



Diversité des effecteurs transcription activator-like (TALE) chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot et mécanismes impliqués dans la résistance du haricot à la graisse commune

Charlotte Gaudin

► To cite this version:

Charlotte Gaudin. Diversité des effecteurs transcription activator-like (TALE) chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot et mécanismes impliqués dans la résistance du haricot à la graisse commune. Sciences agricoles. Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, 2023. Français. ⟨NNT : 2023AGROC171⟩. ⟨tel-04624877⟩

HAL Id: tel-04624877

<https://theses.hal.science/tel-04624877v1>

Submitted on 25 Jun 2024

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

THESE DE DOCTORAT

DE
L'INSTITUT NATIONAL D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION
ET L'ENVIRONNEMENT

ECOLE INTERNE L'INSTITUT AGRO RENNES-ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 642

Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

Spécialité : Biologie des organismes

Par

Charlotte GAUDIN

**Diversité des effecteurs transcription activator-like (TALE)
chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot et
mécanismes impliqués dans la résistance du haricot à la
graisse commune.**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 11 décembre 2023

Unité de recherche : IRHS1345 Equipe EmerSys

Thèse N° : 2023-27 C-171

Rapporteurs avant soutenance :

Boris SZUREK	DR - IRD, PHIM
Mathilde FAGARD	DR - INRAE, UMR IJPB

Composition du Jury :

Président : Emmanuel GEOFFRIAU

Examineurs : Valérie GEFFROY

Emmanuel GEOFFRIAU

Dir. de thèse : Marie-Agnès JACQUES

Co-dir. de thèse : Nicolas CHEN

DR – INRAE, UMR IPS2

PR – L'institut Agro, UMR IRHS

DR - INRAE, UMR IRHS

MDC - L'institut Agro, UMR IRHS

A mes parents,
Raphaël, Louise
et Xavier

« Regarder une chose et la voir sont deux actes très différents. On ne voit quelque chose que si l'on en voit la beauté. Alors, et alors seulement, elle vient à l'existence. » Oscar Wilde dans *Le déclin du mensonge*.

Remerciements

J'ai une reconnaissance infinie pour les gens qui m'ont entourée durant cette thèse. Le chemin n'était pas toujours rectiligne, un grand merci à l'ensemble des personnes qui m'ont permis d'atteindre le sommet de cette montagne.

Tout d'abord, je souhaite remercier la région Pays de Loire, l'INRAE et l'Institut Agro Rennes-Angers qui ont financé ce projet et sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Boris Szurek, Mathilde Fagard, Emmanuel Geoffriau et Valérie Geffroy. Merci à Soulaïman SAKR et merci de nouveau à Valérie Geffroy, membres de mon comité de suivi individuel pour leurs conseils éclairés sur mes travaux et leur bienveillance.

Un énorme merci à mes encadrants de m'avoir donné cette chance et de m'avoir accompagnée sur le chemin tumultueux de la thèse. Vous n'étiez jamais loin dans mes moments de doutes malgré vos agendas bien remplis. Je n'aurais pas pu rêver de meilleur duo d'encadrement !

Nicolas, tu as constamment su te placer à mon niveau de connaissances et me transmettre les tiennes de manière limpide. Depuis mon premier stage, tu m'as mise en confiance et nous avons pu communiquer aisément, toujours de manière franche, ce qui a été déterminant dans l'accomplissement de cette thèse. Tu as su trouver les mots justes pour me redonner le courage de persévérer. « Failure is not an option », merci d'avoir été optimiste et encourageant face aux échecs que l'on a rencontrés. Je garderai en mémoire notre périple en Floride et ce vol chaotique, qui est une belle métaphore du cheminement d'une thèse. Tout le monde ne peut pas dire qu'il a nagé aux côtés de lamantins avec son directeur de thèse et failli le voir disparaître dans la bouche d'un alligator ! Notre goût commun pour les jeux de mots me pousse à t'écrire : à bientôt je l'espère !

Marie-Agnès, tu as su me guider avec une énorme empathie, à la fois dans cette thèse et dans le moment le plus difficile de ma vie personnelle. Merci pour les nombreux échanges que l'on a eus et en particulier, pour notre conversation au début de ma thèse, qui m'a permis de remettre le pied à l'étrier. Merci pour tes conseils avisés, tu as su me recentrer sur l'essentiel et alléger mes préoccupations. Tu m'as accordé ton temps malgré le nombre de responsabilités que tu assumes. Merci d'avoir été un phare, un guide, pendant cette thèse et merci pour ton rire qui a égayé nos réunions. Tu es une mentore, un modèle, que je garderai à jamais à l'esprit durant toute ma carrière, en espérant transmettre à d'autres ce que tu m'as offert.

Anne, merci d'avoir été ma coéquipière de choc pendant cette thèse. Ton soutien a été incommensurable et m'a permis d'aller jusqu'au bout de celle-ci. J'ai tellement appris à tes côtés, de l'expérimentation jusqu'au bureau, en passant évidemment par R et le loisir créatif. Tu m'as offert une autre perspective de la science grâce à tes nombreuses expériences dans le monde scientifique. La routine n'était jamais ennuyeuse grâce à nos nombreuses conversations ! Ton rire et nos chamailleries ont égayé mes journées de laboratoire. Merci également d'avoir bravé l'orage en revenant de Nantes, tout en écoutant Starmania, dans une ultime mission de ta carrière pour l'INRAE. Profite de cette retraite tant méritée, ponctuée (je n'en doute pas) de loisir créatif, d'actions caritatives et des nouvelles aventures d'Anne Préveaux (ça pourrait être le titre d'un bon bouquin).

Tiffany, cette thèse valait le coup, rien que pour le fait de t'avoir rencontrée ! Tiffanight, reine de la night, tu as été mon roc durant cette thèse, il n'y a rien de plus magique de vivre cela avec quelqu'un qui comprend parfaitement l'expérience. Merci pour nos délires farfelus, nos discussions philosophiques passionnantes (que nos voisins nous en excusent), nos séances de cinéma, nos sorties, ton empathie et ta sagesse sans limite. Notre amitié est le plus beau cadeau que cette thèse m'ait offert. Petit é(lec)tron libre, je te souhaite le meilleur autant sur le plan personnel que professionnel car tu le mérites. Que ton chemin soit ponctué de Pokémons à prendre en photos (en .tif s'il-te-plaît). J'espère qu'on aura l'occasion de travailler de nouveau côte à côte, cela ne rendra l'aventure

scientifique que plus belle. Notre bureau des légendes va me manquer terriblement, c'est dur de le quitter.

Nathan, je n'aurais pas pu demander meilleur premier stagiaire ! Ça a été un plaisir de travailler à tes côtés. Ta volonté, ton énergie et ta bonne humeur ont rendu la thèse moins lourde à porter. L'encadrement de ton stage m'a énormément appris ! Il y a beaucoup de pressions pour les futurs stagiaires que j'encadrerai, tu as mis la barre haute. ;) J'espère que l'on aura d'autres occasions de travailler ensemble dans le futur !

Justine et Mylène, merci pour tous les conseils que vous m'avez offerts. Vous avez toujours su me rassurer sur la thèse et l'après thèse, tout ça autour d'un bon repas. Merci d'avoir passé votre tête dans le bureau pour prendre des nouvelles quand vous passiez dans le coin. Sans vos propres efforts pendant les six ans précédents cette thèse, ce projet n'aurait pas pu naître. Je vous remercie chaleureusement pour tous les chemins que vous avez ouverts devant moi ! Merci plus particulièrement à Justine qui m'a transmis son savoir des TALE, je n'aurais pu rêver meilleure professeure ! Tu as été d'une patience et d'une générosité infinie.

Damien, merci pour tout le travail que tu as fourni. Je sais que d'arriver sur un projet bien entamé n'est pas chose aisée, surtout en compagnie d'une thésarde débordée. Merci pour ta bonne humeur, ta volonté et tes blagues qui ont permis de ne pas voir le temps passer pendant les manips.

Il y a beaucoup de personnes merveilleuses à remercier avec qui j'ai eu la chance de travailler et trop peu de place pour le faire ! Merci à :

Agathe pour toutes nos discussions et nos sorties qui m'ont emplies d'une joie incroyable. J'espère pouvoir voir les Ninja kittens en action ! Mes racines seront toujours sur Angers, alors je n'ai pas de doute qu'on se reverra. En attendant, fais-toi confiance. ;)

Martial tu es sûrement l'homme le plus gentil et bienveillant avec qui j'ai pu travailler. J'aurais souvent été perdue sans ton aide précieuse.

Sophie B. tu as toujours été disponible depuis mon premier stage, quand j'avais juste « une petite question ». Merci pour toutes nos rigolades.

Chrystelle ça a été un plaisir de travailler avec toi sur cette fin de thèse, dans l'ambiance tamisée et fraîche du plateau IMAC. Je dirai même que ça s'est passé « nickel Miguel » !

Marie, Jessica et Alba pour nos nombreuses conversations sur la thèse et la suite d'une thèse. Vos conseils et vos encouragements ont toujours réussi à me rendre plus sereine.

