i>hrcV</i> (<i>XC_3013</i>); Kan ^R	Cette étude
pK18_HRPcluster_AmAv	Dérivé du pK18mobSacB contenant la région amont de <i>XC_3001</i> et la région aval de <i>XC_3025</i> pour la délétion du cluster <i>hrp</i> ; Kan ^R	Cette étude
pK18_XC2827AmAv	Dérivé du pK18mobSacB contenant les régions amont et aval de <i>XC_2827</i> pour la délétion; Kan ^R	Cette étude

pK18-GUS-GFP	Insertion génomique de la cassette Ptac ::GUS-GFP ; Kan ^R	Cerutti et al., 2017
pCZ1013	Dérivé du pK18mobSacB pour intégration génomique entre <i>XC_3385</i> and <i>XC_3386</i> d'un gène sous contrôle du promoteur Ptac; Kan ^R	Lauber et al., <i>in prep</i>
pJLmCherry_0	Dérivé du pCZ1013 pour insertion génomique de la construction gène rapporteur mCherry sans promoteur; Kan ^R	Cette étude
pJLmCherry_Ptac	Dérivé du pJLmCherry_0 avec promoteur Ptac pour expression constitutive de la mCherry; Kan ^R	Cette étude
pJLmCherry_PhrpX	Dérivé du pJLmCherry_0 avec promoteur PhrpX pour expression inductible de la mCherry; Kan ^R	Cette étude
pJLmCherry_PhrpC	Dérivé du pJLmCherry_0 avec promoteur PhrpC pour expression inductible de la mCherry; Kan ^R	Cette étude

Annexe 2 | Liste des oligos utilisés pour l'étude de l'hétérogénéité phénotypique chez *Xcc*

Nom de l'oligo	Direction	Locus	Séquence (5'-3')
Délétion			
pK18_HRP_Am	Fwd	<i>hrp cluster</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCTTG CTCGAATTGTTCTGGGGTC
pK18_HRP_Av	Rev	<i>hrp cluster</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTGCTG AACTCGCCTTTCACCAAAGG
HRP_AmAv	Fwd	<i>hrp cluster</i>	GTACCGGGAGTGGAACATTAGAGCCACT GTTGCGACCGCAGTGG
HRP_AvAm	Rev	<i>hrp cluster</i>	CCACTGCGGTGCGAACAGTGGCTCTAATG TTGCCACTCCCGGTAC
pK18_XC_2827Am	Fwd	<i>hpaR</i>	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAACC GCTGGTGGCGCGCTTCGTC
pK18_XC_2827Av	Rev	<i>hpaR</i>	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTCGG AAGTGCTGGATGCCAACACGC
XC_2827AmAv	Fwd	<i>hpaR</i>	CTTTGATCCAACCGCTAAACGCGTCGCAG TCGAACAGTAATCGCTGCTTG
XC_2827AvAm	Rev	<i>hpaR</i>	CAAGCAGCGATTACTGTTCTGACTGCGACG CGTTTAGCGGTTGGATCAAAG
Insertion			
pK18_CompR3_XC3013_Fwd	Fwd	<i>hrcV</i>	CGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTCGAC AACGATGAAGGCAGCGGTCC
pK18_CompR3_XC3013_Rev	Rev	<i>hrcV</i>	GTTTAAACCGCATGCATCGCAAGCTTCAG GCCACCACTCTGCCGATCG
pK18_CompR3_XC3076_Fwd	Fwd	<i>hrpX</i>	CGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTCAAT CGTTTGCGCCCAACACAACG

pK18_CompR3_XC3076_Rev	Rev	<i>hrpX</i>	GTTTAAACCGCATGCATCGCAAGCTTTAG CGTTGCAGGGTTTCCATCG
pCZ1013_mCherryT7_NdeI_Fwd	Fwd	<i>mCherry</i>	GGATCCTCTAGAGTCGACATATGGTTTCC AAGGGCGAGGAGG
pCZ1013_mCherryT7_Rev	Rev	<i>mCherry</i>	CCAGCATGCCTGCAGGTCGACAAAAAACC CCTCAAGACCCGTT
pJLmCherry_0_Ptac_Fwd	Fwd	Ptac promoter	GGATCCTCTAGAGTCGACATAGAGCTGTT GACAATTAATCATCG
pJLmCherry_0_Ptac_Rev	Rev	Ptac promoter	CCTCCTCGCCCTTGGAACCATAGTGGCT GTTTCCTGTGTGAAATTG
pJLmCherry_PhrpX_Fwd	Fwd	PhrpX promoter	GGATCCTCTAGAGTCGACATATTGAGCGC GAGCGATCGCAGATG
pJLmCherry_PhrpX_Rev	Rev	PhrpX promoter	CCTCCTCGCCCTTGGAACCATAGCCGGG CTCTCTGAAGG
pJLmCherry_PhrpC_Fwd	Fwd	PhrpC promoter	GGATCCTCTAGAGTCGACATACAAACACG TCGTGCTTCGTACACC
pJLmCherry_PhrpC_Rev	Rev	PhrpC promoter	CCTCCTCGCCCTTGGAACCATAGGCGAT CTCCGGCCGCTATTGCTGC

Bibliographie

- Ackermann M** (2015) A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **13**: 497–508
- Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T** (2006) Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* **22**: 1600–1607
- Alkhateeb RS, Vorhölter F-J, Rückert C, Mentz A, Wibberg D, Hublik G, Niehaus K, Pühler A** (2016) Genome wide transcription start sites analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 with insights into the gum gene cluster directing the biosynthesis of the exopolysaccharide xanthan. *Journal of Biotechnology* **225**: 18–28
- An S-Q, Allan JH, McCarthy Y, Febrer M, Dow JM, Ryan RP** (2014) The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* **92**: 586–597
- An S-Q, Potnis N, Dow M, Vorhölter F-J, He Y-Q, Becker A, Teper D, Li Y, Wang N, Bleris L, et al** (2019) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* fuz024
- Aoun N, Tauleigne L, Lonjon F, Deslandes L, Vailleau F, Roux F, Berthomé R** (2017) Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2017.01387
- Arlat M, Gough C, Barber CE, Boucher C, Daniels M** (1991) *Xanthomonas campestris* Contains a Cluster of *hrp* Genes Related to the Larger *hrp* Cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**: 593
- Arroyo-Velez N, Gonzalez-Fuente M, Peeters N, Lauber E, Noel LD** (in press) From effectors to effectomes: Are functional studies of individual effectors enough to decipher plant pathogen infectious strategies? *PLOS Pathogens* in press:
- Aslam SN, Newman M-A, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, et al** (2008) Bacterial Polysaccharides Suppress Induced Innate Immunity by Calcium Chelation. *Current Biology* **18**: 1078–1083
- Balint-Kurti P** (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1163–1178
- Benjamini Y, Yekutieli D** (2001) The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics* **29**: 1165–1188
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M** (2007) Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLOS ONE* **2**: e224

- Blattman SB, Jiang W, Oikonomou P, Tavazoie S** (2020) Prokaryotic single-cell RNA sequencing by in situ combinatorial indexing. *Nature Microbiology* 1–10
- Boulanger A, Déjean G, Lautier M, Glories M, Zischek C, Arlat M, Lauber E** (2010) Identification and Regulation of the N-Acetylglucosamine Utilization Pathway of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **192**: 1487–1497
- Boulanger A, Zischek C, Lautier M, Jamet S, Rival P, Carrère S, Arlat M, Lauber E** (2014) The Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Exploits N-Acetylglucosamine during Infection. *mBio* **5**: e01527-14
- Bradbury JF** (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. Guide to plant pathogenic bacteria.
- Brodersen CR, Roddy AB, Wason JW, McElrone AJ** (2019) Functional Status of Xylem Through Time. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 407–433
- Brown CK, Vetting MW, Earhart CA, Ohlendorf DH** (2004) Biophysical Analyses of Designed and Selected Mutants of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase. *Annual Review of Microbiology* **58**: 555–585
- Büttner D, Bonas U** (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107–133
- Cain AK, Barquist L, Goodman AL, Paulsen IT, Parkhill J, van Opijnen T** (2020) A decade of advances in transposon-insertion sequencing. *Nature Reviews Genetics* 1–15
- Castiblanco LF, Sundin GW** (2016) New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**: 362–372
- Celetti M** (2011) Black Rot Of Crucifer Crops. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/02-025.htm>
- Cerutti A, Jauneau A, Auriac M-C, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noel LD** (2017) Immunity at cauliflower hydathodes controls infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiol* pp.01852.2016
- Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul J-M, Noël LD** (2019) Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 91–116
- Chaban B, Hughes HV, Beeby M** (2015) The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **46**: 91–103
- Chen X, Sun C, Laborda P, Zhao Y, Palmer I, Fu ZQ, Qiu J, Liu F** (2018) Melatonin Treatment Inhibits the Growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.02280
- Chen Z, Chen L, Zhang W** (2017) Tools for Genomic and Transcriptomic Analysis of Microbes at Single-Cell Level. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01831
- Cheng S-T, Wang F-F, Qian W** (2019) Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming. *PLOS Pathogens* **15**: e1007952