Matthieu pour tous tes recommandations aussi bien scientifiques que de managements, tes chansons et ton humour.

Armelle, Géraldine, Marion et Sophie C., pour les conservations sérieuses et moins sérieuses que l'on a partagées. Et surtout pour cette magnifique buche que l'on a réalisée avec Jessica, quel super souvenir !

Coralie pour ta bonne humeur, ton humour et nos discussions sur l'univers marvel. En espérant un prochain karaoké !

Audrey et Stéphanie pour l'aide précieuse que vous avez apportée à cette thèse en vous occupant de tout le matériel nécessaire au fonctionnement des manips.

Je ne peux malheureusement pas remercier tout le monde individuellement alors de manière plus globale : Un grand merci à l'équipe EmerSys qui est constituée de personnes exceptionnelles. Vous savez valoriser l'originalité de chaque personne afin de rendre la science plus belle. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts et de m'avoir accompagnée dans ma progression de stagiaire à jeune docteure, tout en développant ce qui me rendait unique dans la science. Peu importe les difficultés de la thèse et les expériences qui m'attendaient, ça a toujours été facile d'aller au labo grâce à vous.

Un grand merci aux doctorants actuels ou anciens de l'IRHS que j'ai côtoyés pendant ces trois ans. Guillaume, Caroline, Enora, Christopher, Gontran, Amélie, Euvaris, Axelle, Térance, Andréa, Romane et Antoine, ça a été un plaisir de partager ce quotidien avec vous.

Merci également aux différents stagiaires que j'ai croisés durant cette thèse. Gautier et Tehani j'ai beaucoup ri à vos côtés !

David Trillard, je t'ai beaucoup sollicité en cette fin de thèse (ça n'aurait pas été drôle sinon !). Merci d'avoir été réactif sur tous ces problèmes d'ordinateur.

Jérôme Verdier et David Lalanne, j'ai énormément apprécié travailler à vos côtés. Merci pour votre accompagnement, votre temps et votre humour.

Merci à Pierre Santagostini et Angéline El Ghaziri pour vos conseils en statistiques et plans expérimentaux, j'ai beaucoup appris à vos côtés !

Je remercie également toutes les plateformes et leurs membres qui ont participé à cette thèse : BIBS (Loïc Foucat, Loric Thoulouze, Richard Sibout, Fabienne Guillon, Sophie Le-Gall, Bruno Novales), IJPB (Sylvie Citerne et Grégory Mouille), IMAC (Aurélia Rolland et Fabienne Simonneau). Merci à l'équipe Phenotic pour l'entretien des serres et plus particulièrement à Daniel Sochard, Anaïs Hardouin et Kaat Hellyn d'avoir choyé nos petits haricots ! Sans vous les essais plantes auraient été impossibles.

Merci au réseau FNX et à ces membres. Votre bienveillance m'a permis de débiter sereinement sur la scène scientifique.

Je souhaite maintenant remercier d'un point de vue plus personnel mes proches. A toutes les personnes qui vont suivre, un grand merci. C'est sûrement quelque chose que vous avez rarement entendu de ma part, voire jamais, car ces mots ne sont pas toujours simples à dire mais, je vous aime. Mon cœur est toujours plein quand je pense à vous.

Papa, Maman, vous avez cru en moi, sûrement même bien avant ma naissance. Vous m'avez poussée à me dépasser, même quand je ne pensais pas en être capable. Vous m'avez permis de rêver grand et je sais que vous serez toujours là pour m'épauler. Merci pour les sacrifices que vous avez réalisés afin de m'offrir la vie que j'ai aujourd'hui. J'ai pu expérimenter tellement de choses grâce à vous. Merci également pour votre soutien sans faille pendant cette thèse et vos petites attentions qui ont soulagé mon quotidien durant cette dernière étape de rédaction. Merci d'essayer d'alléger les moments difficiles avec vos blagues. Maman, je crois que c'est peut-être à toi que je dois le plus la curiosité qui m'a amené sur le chemin de la science. Papa, j'espère manier un jour aussi bien les mots que toi. Chacun des textes que tu écris m'inspirent et m'impressionnent beaucoup. Votre expérience m'a été et me sera toujours précieuse, à la fois d'un point de vue personnel et professionnel.

Raph, Loulou, qui demander de mieux que vous deux pour affronter la vie ? Je suis chanceuse de vous avoir à mes côtés. Merci pour nos délires, nos conversations sérieuses, nos débats philosophiques et vos petits plats. Merci pour l'amour débordant et inconditionnel que vous me portez depuis que vous êtes petits. Il n'y a rien de plus gratifiant que de vous voir grandir et devenir les adultes que vous devenez. Il n'y a sûrement pas de grande sœur plus fière au monde. Et dans l'avenir, peu importe où je me trouverais sur le globe, je serai toujours à un coup de fil de vos soucis si vous avez besoin d'une oreille attentive. Merci également à toi Clara pour ta gentillesse et ton rire. Tu viens compléter notre famille qui ne s'en retrouve que plus belle grâce à toi !

Pour reprendre les paroles un jour prononcées par un grand sage : « On dit qu'on ne choisit pas sa famille, mais s'il fallait choisir, je vous choiserais tous ! » Nous avons affronté notre lot de tempêtes et de bons moments. Et je sais désormais qu'on se relèvera tant qu'on sera ensemble. Merci à mes grands-parents de m'avoir transmis cet amour pour la nature. Vous êtes tous les quatre une bibliothèque de savoirs que j'adore consulter et vous êtes les ponts qui relient les membres de nos familles. Merci à mes oncles et tantes Gaudin, Herbert, Bret, Bessy et Testu pour des heures et des heures remplies de rire, de discussions animées, de musiques, de danses et tant d'autres choses ! Merci aux coucouzinzins et aux nouvelles têtes qui font grandir la table à nos retrouvailles. J'ai des souvenirs plein la tête de nos aventures. Et je ne peux les imaginer sans des tablées bruyantes où les taquineries fusent, entremêlées par des discussions passionnantes. Merci aux petits filous, Jordane et Gaby de me faire tant rire. Je suis fière d'être votre grande cousine et de vous voir chacun mener votre propre chemin !

Tonton Xavier, malheureusement tu n'as pas pu être là sur le chemin que j'ai suivi ces trois dernières années. Mais je t'ai gardé près de moi tout au long du trajet, dans les bons moments comme les moins bons. Tu as dansé à mes côtés quand Ska-P venait dynamiser mes manips, tes blagues m'ont faites rire toute seule et tes arcs-en-ciel sont venus sécher mes larmes. Je sais qu'en cette fin de thèse, tu m'aurais trouvé un nouveau surnom ! Je suis reconnaissante pour la route que l'on a pu partager ensemble (chaque seconde) et les leçons apprises suite à ton départ. Tout se termine un jour, alors profitons et aimons le plus possible. J'essaie de vivre chaque jour en gardant ta gentillesse à l'esprit.

Je remercie avec une reconnaissance infinie la famille que j'ai choisie, mes amis.

Joséphine, dix ans d'amitié, ce n'est pas rien ! On a grandi et évolué ensemble. Merci pour nos karaokés, nos restau' et nos nombreuses discussions qui m'ont permis de décompresser. Hâte de voir ce que les dix prochaines années nous réservent p'tit pot d'yahourt.

Lilac, Marie, Benjamin, merci pour nos retrouvailles et votre soutien sans faille malgré la distance qui nous sépare. Il a été d'autant plus essentiel en cette fin de thèse et j'ai toujours su que je pouvais me tourner vers vous dans les moments difficiles. Vos conseils en microbio ont été précieux et l'amour de la bonne bouffe nous a toujours rassemblés ! J'espère que de nombreux voyages et rigolades nous attendent dans le futur. Et qui sait, le gang des zoulettes montera peut-être un jour son propre labo :) Justine et Gaëlle, nos sorties ont été une pause rafraîchissante pendant ma thèse. Elles m'ont permis de me recharger totalement (vous n'imaginez pas à quel point). Être avec vous me fait me sentir légère et gagner à chaque fois une bonne séance d'abdos tellement je ris ! A quand Tolède, c'est la véritable question !

Une dédicace spéciale aux boules de poils qui ont accompagné cette thèse et ma vie. Merci à Nut' d'avoir assisté à toutes ces réunions scientifiques en visio. Ton point de vue (toujours pertinent évidemment) me manque énormément désormais. Merci à ma collègue de télétravail, Maya, d'avoir pris la relève et de me forcer à prendre des pauses avec ses bêtises !