- Chou F-L, Chou H-C, Lin Y-S, Yang B-Y, Lin N-T, Weng S-F, Tseng Y-H** (1997) The *Xanthomonas campestris* gumD Gene Required for Synthesis of Xanthan Gum Is Involved in Normal Pigmentation and Virulence in Causing Black Rot. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**: 265–269
- Cole BJ, Feltcher ME, Waters RJ, Wetmore KM, Mucyn TS, Ryan EM, Wang G, Ul-Hasan S, McDonald M, Yoshikuni Y, et al** (2017) Genome-wide identification of bacterial plant colonization genes. *PLoS Biol* **15**: e2002860
- Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyk MK, Byrde RJW, Fielding AH** (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal* **3**: 3323–3328
- Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M-A** (2009) Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *MPMI* **22**: 747–757
- Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S, Jamet S, Zischek C, Lautier M, et al** (2013) The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytol* **198**: 899–915
- Deslandes L, Genin S** (2014) Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 110–117
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y** (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS* **100**: 8024–8029
- Deslandes L, Olivier J, Theulières F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y** (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS* **99**: 2404–2409
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y** (1998) Genetic Characterization of RRS1, a Recessive Locus in *Arabidopsis thaliana* that Confers Resistance to the Bacterial Soilborne Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MPMI* **11**: 659–667
- Diard M, Garcia V, Maier L, Remus-Emsermann MNP, Regoes RR, Ackermann M, Hardt W-D** (2013) Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature* **494**: 353–356
- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR** (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *PNAS* **77**: 7347–7351
- Dow M, Newman M-A, von Roepenack E** (2000) The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 241–261
- Dray S, Dufour A-B** (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* **20**

- Dugé de Bernonville T, Noël LD, SanCristobal M, Danoun S, Becker A, Soreau P, Arlat M, Lauber E** (2014) Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. *FEMS Microbiol Ecol* **89**: 527–541
- Duong DA, Jensen RV, Stevens AM** (2018) Discovery of *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* genes important for survival in corn xylem through a Tn-Seq analysis. *Molecular Plant Pathology* **19**: 1929–1941
- Dutta B, Gitaitis R, Sanders H, Booth C, Smith S, Langston DB** (2014) Role of Blossom Colonization in Pepper Seed Infestation by *Xanthomonas euvesicatoria*. *Phytopathology*® **104**: 232–239
- Faulkner C, Robatzek S** (2012) Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 699–707
- Ferrandez Y, Condemine G** (2008) Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* **69**: 1349–1357
- Figurski DH, Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *PNAS* **76**: 1648–1652
- Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM, Finkel OM, Gilbert S, Russ D, Teixeira PJPL, Dangel JL** (2020) The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annu Rev Microbiol*. doi: 10.1146/annurev-micro-022620-014327
- Francis VI, Porter SL** (2019) Multikinase Networks: Two-Component Signaling Networks Integrating Multiple Stimuli. *Annual Review of Microbiology* **73**: null
- Friesen ML** (2020) Social Evolution and Cheating in Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **58**: null
- García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E** (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* **18**: 549–579
- Gardner S, McCleary W** (2019) Control of the *phoBR* Regulon in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0006-2019
- Gerlach RG, Hensel M** (2007) Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 401–415
- Gerlin L, Cottret L, Cesbron S, Taghouti G, Jacques M-A, Genin S, Baroukh C** (2020) Genome-Scale Investigation of the Metabolic Determinants Generating Bacterial Fastidious Growth. *mSystems*. doi: 10.1128/mSystems.00698-19
- Gétaz M, Puławska J, Smits THM, Pothier JF** (2020) Host–Pathogen Interactions between *Xanthomonas fragariae* and Its Host *Fragaria × ananassa* Investigated with a Dual RNA-Seq Analysis. *Microorganisms* **8**: 1253
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison Iii CA, Smith HO** (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**: 343–345

- Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj D, Merfa MV, Pesce C, Jauneau A, et al** (2020) Repeated gain and loss of a single gene modulates the evolution of vascular plant pathogen lifestyles. *Science Advances* **6**: eabc4516
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011
- Gonzalez-Mula A, Lachat J, Mathias L, Naquin D, Lamouche F, Mergaert P, Faure D** (2019) The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytologist* **222**: 455–467
- Goodman RN, Novacky AJ** (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon.
- Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J** (2009) A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. *PLOS ONE* **4**: e4358
- Guy E, Genissel A, Hajri A, Chabannes M, David P, Carrere S, Lautier M, Roux B, Boureau T, Arlat M, et al** (2013a) Natural Genetic Variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pathogenicity on Arabidopsis Revealed by Association and Reverse Genetics. *mBio* **4**: e00538-12
- Guy E, Lautier M, Chabannes M, Roux B, Lauber E, Arlat M, Noël LD** (2013b) xopAC-triggered Immunity against *Xanthomonas* Depends on Arabidopsis Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes PBL2 and RIPK. *PLOS ONE* **8**: e73469
- Hassani MA, Özkurt E, Seybold H, Dagan T, Stukenbrock EH** (2019) Interactions and Coadaptation in Plant Metaorganisms. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 483–503
- He Y-Q, Zhang L, Jiang B-L, Zhang Z-C, Xu R-Q, Tang D-J, Qin J, Jiang W, Zhang X, Liao J, et al** (2007) Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol* **8**: R218
- He Y-W, Boon C, Zhou L, Zhang L-H** (2009) Co-regulation of *Xanthomonas campestris* virulence by quorum sensing and a novel two-component regulatory system RavS/RavR. *Molecular Microbiology* **71**: 1464–1476
- Helmann TC, Deutschbauer AM, Lindow SE** (2019) Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast. *PNAS* 201908858
- Helmann TC, Deutschbauer AM, Lindow SE** (2020) Distinctiveness of genes contributing to growth of *Pseudomonas syringae* in diverse host plant species. *PLOS ONE* **15**: e0239998
- Hengge R** (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 263–273

- Hengge R, Häussler S, Pruteanu M, Stülke J, Tschowri N, Turgay K** (2019) Recent Advances and Current Trends in Nucleotide Second Messenger Signaling in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2019.01.014
- Hibberd AM** (1987) Allelism Tests of Three Dominant Genes for Hypersensitive Resistance to Bacterial Spot of Pepper. *Phytopathology* **77**: 1304
- Hoffmann T, Warmbold B, Smits SHJ, Tschapek B, Ronzheimer S, Bashir A, Chen C, Rolbetzki A, Pittelkow M, Jebbar M, et al** (2018) Arsenobetaine: an ecophysiological important organoarsenical confers cytoprotection against osmotic stress and growth temperature extremes. *Environmental Microbiology* **20**: 305–323
- Hsieh Y-J, Wanner BL** (2010) Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 198–203
- Imdahl F, Vafadarnejad E, Homberger C, Saliba A-E, Vogel J** (2020) Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria. *Nature Microbiology* 1–5
- Indiana A** (2014) Rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*. phdthesis. Université d'Angers
- Jacques M-A, Arlat M, Boulanger A, Boureau T, Carrère S, Cesbron S, Chen NWG, Cociancich S, Darrasse A, Denancé N, et al** (2016) Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 163–187
- Jalan N, Kumar D, Andrade MO, Yu F, Jones JB, Graham JH, White FF, Setubal JC, Wang N** (2013) Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *BMC Genomics* **14**: 551
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kakkar A, Nizampatnam NR, Kondreddy A, Pradhan BB, Chatterjee S** (2015) *Xanthomonas campestris* cell–cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *J Exp Bot* **66**: 6697–6714
- Kamoun S, Kado CI** (1990) Phenotypic Switching Affecting Chemotaxis, Xanthan Production, and Virulence in *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3855–3860
- Kamoun S, Kamdar H, Tola E, Kado CI** (1992) Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**: 22–23
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Pühler A, Ielpi L** (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol* **180**: 1607–1617
- Kearns DB** (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 634–644
- Kim H, Joe A, Lee M, Yang S, Ma X, Ronald PC, Lee I** (2019) A Genome-Scale Co-Functional Network of *Xanthomonas* Genes Can Accurately Reconstruct Regulatory