Table des matières

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique	3
I. Les interactions plantes-agents pathogènes.....	5
1. La défense passive	5
2. Le système immunitaire des plantes	5
a. L'immunité à large spectre.....	5
b. L'immunité médiée par les effecteurs (ETI)	7
c. Les réponses de défense	9
d. PTI et ETI, des voies interconnectées	11
II. Rôle des parois cellulaires végétales dans les interactions entre <i>Xanthomonas</i> et plantes hôtes.....	12
1. Contexte général	12
2. Guardians or gateways? The intricate relationship between plant cell walls and <i>Xanthomonas</i>	13
III. Les bactéries phytopathogènes du genre <i>Xanthomonas</i>	37
1. Cycle infectieux	37
1. Les systèmes de sécrétion et leurs effecteurs.....	39
a. Le système de sécrétion de type 1 (SST1)	39
b. Les systèmes de sécrétion de type 2 (SST2)	39
c. Système de sécrétion de type 3 (SST3).....	40
d. Système de sécrétion de type 4 (SST4).....	41
e. Système de sécrétion de type 5 (SST5).....	41
f. Système de sécrétion de type 6 (SST6).....	41
2. Les effecteurs Transcription Activator-Like.....	43
a. Structure et mécanisme d'action	43
a. Une reconnaissance spécifique de l'ADN.....	43

b.	Applications du code TALE.....	45
c.	Les TALE dans d'autres genres bactériens	45
d.	Rôle dans la sensibilité des plantes	45
e.	Mécanismes de résistance aux TALE	47
IV.	Le haricot commun (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	51
1.	Origine et évolution : L'histoire génétique du haricot commun.....	51
2.	Symbioses et rotation de cultures : un atout pour une agriculture durable.....	53
3.	Importance nutritionnelle et économique	53
4.	Agents pathogènes et maladies	55
5.	Génomique du haricot commun pour la sélection	55
V.	La gousse commune du haricot.....	59
1.	Symptomatologie et incidence de la maladie.....	59
2.	Les agents responsables de la gousse commune.....	59
3.	Cycle infectieux	61
a.	Sources d'inoculum primaire	61
b.	Colonisation	62
c.	Dissémination.....	62
4.	Gestion de la maladie.....	63
a.	Lutte chimique et biologique.....	63
a.	Pratiques culturales	63
b.	La sélection sanitaire des semences	65
c.	Lutte génétique	65
5.	L'adaptation des <i>Xanthomonas</i> au haricot commun.....	66
6.	Les TALE chez <i>Xcf</i> et <i>Xpp</i>	69
VI.	Problématique de la thèse et question de recherche	70
Chapitre 1 : Etude de la diversité des agents de la gousse commune du haricot et de leurs TALE.		
.....		73

I. Préambule.....	75
1. Whole Genome Sequences of Nine <i>Xanthomonas</i> Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean	76
II. Worldwide diversity of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> and <i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> reveals distinct evolution patterns for transcription activator-like effectors.	80
Chapitre 2 : Etude de gènes candidats pour la résistance du haricot à la graise commune ..	121
I. Préambule.....	122
II. The transcription repressor <i>PvOFP7</i> is a key regulator of common bean defense against common bacterial blight	124
III. Résultats complémentaires	164
1. Matériels & Méthodes.....	164
2. Résultats.....	169
IV. Discussion & perspectives.....	175
Discussion	179
I. Caractérisation de la diversité des TALE chez les <i>Xanthomonas</i> pathogènes du haricot	180
1. Les facteurs influençant la diversité allélique des TALE	180
2. Cible de XfuTAL1	182
II. Etude des mécanismes de résistance du haricot à la graise commune.....	183
1. La résistance médiée par <i>PvOFP7</i>	184
2. La résistance chez d'autres génotypes	185
3. D'autres voies à explorer	185
III. Durabilité de la résistance.....	187
1. Résistance contre les TALE	187
2. Résistance quantitative et qualitative	188
Conclusion générale	191
Références bibliographiques	195
Annexe : Vulgarisation.....	223

1.	Vulgarisation de la thèse	225
2.	Les mystérieuses taches du pain	225
3.	Qui veut la peau de la pomme ?.....	225
4.	Livre « Comme au labo ».....	225

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1. Représentation schématique d'une cellule végétale et de son système immunitaire simplifié.....	4
Figure 2. Diversité des PRR impliqués dans l'immunité des plantes	6
Figure 3. Diversité des NLR impliqués dans l'immunité des plantes.....	8
Figure 4. Interconnexion entre la PTI et l'ETI.....	10
Figure 5. Cycle de colonisation des <i>Xanthomonas</i>	36
Figure 6. Représentation schématique des SST1 à -6 (=Type I to VI) caractérisés chez <i>Xanthomonas</i>	38
Figure 7. Fonctionnement des TALE	42
Figure 8. Activation transcriptionnelle d'un gène végétal par un TALE	42
Figure 9. Représentation schématique d'un TALE	44
Figure 10. Base structurale de l'interaction entre un TALE et de l'ADN.....	44
Figure 11. Structure des TALE	44
Figure 12. Code TALE reliant les RVDs à leur(s) nucléotide(s) cible(s)	46
Figure 13. Principe de construction d'un dTALE	46
Figure 14. Résumé des fonctions de gènes ciblées par les TALE chez le genre <i>Xanthomonas</i>	48
Figure 15. Rôles des TALE dans les maladies et la résistance des plantes.....	48
Figure 16. Distribution des différents pools géniques de <i>P. vulgaris</i>	50
Figure 17. Eléments illustrant une symbiose entre bactéries fixatrices de l'azote et légumineuses	52
Figure 18. Photographie d'un champ de milpa	52
Figure 19. Variation de la taille des graines chez le haricot commun.....	52
Figure 20. Cycle et symptômes de la CBB	58
Figure 21. Distribution mondiale de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> et <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> responsables de la CBB	58
Figure 22. Phylogénie des agents de la CBB	60
Figure 23. Phylogénie des régions répétées ou des séquences RVD des TALE des agents de la CBB.....	68

Chapitre 1

Figure 1. Worldwide distribution and number of strains used in this study	86
Figure 2. Minimum spanning tree (MST) representation of the MLVA clustering.....	88
Figure 3. TALE PCR profiles.	90
Figure 4. Genome-based phylogeny of sequenced strains.	92
Figure 5. Phylogenetic analysis of TALE-encoding genes.	94
Figure 6. RVD sequence clustering based on predicted TALE	96
Figure 7. XfuTAL1 relocalization and pseudogenization events in <i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> and evidence for horizontal transfer among genetic lineages.	98
Figure 8. Top 20 genes with predicted EBEs for the TALE variants found in CBB agents..	100
Figure 9. Detailed view of a 3,800bp region from plasmid A presenting specific features conserved across CBB agents.	102
Supplemental figure 1. Information on (a) VNTRs and (b) MLVA scheme.	107
Supplemental figure 2. Phylogeny of <i>Xanthomonas</i>	108

Chapitre 2

I-Préambule

Figure 1. Gradient de résistance à la CBB chez dix génotypes de haricot commun.....	122
---	-----

II-The transcription repressor *PvOFP7* is a key regulator of common bean defense against common bacterial blight

Fig. 1. CBB symptom reduction observed after induction of three candidate genes.....	130
Fig. 2. Alignment of <i>PvOFP7</i> promoter region in different common bean genotypes.....	132
Fig. 3. Induction of <i>PvOFP7</i> correlates with decreased susceptibility to common bacterial blight.....	135
Fig. 4. <i>PvOFP7</i> induction confers partial resistance to CBB in four additional common bean accessions.	136
Fig. 5 Venn diagrams showing the numbers of repressed (A) or induced (B) DEG after inoculation with dTALEs-carrying strains compared to the EV.....	136
Fig. 6. Enriched functional categories after induction of <i>PvOFP7</i>	138
Supplemental figure 1. Statistics showing the effect of filtering and normalization for RNA-Seq data.	149
Supplemental figure 2. <i>In planta</i> induction of 14 candidate genes using dTALEs.	150

Supplemental figure 3. Screening of 14 candidate genes for CBB symptom reduction.....	151
Supplemental figure 4. Phylogeny of OFPs from <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Phaseolus vulgaris</i>	152
Supplemental figure 5. PvOFP7 expression levels measured by qRT-PCR at 2 dpi in four additional common bean accessions.	153
Supplemental figure 6. Principal Component Analysis (PCA) plot showing the variance of mapped reads between common bean leaves inoculated with the control strains and the strains carrying dTALEs.....	154
Supplemental figure 7. Global impact of PvOFP7 induction on the common bean transcriptome.....	155
Supplemental figure 8. Linear regression between qRT-PCR and RNA-Seq results for in planta PvOFP7 expression levels.	156
Supplemental figure 9. Proportions of differentially expressed genes coding transcription factors (A), transcription regulators (B), other kinases (C), RLK and NLR (D).	158
Supplemental figure 10. MapMan representations of DEGs within pathways related to cell wall precursors (A), the proteasome (B), glycolysis (C) or secondary metabolites (D).	158
Supplemental figure 11. Comparison of PvOFP7 promoter regions of BAT93 and JaloEEP558 visualized using Geneious.....	159

III-Résultats complémentaires

Figure 2. Quantification des dépôts de callose observés sur disques inoculés.	168
Figure 3. Dosage de l'auxine (IAA), de l'acide abysique (ABA), l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA) endogènes après induction de PvOFP7 par les dTALE.....	168
Figure 4. Observation de l'intégrité des cellules de haricot.	170
Figure 5. Dosage de la composition en oses des polysaccharides de la paroi cellulaire du haricot.	170
Figure 6. Mesure de la distribution de la mobilité et la proportion relative d'eau dans les feuilles de haricot commun.	172
Figure 7. Evaluation des symptômes de CBB observés sur gousses après inoculation.	172

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Composition nutritionnelle de différentes céréales et légumineuses à huile ou à grain pour 100 calories.	54
Tableau 2. Liste des 27 QTL de résistance identifiés chez le haricot commun contre la CBB 64	

Chapitre I

Supplemental table 1. Information on the strains used in this study and their VNTR profile	108
Supplemental table 2. Primers used in this study.	109
Supplemental table 3. Whole genome sequence of the <i>Xanthomonas</i> genus data set. The sequences were retrieved from the NCBI database (as of march 28th 2023).	109
Supplemental table 4. Predicted target genes common to different TALE variants.	110
Supplemental table 5. List of longmers specific to CBB agents	110

Chapitre II

II-The transcription repressor *PvOFP7* is a key regulator of common bean defense against common bacterial blight

Supplemental table 1. Description of dTALEs used in this study.	160
Supplemental table 2. RNAseq data after mapping and differential expression analysis....	161
Supplemental table 3. Enriched functional categories upon <i>PvOFP7</i> induction, according to MapMan Wilcoxon test.	161
Supplemental table 4. Lists of DEGs coding NLR, RLK, Transcription factors, Transcription regulators, and other kinases.	161
Supplemental table 5. Genes with similar transcriptional behaviour than in the study by Foucher <i>et al.</i> 2017.	162

Abréviations

bHLH : basic helix loop helix	MAS : marker-assisted selection
bZIP : leucine zipper domain	NLR : nucleotide-binding site leucine-rich repeat
CBB : common bacterial blight	PAMP : pathogen-associated molecular pattern
CNL : coiled-coil NLR	PRR : pattern-recognition receptor
DAMP : damage-associated molecular pattern	PTI : PAMP-triggered immunity
DSF : diffusible signal factor	QTL : quantitative trait locus
dTALE : designer TALE	RLK : receptor-like kinase
EBE : Effector Binding Element	RLP : receptor-like protein
ERF : ethylene response factor	ROS : reactive oxygen species
ET : ethylene	RNL : RPW8-like CC domain NLR
ET3 : effecteur de type 3	RTX : repeat in toxins
ETS : effector-triggered susceptibility	RVD : repeat variable diresidue
ETI : effector-triggered immunity	SA : salicylic acid
GWAS : genome-wide association studies	SST1-6 : système de sécrétion de type 1 à 6
HR : hypersensitive response	TALE : Transcription Activator-Like Effectors
iTALE : interfering TALE	TNL : Toll-Interleukin-1 receptor (TIR)/Resistance protein NLR
JA : jasmonic acid	<i>Xcf</i> : <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>
LRR : leucine-rich repeat	<i>Xoo</i> : <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
LOB : lateral organ boundary	<i>Xpp</i> : <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>
MAMP : microbial-associated molecular pattern	
MAPK : mitogen-activated protein kinase	

Introduction générale

D'ici 2050, la population mondiale humaine devrait dépasser les neuf milliards d'individus (Bongaarts, 2009). Selon la FAO, la production agricole devra augmenter de 60% entre 2005 et 2050 pour répondre aux besoins croissants de cette population en expansion (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Subvenir aux besoins alimentaires mondiaux grandissants constitue un défi majeur à relever. De plus, les bioagresseurs des plantes mettent en péril la sécurité alimentaire mondiale en attaquant les cultures (Oerke, 2006). Les méthodes actuelles de lutte contre ces bioagresseurs s'appuient principalement sur l'usage de pesticides. Cependant, ces produits phytosanitaires ont un impact environnemental considérable (Mahmood *et al.*, 2016). Il est donc nécessaire de développer des méthodes de lutte plus respectueuses de l'environnement. D'autres moyens doivent être ainsi imaginés ou perfectionnés, tels que le biocontrôle ou l'amélioration génétique des plantes. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions plantes-bioagresseurs est cruciale, que ce soit dans un contexte de sensibilité ou de résistance. Cette thèse vise à étudier les interactions entre une légumineuse d'intérêt alimentaire majeur, le haricot commun, et des bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas* responsables de maladies d'incidence mondiale sur cette culture.

Synthèse bibliographique

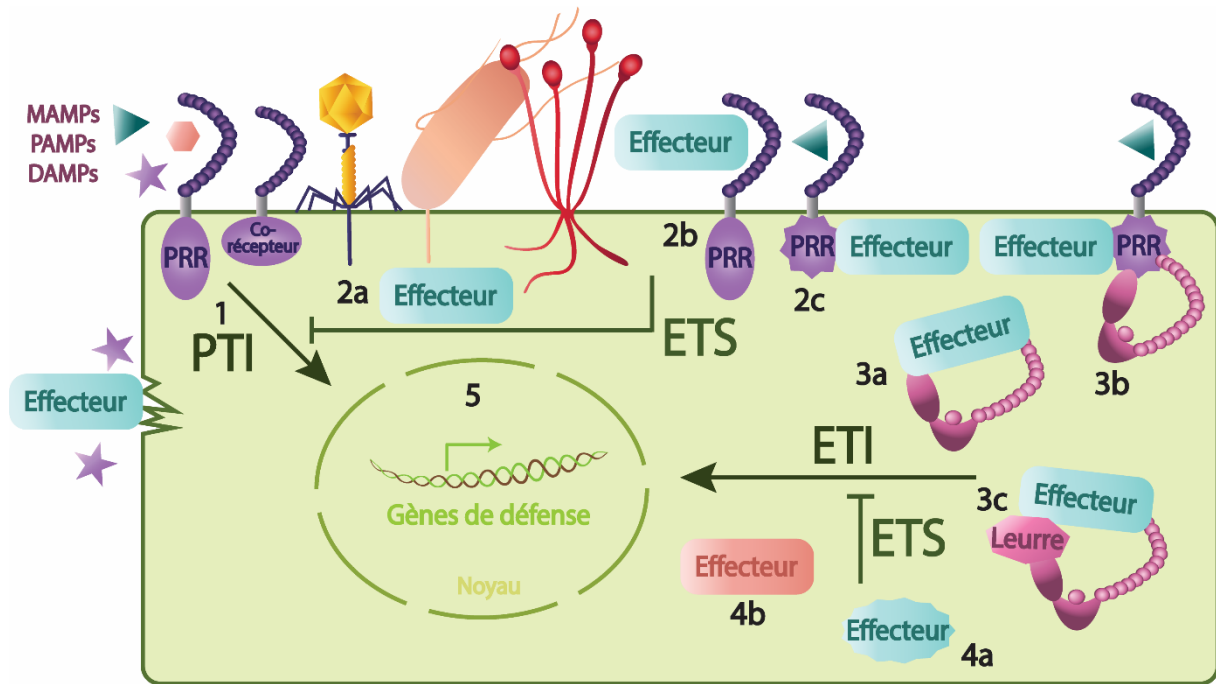


Figure 1. Représentation schématique d'une cellule végétale et de son système immunitaire simplifié (d'après Dangl *et al.*, 2013). Les PAMP, MAMP et DAMP sont reconnus par les PRR, ce qui entraîne la PTI (1). Les bioagresseurs injectent leurs effecteurs dans la cellule (2a) ce qui induit l'ETS en inhibant la reconnaissance par les PRR (2b) ou manipulant les composants de la signalisation des PRR et de la PTI (2c). Les NLR reconnaissent directement les effecteurs (3a) ou la modification d'une cible (3b) ou une protéine leurre structurellement similaire (3c) chez l'hôte, ce qui entraîne l'ETI. Une mutation ou une perte d'effecteur (4a) et de nouveaux effecteurs inhibant l'ETI (4b), induisent une seconde fois l'ETS. L'induction de l'ETI et de la PTI permettent tous les deux l'expression de gènes de défense (5).

I. Les interactions plantes-agents pathogènes

1. La défense passive

Les plantes sont des êtres sessiles en contact constant avec divers organismes. Les végétaux sont protégés des agressions extérieures abiotiques et biotiques par des barrières physiques et chimiques préformées, tel que leur épiderme protégé par une cuticule ainsi qu'une paroi cellulaire primaire et parfois secondaire (Domínguez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017). Cette cuticule constitue une défense passive permettant la protection contre les microorganismes phytopathogènes (bactéries, champignons, oomycètes, virus) et les ravageurs (insectes et acariens phytophages) (Ziv *et al.*, 2018). Les plantes produisent également des métabolites secondaires toxiques pour se prévenir des bioagresseurs, comme les phytoanticipines naturellement présentes en permanence (Lee *et al.*, 2017). La cuticule et la paroi cellulaire végétales ne sont toutefois pas continues et peuvent présenter des blessures, qui constituent autant de sites de pénétration potentiels pour les micro-organismes. Les plantes possèdent un système immunitaire leur permettant de lutter contre les différents bioagresseurs ayant réussi à franchir ces barrières passives. Ce système est composé de deux voies, l'une étant basale et générale (PTI), l'autre étant spécifique de molécules effectrices de certains organismes (ETI) (Figure 1) (Ngou *et al.*, 2022).