- Kim S, Cho Y-J, Song E-S, Lee SH, Kim J-G, Kang L-W** (2016) Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. BMC Genomics **17**: 345
- Kocks CG, Ruissen MA, Zadoks JC, Duijkers MG** (1998) Survival and Extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Soil. European Journal of Plant Pathology **104**: 911–923
- Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U** (2006) Specific Binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes. J Bacteriol **188**: 7652–7660
- Krauthausen H-J, Laun N, Wohanka W** (2011) Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. J Plant Dis Prot **118**: 7–16
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K** (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol **35**: 1547–1549
- Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J** (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. FEMS Microbiol Rev **32**: 461–473
- Lee SE, Gupta R, Jayaramaiah RH, Lee SH, Wang Y, Park S-R, Kim ST** (2017) Global Transcriptome Profiling of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under in planta Growth and in vitro Culture Conditions. Plant Pathol J **33**: 458–466
- Leong SA, Ditta GS, Helinski DR** (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. J Biol Chem **257**: 8724–8730
- Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levailant M, Adachi H, Yoshioka H, et al** (2015) A Receptor Pair with an Integrated Decoy Converts Pathogen Disabling of Transcription Factors to Immunity. Cell **161**: 1074–1088
- Li L, Li J, Zhang Y, Wang N** (2019) Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. BMC Genomics **20**: 55
- Liao C-T, Liu Y-F, Chiang Y-C, Lo H-H, Du S-C, Hsu P-C, Hsiao Y-M** (2016) Functional characterization and transcriptome analysis reveal multiple roles for *prc* in the pathogenicity of the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Research in Microbiology **167**: 299–312
- Liao Z-X, Ni Z, Wei X-L, Chen L, Li J-Y, Yu Y-H, Jiang W, Jiang B-L, He Y-Q, Huang S** (2019) Dual RNA-seq of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* infecting rice reveals novel insights into bacterial-plant interaction. PLOS ONE **14**: e0215039
- Liu W, Yu Y-H, Cao S-Y, Niu X-N, Jiang W, Liu G-F, Jiang B-L, Tang D-J, Lu G-T, He Y-Q, et al** (2013) Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. Research in Microbiology **164**: 466–479

- Liu Z, Beskrovnaya P, Melnyk RA, Hossain SS, Khorasani S, O’Sullivan LR, Wiesmann CL, Bush J, Richard JD, Haney CH** (2018) A Genome-Wide Screen Identifies Genes in Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* Required to Evade Plant Defenses. *mBio* **9**: e00433-18
- Lopes B, Lessa V, Silva B, Carvalho MA, Schnitzler E, Lacerda L** (2015) Xanthan gum: Properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research* **54**: 185–194
- Ma Q, Bücking H, Gonzalez Hernandez JL, Subramanian S** (2019) Single-Cell RNA Sequencing of Plant-Associated Bacterial Communities. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2019.02452
- Macho AP, Zumaquero A, Ortiz-Martín I, Beuzón CR** (2007) Competitive index in mixed infections: a sensitive and accurate assay for the genetic analysis of *Pseudomonas syringae*–plant interactions. *Molecular Plant Pathology* **8**: 437–450
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, et al** (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614–629
- Marchetti M, Clerissi C, Yousfi Y, Gris C, Bouchez O, Rocha E, Cruveiller S, Jauneau A, Capela D, Masson-Boivin C** (2017) Experimental evolution of rhizobia may lead to either extra- or intracellular symbiotic adaptation depending on the selection regime. *Molecular Ecology* **26**: 1818–1831
- Matilla MA, Krell T** (2018) The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev.* doi: 10.1093/femsre/fux052
- Meline V, Delage W, Brin C, Li-Marchetti C, Sochard D, Arlat M, Rousseau C, Darrasse A, Briand M, Lebreton G, et al** (2019) Role of the acquisition of a type 3 secretion system in the emergence of novel pathogenic strains of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **20**: 33–50
- Misson J, Thibaud M-C, Bechtold N, Raghothama K, Nussaume L** (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol Biol* **55**: 727–741
- Moreira LM, Facincani AP, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, Gozzo FC, de Oliveira JCF, Ferro JA, Soares MR** (2015) Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. *Funct Integr Genomics* **15**: 197–210
- Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER** (2012) The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio.* doi: 10.1128/mBio.00036-12
- Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S-I, Sakamoto W, Shimmen T, et al** (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1826–1837
- Nobori T, Velásquez AC, Wu J, Kvitko BH, Kremer JM, Wang Y, He SY, Tsuda K** (2018) Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *PNAS* **115**: E3055–E3064

- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U** (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology* **41**: 1271–1281
- Noh T-H, Song E-S, Kim H-I, Kang M-H, Park Y-J** (2016) Transcriptome-Based Identification of Differently Expressed Genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains Exhibiting Different Virulence in Rice Varieties. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 259
- Noutoshi Y, Ito T, Seki M, Nakashita H, Yoshida S, Marco Y, Shirasu K, Shinozaki K** (2005) A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR–NBS–LRR–WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **43**: 873–888
- van Opijnen T, Levin HL** (2020) Transposon Insertion Sequencing, a Global Measure of Gene Function. *Annual Review of Genetics* **54**: null
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE** (2000) Disruption of Signaling by Yersinia Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. *Science* **290**: 1594–1597
- Ottesen AR, González Peña A, White JR, Pettengill JB, Li C, Allard S, Rideout S, Allard M, Hill T, Evans P, et al** (2013) Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiol* **13**: 114
- Pandey SS, Patnana PK, Lomada SK, Tomar A, Chatterjee S** (2016) Co-regulation of Iron Metabolism and Virulence Associated Functions by Iron and XibR, a Novel Iron Binding Transcription Factor, in the Plant Pathogen *Xanthomonas*. *PLOS Pathogens* **12**: e1006019
- Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, et al** (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* **15**: R77
- Pegos VR, Nascimento JF, Sobreira TJP, Pauletti BA, Paes-Leme A, Balan A** (2014) Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. *Journal of Proteomics* **108**: 78–88
- Pereira CT, Moutran A, Fessel M, Balan A** (2015) The sulfur/sulfonates transport systems in *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *BMC Genomics* **16**: 524
- Petri DFS** (2015) Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*. doi: 10.1002/app.42035
- Powell JE, Leonard SP, Kwong WK, Engel P, Moran NA** (2016) Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *PNAS* **113**: 13887–13892
- Price MN, Wetmore KM, Waters RJ, Callaghan M, Ray J, Liu H, Kuehl JV, Melnyk RA, Lamson JS, Suh Y, et al** (2018) Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* **557**: 503–509

- Qian W, Han Z-J, He C** (2008a) Two-Component Signal Transduction Systems of *Xanthomonas* spp.: A Lesson from Genomics. *MPMI* **21**: 151–161
- Qian W, Han Z-J, Tao J, He C** (2008b) Genome-Scale Mutagenesis and Phenotypic Characterization of Two-Component Signal Transduction Systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1128–1138
- Qian W, Jia Y, Ren S-X, He Y-Q, Feng J-X, Lu L-F, Sun Q, Ying G, Tang D-J, Tang H, et al** (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**: 757–767
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O** (2009) ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 218–227
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140
- Robinson MD, Oshlack A** (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* **11**: R25
- Roux B, Bolot S, Guy E, Denancé N, Lautier M, Jardinaud M-F, Fischer-Le Saux M, Portier P, Jacques M-A, Gagnevin L, et al** (2015) Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge the concept of core type III effectome. *BMC Genomics* **16**: 975
- Royet K, Parisot N, Rodrigue A, Gueguen E, Condemine G** (2019) Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii* genes required for survival in chicory plants. *Molecular Plant Pathology* **20**: 287–306
- Rufián JS, Sánchez-Romero M-A, López-Márquez D, Macho AP, Mansfield JW, Arnold DL, Ruiz-Albert J, Casadesús J, Beuzón CR** (2016) *Pseudomonas syringae* Differentiates into Phenotypically Distinct Subpopulations During Colonization of a Plant Host. *Environmental Microbiology* **18**: 3593–3605
- Rundell EA, McKeithen-Mead SA, Kazmierczak BI** (2016) Rampant Cheating by Pathogens? *PLOS Pathogens* **12**: e1005792
- Ryan RP, An S, Allan JH, McCarthy Y, Dow JM** (2015) The DSF Family of Cell–Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators. *PLOS Pathogens* **11**: e1004986
- Ryan RP, McCarthy Y, Andrade M, Farah CS, Armitage JP, Dow JM** (2010) Cell–cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *PNAS* **107**: 5989–5994
- Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM** (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 344–355
- Sæther B-E, Engen S** (2015) The concept of fitness in fluctuating environments. *Trends in Ecology & Evolution* **30**: 273–281
- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D, et al** (2013) Next-Generation Annotation

of Prokaryotic Genomes with EuGene-P: Application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res* **20**: 339–354

Samal B, Chatterjee S (2019) New insight into bacterial social communication in natural host: Evidence for interplay of heterogeneous and unison quorum response. *PLOS Genetics* **15**: e1008395

Sandkvist M (2001) Biology of type II secretion. *Molecular Microbiology* **40**: 271–283

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* **1**

Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73

Schmidtke C, Findeiß S, Sharma CM, Kuhfuß J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U (2012) Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Res* **40**: 2020–2031

Schulte R, Bonas U (1992) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of Bacteriology* **174**: 815–823