2. Le système immunitaire des plantes

a. L'immunité à large spectre

La première voie de l'immunité végétale est responsable de la reconnaissance extracellulaire de motifs moléculaires caractéristiques des microorganismes (MAMP pour microbial-associated molecular patterns ou PAMP pour pathogen-associated molecular patterns), nommée PTI (PAMP-triggered immunity) et correspond à une immunité à large spectre (Figure 1.1) (Cook *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022). Ces motifs moléculaires sont très conservés et constituent un verrou évolutif pour les microorganismes, puisque leur modification engendre souvent une perte de fitness (Cook *et al.*, 2015). La flagelline est un parfait exemple de la difficulté pour les microorganismes à modifier ces motifs. Cette protéine constitutive du flagelle induit des réponses de défenses chez une multitude de plantes, mais est aussi impliquée dans la mobilité flagellaire qui est un facteur important dans la pathogénie des bactéries (Jones & Dangl, 2006; Ngou *et al.*, 2022). La PTI peut également être déclenchée par les damage-associated molecular patterns (DAMP), produits par la

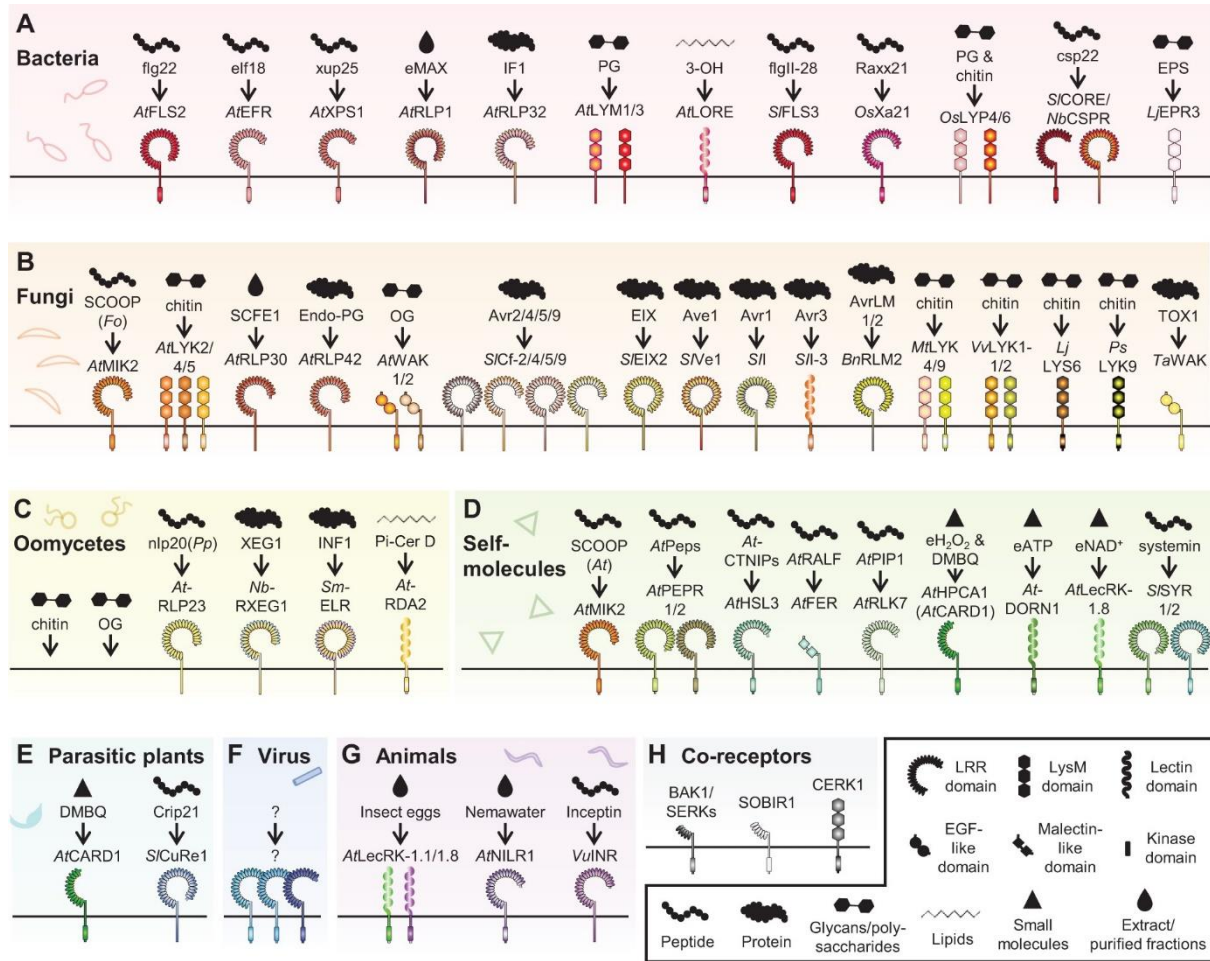


Figure 2. Diversité des PRR impliqués dans l'immunité des plantes (d'après Ngou *et al.*, 2022). PRR caractérisés et les motifs moléculaires qu'ils reconnaissent provenant de (A) bactéries, (B) champignons, (C) oomycètes, (D) molécules végétales, (E) plantes parasites, (F) virus, et (G) animaux. H correspond aux corécepteurs des PRR. Abréviations des espèces végétales : *A. thaliana*, At ; *S. lycopersicum*, Sl ; *O. sativa*, Os ; *N. benthamiana*, Nb ; *L. japonicus*, Lj ; *B. napus*, Bn ; *M. truncatula*, Mt ; *V. vinifera*, Vv ; *L. japonicus*, Lj ; *P. sativum*, Ps ; *T. aestivum*, Ta ; *S. microdontum*, Sm ; *P. japonicum*, Pj ; *V. unguiculata*, Vu. Abréviation des agents pathogènes : *F. oxysporum*, Fo ; *P. parasitica*, Pp.

dégradation de la paroi cellulaire des plantes par les microorganismes et ravageurs (Schuman & Baldwin, 2016; Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022).

Ces différents motifs (MAMP, PAMP et DAMP) sont reconnus par les plantes grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques, les pattern-recognition receptors (PRR), présents à la surface de leurs cellules (Figure 1.1, Figure 2). Les PRR incluent deux types de récepteurs : les receptor-like kinases (RLK) et les receptor-like proteins (RLP). Leurs portions extracellulaires contiennent généralement un domaine à répétitions riches en leucine (LRR), lysine (LysM) ou S-lectine (Figure 2), tandis que leurs portions intracellulaires diffèrent par la présence d'un domaine kinase chez les RLK, non existant chez les RLP, remplacé généralement par la formation d'un complexe avec la protéine adaptatrice SOBIR1 (Dangl *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022). Après liaison avec un MAMP, PAMP ou DAMP, la transduction du signal, typique de la PTI, est véhiculée via le recrutement des co-récepteurs des RLK et RLP tels que BAK1 et CERK1 (Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022).

Cependant, certains bioagresseurs sont capables de contourner la PTI en injectant des protéines effectrices dans la cellule ce qui aboutit à l'effector-triggered susceptibility (ETS) (Figure 1.2a) (Cook *et al.*, 2015; Ngou *et al.*, 2022). Des effecteurs extracellulaires peuvent ainsi inhiber la reconnaissance par les PRR, tandis que des effecteurs intracellulaires manipulent les composants de la signalisation des PRR et de la PTI (Figure 1.2b-c) (Thordal-Christensen, 2020).

b. L'immunité médiée par les effecteurs (ETI)

La seconde voie de défense des plantes, appelée effector-triggered immunity (ETI), est responsable de la reconnaissance spécifique des effecteurs injectés par les bioagresseurs (Figure 1.3) (Cook *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022). Les plantes reconnaissent les effecteurs grâce à des protéines de la famille des nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NLR) cytoplasmiques (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010; Dangl *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2021b). Trois groupes principaux distincts par leur domaine N-terminal constituent cette famille de récepteurs : les coiled-coil NLR (CNL), les Toll-Interleukin-1 receptor/Resistance protein NLR (TNL) et les RPW8-like CC domain NLR (RNL) (Figure 3) (Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022). Ces récepteurs reconnaissent de différentes manières la présence du bioagresseur, soit par interaction directe avec un effecteur ou indirectement, en reconnaissant les modifications que cet effecteur induit sur une protéine cible de l'hôte (Figure 1.3a-c) (Dangl *et al.*, 2013; Ngou *et al.*, 2022).

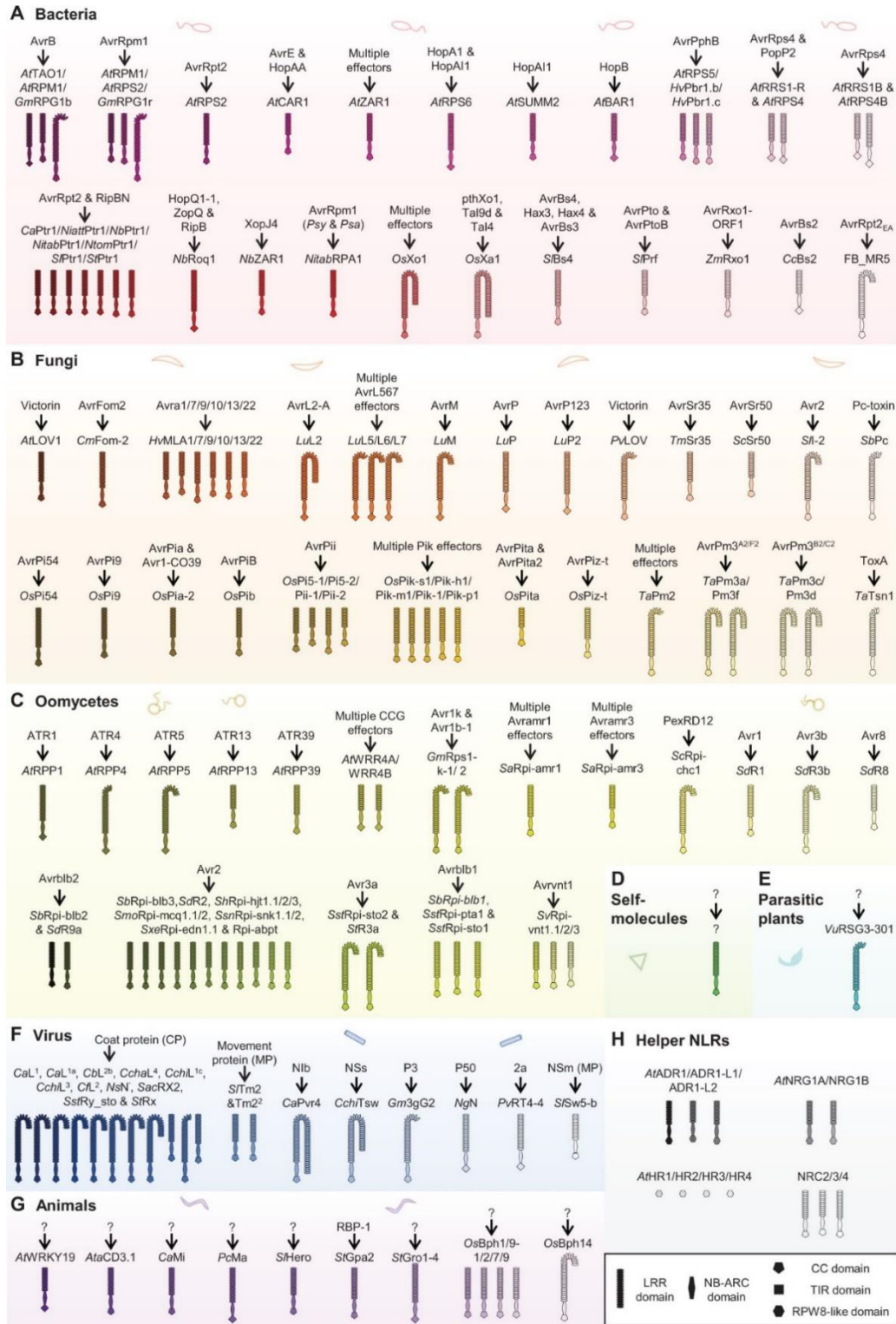


Figure 3. Diversité des NLR impliqués dans l'immunité des plantes (d'après Ngou *et al.*, 2022). NLR caractérisés avec des effecteurs connus de (A) bactéries, (B) champignons, (C) oomycètes, (D) molécules du soi, (E) plantes parasites, (F) virus, (G) animaux, et (H) Helper NLR. Abréviations des espèces végétales : *G. max*, *Gm* ; *H. vulgare*, *Hv* ; *C. annuum*, *Ca* ; *Nicotiana attenuate*, *Niatt* ; *N. tabacum*, *Nitab* ; *Nicotiana tomentosiformis*, *Ntom* ; *S. tuberosum*, *St* ; *Z. mays*, *Zm* ; *C. chacoense*, *Cch* ; *C. melo*, *Cm* ; *L. usitatissimum*, *Lu* ; *P. vulgaris*, *Pv* ; *Triticum monococcum*, *Tm* ; *S. cereale*, *Sc* ; *S. bicolor*, *Sb* ; *S. americanum*, *Sa* ; *S. bulbocastanum*, *Sbu* ; *S. chacoense*, *Sch* ; *S. demissum*, *Sd* ; *Solanum hjertingii*, *Sh* ; *Solanum mochicense*, *Smo* ; *Solanum nigrescens*, *Ssn* ; *Solanum x edinense*, *Sxe* ; *S. stoloniferum*, *Sst* ; *S. venturi*, *Sv* ; *C. baccatum*, *Cb* ; *C. chinense*, *Cchi* ; *C. frutescens*, *Cf* ; *N. sylvestris*, *Ns* ; *S. acaule*, *Sac* ; *N. glutinosa*, *Ng* ; *A. tauschii*, *Ata* ; *P. cerasifera*, *Pc*.

L'interaction indirecte peut être expliquée selon le modèle de garde qui postule que les NLR surveillent des protéines clés dont la perturbation par les effecteurs participe à l'agressivité en absence du NLR correspondant. Or certaines protéines gardées par des NLR ne sont pas impliquées dans la sensibilité ou la résistance de la plante. Ceci a conduit à les considérer comme des leurres, ce qui impliquerait chez la plante une évolution de protéines structurellement similaires aux cibles des effecteurs (Van Der Hoorn & Kamoun, 2008).

Certains agents pathogènes sont cependant capables de contourner l'ETI. Pour cela deux stratégies sont utilisées. L'effecteur reconnu par la plante peut être muté ou perdu, ce qui mène à une perte de reconnaissance (Figure 1.4a) ; ou bien l'ETI peut être inhibée par de nouveaux effecteurs (Figure 1.4b) (Cook *et al.*, 2015; Ngou *et al.*, 2022).

Les deux voies d'immunité des plantes sont constamment éprouvées par les agents phytopathogènes et il s'ensuit une coévolution entre les deux protagonistes. Cette coévolution est ainsi traditionnellement présentée par un modèle en zigzag où PTI, ETI et ETS se succèdent les unes aux autres (Jones & Dangl, 2006).

c. Les réponses de défense

Suite à la perception d'un bioagresseur, la PTI puis l'ETI enclenchent des cascades métaboliques complexes aboutissant à l'expression de gènes de défense et à la mise en place de divers mécanismes qui visent à contrecarrer l'infection (Figure 1.5) (Jones & Dangl, 2006; Dangl *et al.*, 2013). En premier lieu, une variation du flux de calcium va déclencher la réponse immunitaire en transmettant le signal de reconnaissance d'un bioagresseur (Marcec *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2021b). Les cascades de mitogen-activated protein kinase (MAPK) déclenchent ensuite la régulation de l'expression de gènes de défense. Ces gènes peuvent participer à la signalisation des réponses de défenses par les hormones tels que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Pieterse *et al.*, 2012). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) participe également à la signalisation des défenses tout ayant un rôle direct contre l'attaque des bioagresseurs, du fait de la toxicité de ces molécules (Marcec *et al.*, 2019). La production d'autres composés antimicrobiens tels que les phytoalexines permet, en lien avec les ROS, de tuer ou inhiber les bioagresseurs (Jeandet *et al.*, 2013). Enfin, une autre facette des réponses de défense est le renforcement des parois végétales qui comprend notamment des dépôts de composés tels que la callose ou la lignine (Bacete *et al.*, 2018). La réponse au signal de l'ETI est souvent plus intense que pour la PTI et aboutit en général à la réponse hypersensible (HR) qui consiste à sacrifier les cellules proches du point d'infection afin d'étouffer la progression des pathogènes (Dodds & Rathjen, 2010).