Shi X, Gao W, Wang J, Chao S-H, Zhang W, Meldrum DR (2015) Measuring gene expression in single bacterial cells: recent advances in methods and micro-devices. *Critical Reviews in Biotechnology* **35**: 448–460

da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Sluys MAV, Almeida NF, Alves LMC, et al (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463

Singh D, Dhar S, Yadava DK (2011) Genetic and Pathogenic Variability of Indian Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Causing Black Rot Disease in Crucifers. *Curr Microbiol* **63**: 551

Singla-Rastogi M, Charvin M, Thiébeauld O, Perez-Quintero AL, Ravet A, Emidio-Fortunato A, Mendu V, Navarro L (2019) Plant Small RNA Species Direct Gene Silencing in Pathogenic Bacteria as well as Disease Protection. *bioRxiv* 863902

Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38**: 986–1003

Smith SE, Smith FA (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 227–250

Sparrow PAC, Dale PJ, Irwin JA (2004) The use of phenotypic markers to identify *Brassica oleracea* genotypes for routine high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* **23**: 64–70

- Stephenson P, Baker D, Girin T, Perez A, Amoah S, King GJ, Østergaard L** (2010) A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology* **10**: 62
- Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M, Benecke A, Ackermann M, Benz M, Dormann J, Hardt W-D** (2011) The Cost of Virulence: Retarded Growth of *Salmonella Typhimurium* Cells Expressing Type III Secretion System 1. *PLOS Pathogens* **7**: e1002143
- Su H-Z, Wu L, Qi Y-H, Liu G-F, Lu G-T, Tang J-L** (2016) Characterization of the GntR family regulator HpaR1 of the crucifer black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Scientific Reports* **6**: 19862
- Subramanian S, Kearns DB** (2019) Functional Regulators of Bacterial Flagella. *Annual Review of Microbiology* **73**: null
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF** (2006) Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and Its Impact on Elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2–Dependent Defenses. *The Plant Cell* **18**: 764–779
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C** (2001) *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology* **183**: 3597–3605
- Tasset C, Bernoux M, Jauneau A, Pouzet C, Brière C, Kieffer-Jacquiod S, Rivas S, Marco Y, Deslandes L** (2010) Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* Effector PopP2 Targets a Lysine Residue Essential for RRS1-R-Mediated Immunity in Arabidopsis. *PLOS Pathogens* **6**: e1001202
- Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ** (1987) Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *PNAS* **84**: 2833–2837
- Thibault D, Jensen PA, Wood S, Qabar C, Clark S, Shainheit MG, Isberg RR, van Opijnen T** (2019) Droplet Tn-Seq combines microfluidics with Tn-Seq for identifying complex single-cell phenotypes. *Nature Communications* **10**: 5729
- Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JB** (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-020-0361-8
- Udvardi M, Poole PS** (2013) Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 781–805
- Vaas LAI, Sikorski J, Hofner B, Fiebig A, Buddhuhs N, Klenk H-P, Göker M** (2013) *opm*: an R package for analysing OmniLog® phenotype microarray data. *Bioinformatics* **29**: 1823–1824
- Vaas LAI, Sikorski J, Michael V, Göker M, Klenk H-P** (2012) Visualization and Curve-Parameter Estimation Strategies for Efficient Exploration of Phenotype Microarray Kinetics. *PLOS ONE* **7**: e34846
- Vergalli J, Bodrenko IV, Masi M, Moynié L, Acosta-Gutiérrez S, Naismith JH, Davin-Regli A, Ceccarelli M, van den Berg B, Winterhalter M, et al** (2020) Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **18**: 164–176