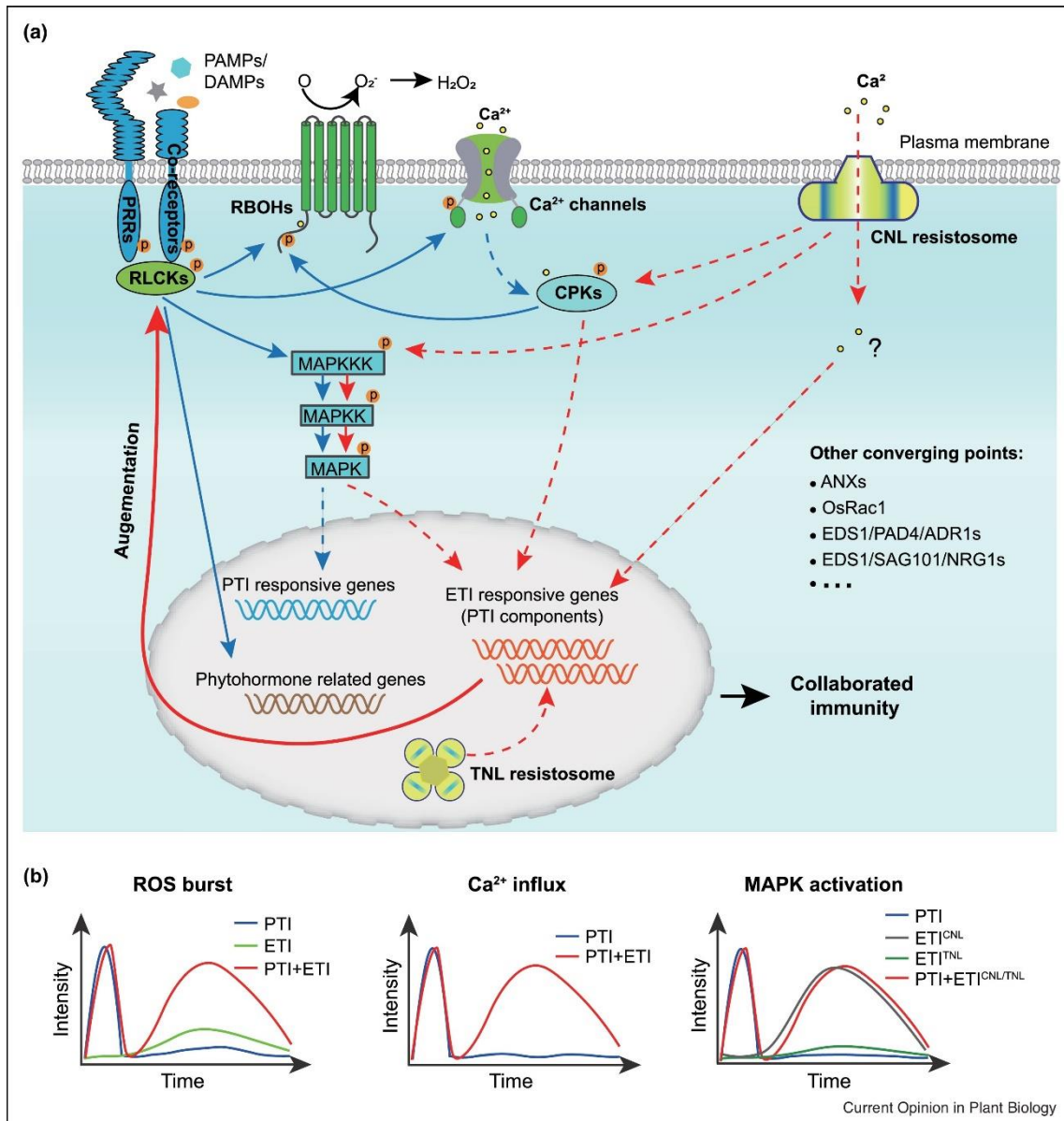


Figure 4. Interconnexion entre la PTI et l'ETI (d'après Yuan *et al.*, 2021). (a) Lors de la reconnaissance des PAMP/DAMP, les PRR recrutent des corécepteurs pour former un complexe et activer les receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK), qui phosphorylent ensuite des composants en aval (par ex : respiratory burst oxidase protein D (RBOHD), CNGC/OSCA1.3, MAPKKK, WRKY). Cela déclenche une explosion de ROS, un afflux de Ca^{2+} , une cascade des MAPK, une production de phytohormones et une reprogrammation de la transcription. Lors de leur activation, les NLR forment des résistosomes qui conduisent à des réponses immunitaires chevauchantes, mais avec une dynamique différente (b) et des amplitudes généralement plus fortes que celles de la PTI. Différents points de convergence entre les voies de la PTI et l'ETI sont également indiqués (par ex : RLCK, CPK et cascade MAPK). Les flèches pleines indiquent les effets directs et les flèches en pointillés les effets indirects. Les points d'interrogation indiquent des mécanismes inconnus. (b) Dynamique et amplitude des réponses immunitaires dans différentes conditions (c'est-à-dire PTI seul, ETI seul ou PTI + ETI). L'axe des abscisses indique le temps écoulé après le traitement par des éliciteurs ou l'inoculation d'agents pathogènes pour activer les différents signaux. Le terme "PTI" désigne les réponses à l'application du PAMP seul (PTI) et le terme "ETI" désigne les réponses à l'expression conditionnelle d'effecteurs déclenchant l'ETI dans des plantes transgéniques. PTI + ETI réfèrent aux réponses à l'application/expression de PAMP et d'effecteurs déclenchant l'ETI ou à l'inoculation de pathogènes avirulents sur les plantes.

d. PTI et ETI, des voies interconnectées

Bien que la PTI et l'ETI aient été initialement décrites comme des voies distinctes, des travaux récents suggèrent qu'elles sont intimement liées en termes de transduction du signal et de réponses de défenses (Yuan *et al.*, 2021b; Ngou *et al.*, 2022). En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, l'activation de l'ETI en absence de la PTI n'est pas suffisante pour aboutir à une résistance efficace à *Pseudomonas syringae* (Ngou *et al.*, 2021). Une étude complémentaire montre que la PTI est nécessaire pour l'induction d'une résistance à *P. syringae* médiée par des NLR (Yuan *et al.*, 2021a). Le processus d'ETI semble ainsi inclure différents acteurs de la PTI, et vice versa (Figure 4). Par exemple, la transcription et l'accumulation de co-récepteurs des PRR, tels que BAK1 et SOBIR1, sont induites par l'ETI chez *A. thaliana* (Ngou *et al.*, 2021). Une autre étude révèle que l'activation de la signalisation par les TNL est importante afin de booster la défense des plantes lors de la PTI (Tian *et al.*, 2021). Les NLR ont d'ailleurs souvent un rôle de gardien des composants de la signalisation liée aux PRR, ces derniers étant une cible privilégiée des effecteurs (Ngou *et al.*, 2022). La PTI et l'ETI ne représenteraient donc pas deux niveaux distincts du système immunitaire mais des acteurs interconnectés dont la complexité reste encore à explorer.

II. Rôle des parois cellulaires végétales dans les interactions entre *Xanthomonas* et plantes hôtes

1. Contexte général

Les parois cellulaires des plantes jouent un rôle primordial dans la défense contre les agents pathogènes, à la fois en tant que barrière passive et active. La cuticule, les parois cellulaires ainsi que les métabolites secondaires constituent des barrières physiques et chimiques préformées (Lee *et al.*, 2017). La paroi cellulaire exerce également la fonction de système de surveillance et représente un réservoir potentiel de nutriments pour les agents pathogènes (Bellincampi *et al.*, 2014; Bacete *et al.*, 2018). Une stratégie de défense face à l'attaque d'un agent pathogène repéré est le renforcement de la paroi par des dépôts de divers composés pariétaux (Underwood, 2012; Houston *et al.*, 2016). La paroi des plantes représente donc un point stratégique dans l'interaction plante-agent pathogène (Hückelhoven, 2007; Hématy *et al.*, 2009; Houston *et al.*, 2016).

Les *Xanthomonas* sont un genre de Protéobactéries, à Gram négatif strictement aérobies. Elles sont connues pour être presque systématiquement associées aux plantes (Hayward, 1993; Jacques *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). En effet ce genre est principalement composé d'agents phytopathogènes capables de causer des maladies sur plus de 400 espèces de végétaux (Rudolph, 1993; Jacques *et al.*, 2016). Une partie du cycle de vie de ces bactéries a lieu en surface des plantes, c'est-à-dire de manière épiphyte. Elles utilisent différentes portes d'entrée (stomates, hydathodes, blessures, ...) pour envahir les tissus des plantes (mésophylle, système vasculaire) (Jacques *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). Leur cycle de vie ainsi que leur diversité d'hôtes font des *Xanthomonas* un modèle particulièrement intéressant dans l'étude des interactions avec la paroi cellulaire des plantes.

Dans la littérature de nombreux travaux montrent l'implication de la paroi cellulaire des plantes dans la résistance ou dans la sensibilité aux *Xanthomonas*. Une analyse transcriptomique par RNAseq précédemment réalisée dans mon laboratoire d'accueil suggère que des modifications de la paroi cellulaire seraient impliquées dans la réponse à l'infection par les *Xanthomonas* responsables de la graisse commune du haricot (Foucher *et al.*, 2020). Afin de faire un état des lieux du rôle de la paroi cellulaire végétale dans l'interaction entre les plantes et les *Xanthomonas*, j'ai proposé la rédaction d'une revue sur le sujet et j'en suis la première auteure.

2. Guardians or gateways? The intricate relationship between plant cell walls and *Xanthomonas*

Charlotte GAUDIN¹, Marie-Agnès JACQUES¹, Nicolas W.G. CHEN¹.