- Verma RK, Samal B, Chatterjee S** (2018) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chemotaxis components and chemoreceptor Mcp2 are involved in the sensing of constituents of xylem sap and contribute to the regulation of virulence-associated functions and entry into rice. *Molecular Plant Pathology* **19**: 2397–2415
- Vicente JG, Holub EB** (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* **14**: 2–18
- Vorholt JA** (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**: 828–840
- Wang F-F, Cheng S-T, Wu Y, Ren B-Z, Qian W** (2017) A Bacterial Receptor PcrK Senses the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to Oxidative Stress. *Cell Rep* **21**: 2940–2951
- Wang G, Roux B, Feng F, Guy E, Li L, Li N, Zhang X, Lautier M, Jardinaud M-F, Chabannes M, et al** (2015a) The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **18**: 285–295
- Wang J, Chen L, Chen Z, Zhang W** (2015b) RNA-seq based transcriptomic analysis of single bacterial cells. *Int Bio (Cam)* **7**: 1466–1476
- Wang J-Y, Zhou L, Chen B, Sun S, Zhang W, Li M, Tang H, Jiang B-L, Tang J-L, He Y-W** (2015c) A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Scientific Reports* **5**: 18456
- Wang L, Pan Y, Yuan Z-H, Zhang H, Peng B-Y, Wang F-F, Qian W** (2016) Two-Component Signaling System VgrRS Directly Senses Extracytoplasmic and Intracellular Iron to Control Bacterial Adaptation under Iron Depleted Stress. *PLOS Pathogens* **12**: e1006133
- Wang L, Zhang L, Geng Y, Xi W, Fang R, Jia Y** (2011) XerR, a negative regulator of XccR in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, relieves its repressor function in planta. *Cell Res* **21**: 1131–1142
- Wang W, Yang J, Zhang J, Liu Y-X, Tian C, Qu B, Gao C, Xin P, Cheng S, Zhang W, et al** (2020) An Arabidopsis Secondary Metabolite Directly Targets Expression of the Bacterial Type III Secretion System to Inhibit Bacterial Virulence. *Cell Host & Microbe* **27**: 601-613.e7
- Wargo MJ** (2013) Homeostasis and Catabolism of Choline and Glycine Betaine: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2112–2120
- Weigel WA, Dersch P** (2018) Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes and Infection* **20**: 570–577
- Wengelnik K, Rossier O, Bonas U** (1999) Mutations in the Regulatory Gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Result in Constitutive Expression of All *hrp* Genes. *J Bacteriol* **181**: 6828–6831
- Wetmore KM, Price MN, Waters RJ, Lamson JS, He J, Hoover CA, Blow MJ, Bristow J, Butland G, Arkin AP, et al** (2015) Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-coded transposons. *MBio* **6**: e00306-00315

- Williams PH** (1980) Black rot : A continuing threat to the World of Crucifers. Rimmer RS, Shattuk VI & Buchwaldt L (Eds) **64**: 60–62
- Willisky GR, Malamy MH** (1980) Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **144**: 356–365
- Wolf JMVD, Zouwen PSVD** (2010) Colonization of Cauliflower Blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via Flies (*Calliphora vomitoria*) Can Result in Seed Infestation. *Journal of Phytopathology* **158**: 726–732
- Xu R-Q, Blanvillain S, Feng J-X, Jiang B-L, Li X-Z, Wei H-Y, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, et al** (2008) AvrACXcc8004, a Type III Effector with a Leucine-Rich Repeat Domain from *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris* Confers Avirulence in Vascular Tissues of *Arabidopsis thaliana* Ecotype Col-0. *Journal of Bacteriology* **190**: 343–355
- Yang C, Huang T-W, Wen S-Y, Chang C-Y, Tsai S-F, Wu W-F, Chang C-H** (2012) Genome-Wide PhoB Binding and Gene Expression Profiles Reveal the Hierarchical Gene Regulatory Network of Phosphate Starvation in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **7**: e47314
- Yaryura PM, Conforte VP, Malamud F, Roeschlin R, Pino V, Castagnaro AP, McCarthy Y, Dow JM, Marano MR, Vojnov AA** (2015) XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Environmental Microbiology* **17**: 4164–4176
- Yun MH, Torres PS, Oirdi ME, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA** (2006) Xanthan Induces Plant Susceptibility by Suppressing Callose Deposition. *Plant Physiology* **141**: 178–187
- Zhang F, Du Z, Huang L, Cruz CV, Zhou Y, Li Z** (2013) Comparative Transcriptome Profiling Reveals Different Expression Patterns in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains with Putative Virulence-Relevant Genes. *PLOS ONE* **8**: e64267
- Zhang H-Y, Wei J-W, Qian W, Deng C-Y** (2020) Analysis of HrpG regulons and HrpG-interacting proteins by ChIP-seq and affinity proteomics in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant Pathology* **21**: 388–400
- Zhang S-S, He Y-Q, Xu L-M, Chen B-W, Jiang B-L, Liao J, Cao J-R, Liu D, Huang Y-Q, Liang X-X, et al** (2008) A putative colRXC1049–colSXC1050 two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates hrpC and hrpE operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Research in Microbiology* **159**: 569–578
- Zhang Z-M, Ma K-W, Gao L, Hu Z, Schwizer S, Ma W, Song J** (2017) Mechanism of host substrate acetylation by a YopJ family effector. *Nature Plants* **3**: 1–10
- Zhou J-M, Zhang Y** (2020) Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.028
- Zhou L, Zhang L-H, Cámara M, He Y-W** (2017) The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends in Microbiology* **25**: 293–303