¹Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

ABSTRACT

Plants, as sessile organisms, face constant attacks from pests and pathogens. Therefore, they have evolved sophisticated defence mechanisms to prevent infection, and it all begins with the cell wall (CW). Plants cell wall integrity (CWI) is closely linked to plant immunity, serving not only as a physical barrier but also as a sophisticated monitoring and signalling system. The *Xanthomonas* genus encompasses a large diversity of plant-pathogenic bacteria that, together, can infect a wide range of more than 400 plant species including monocots or dicots. Remarkably, *Xanthomonas* species are subdivided in highly specialized pathovars infecting a narrow range of plants species and/or tissues, each possessing distinct CW structure and composition. This diversity makes *Xanthomonas* a perfect case for studying interactions of bacterial pathogens with the plant CW. Here, we propose an overview of the intricate interactions between *Xanthomonas* and the plant CW. We explore how CW degradation not only facilitates bacterial penetration into plant tissues and access to nutrients, but also functions as a signalling mechanism, priming the bacterium for the forthcoming invasion of the host. The CW stands as a key battleground in the war between *Xanthomonas* and plants, spanning functions of resistance and susceptibility that are both influenced by the different lifestyles *Xanthomonas* employ to infect their many hosts.

INTRODUCTION

The plant cell wall (CW) is a network of polysaccharides, which participates in the shape and structuration of plant tissues and organs and constitutes the interface between plant cells and their environment (Albersheim *et al.*, 2010; Anderson & Kieber, 2020; Wolf, 2022). At the same time, it is a dynamic structure playing important roles during plant cell expansion and division, water movements, cell-to-cell communication, or against pests and pathogens (Cosgrove, 2005 ; Houston *et al.*, 2016). It has been extensively documented that, during infection by microbial pathogens, the CW represents a strategic point for both the attacker and

the defender (Hückelhoven, 2007; Hématy *et al.*, 2009; Houston *et al.*, 2016). Indeed, together with the external cuticle, the CW is the first layer of plant defences against pathogen invasion, acting both as a physical barrier and as a monitoring system (Bacete *et al.*, 2018 ; Houston *et al.*, 2016 ; Underwood, 2012). On the other hand, the CW can be degraded by pathogens in order to access nutrients and promote infection (Bellincampi *et al.*, 2014).

Structure and composition of the plant cell wall

The ability of the CW to serve as a physical barrier against microbial invasion primarily relies on its molecular composition and structure (Anderson & Kieber, 2020). Indeed, all plant cells, while expanding, surround themselves with a primary CW consisting of cellulose microfibrils cemented by a matrix of complex polysaccharides including hemicelluloses (e.g. xyloglucan, arabinoxylan) and pectins (e.g. rhamnogalacturonans, homogalacturonan, xylogalacturonan), as well as few structural proteins (Cosgrove, 2005). These polymers bind together to form a strong yet flexible network participating in cell expansion and presenting more or less porosity according to development stages and tissue nature. In tissues requiring structural reinforcement, some cell types form a secondary CW, which is much more rigid and immutable than the primary CW (Meents *et al.*, 2018). The secondary CW is characterised by higher cellulose content (~60%) than in primary CW (~25%) together with a higher degree of crystallinity and polymerization (McNeil *et al.*, 1984). This is the case of xylem vessels, which present a specifically rigid and impermeable secondary CW to ensure their vascular function (Pesquet *et al.*, 2011). Even higher degree of rigidification and strength can be achieved through depositions of lignin within secondary CWs, which is particularly observed in woody species (Marjamaa *et al.*, 2009; Vanholme *et al.*, 2010). The secondary CW is usually synthesized after the primary CW. It is therefore located closer to the plasma membrane and acts as an ultimate barrier to prevent microorganisms from reaching plant cells.

Cell wall degradation: a necessary step for pathogens

To get nutrients from their host plants, pathogens need to access the cell content, which involves degrading the CW (Walton, 1994; Cantu *et al.*, 2008a; Bellincampi *et al.*, 2014). This is the case for all pathogens, whether displaying a biotrophic and/or necrotrophic lifestyle, and whether being fungi (Kubicek *et al.*, 2014), oomycetes (Chen *et al.*, 2021a), bacteria (Toth & Birch, 2005), nematodes (Davis *et al.*, 2008) or viruses (Kozieł *et al.*, 2021). The most common strategy for pathogens to deconstruct the CW is through the use of microbial CW-degrading

enzymes (CWDEs). Another strategy consists in manipulating the host to trigger the expression of plant CWDEs, which, in the absence of pathogens, serve for cell wall modifications required during cell division and expansion (Cantu *et al.*, 2008b).

Given the complexity of plant CWs, a large diversity of CWDE families exist, each participating in the deconstruction of either celluloses (e.g. cellulases, glycosidases), hemicelluloses (e.g. xylanases, xyloglucanases, galacturonases, galactosidases, glucuronidases, mannanases), or pectins (e.g. polygalacturonases, polygalacturonate lyases, pectin methylesterases). Globally, CWDEs lead to loosening or degradation of the CW structure and facilitate pathogens progression towards the host cell (Dora *et al.*, 2022).

However, there is a wide diversity in CW composition across plant taxa. For example, dicots and monocots present significant differences in terms of relative abundance of hemicelluloses and pectins (Vogel, 2008). Primary CWs contain a high proportion of xylans and mixed linkage glucans in monocots, while they are mainly composed of pectins, xyloglucans, mannans and structural proteins in dicots. This diversity can influence host preference for pathogens (King *et al.*, 2011), suggesting that the plant CW composition could be important for host specificity. Similarly, variations in the CW composition between different tissues (e.g. xylem vs. mesophyll), may influence different pathogens lifestyles (e.g. vascular vs. non-vascular).

A signalling system: the empire strikes back

The plant ability to monitor CW integrity (CWI) and perceive pathogen-driven CW modifications has been well-covered in various reviews (Bacete *et al.*, 2017 ; Lorrai & Ferrari, 2021; Swaminathan *et al.*, 2022). Pattern recognition receptors (PRRs) are transmembrane proteins with an extracellular domain able to detect either conserved molecules from pathogens, referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Peng *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2021) or degradation products of CWDEs, damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Swaminathan *et al.*, 2022). DAMPs are usually produced by CWDEs and include pectin-derived oligogalacturonides (OGs), cellulose-derived oligomers or cutin monomers (Cantu *et al.*, 2008b; Serrano *et al.*, 2014; De Lorenzo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2023). DAMPs are also likely released during plant growth and development as a result of cell wall remodelling, which may occur through microlesions caused for example by cell expansion (De Lorenzo *et al.*, 2019; Pontiggia *et al.*, 2020). Furthermore, CW deformation and membrane stretching can be sensed

as signals through osmo-receptors and trigger similar defence responses than DAMPs (Hamann, 2012; Bacete *et al.*, 2018; Lorrai & Ferrari, 2021). Therefore, the CW serves as a sophisticated sensor, detecting various stimuli and orchestrating plant defence responses. Different signals are then implemented, encompassing reactive oxygen species, Ca^{2+} flux, mitogen-activated kinases (MAPK) cascades and phytohormones signalling (Hématy *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2021).

Following detection, the immune response ultimately leads to active counterattack by the plant, including production of antimicrobial compounds such as phytoalexins, stomatal closure, and CW reinforcement through callose and lignin biosynthesis. In particular, callose biosynthesis, is a mechanism that locally reinforces the CW as a physical barrier against pathogens (Ellinger & Voigt, 2014). During defence responses, callose synthesis is carried out by enzymes from the callose synthase family, which lead to callose deposition between the plasma membrane and the CW at the site of pathogen attack (Wang *et al.*, 2021). While the precise impact of callose on plant CW physico-mechanical characteristics remains unclear, studies suggest that callose could increase the resilience of cellulosic materials to large deformations, act as a sealant or serve as a matrix for the deposition of other cell wall components (Eggert *et al.*, 2014; Abou-Saleh *et al.*, 2018). Another important CW reinforcement restricting pathogen progression consists in lignin deposition (Lee *et al.*, 2019). Lignin is composed of monolignol blocks synthesized starting from phenylalanine via numerous enzymes from the phenylpropanoid pathway (Vanholme *et al.*, 2010). Monolignols are then excreted into the apoplast, where they are oxidatively polymerized to lignin by the action of laccases and peroxidases (Lee *et al.*, 2013). Lignification leads to CW rigidification, which restricts pathogen progression (Lee *et al.*, 2019). Therefore, plant CW serves as a versatile sentinel, detecting a range of signals and orchestrating intricate defence responses. This dynamic interaction highlights its pivotal role in plant immunity.

THE MEETING BETWEEN *XANTHOMONAS* AND PLANT CELL WALLS: A BATTLEFIELD

Different *Xanthomonas* life styles

The *Xanthomonas* genus groups Gram-negative rod-shaped obligate aerobe bacteria that are plant-associated. At the genus level, these bacteria are responsible for diseases in nearly 400 plant species, including at least 124 monocots and 268 dicots, among which most cultivated plants such as rice, pepper, tomato, cabbage, legumes, cotton, and woody species such as citrus

and walnut (Hayward, 1993; Jacques *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). *Xanthomonas* species are subdivided into pathovars, which are subspecific groups of strains responsible for identical diseases characterized by the same symptomatology and tissue specificity on the same host range (Young *et al.*, 1978). Altogether the *Xanthomonas* cause a large array of symptoms including water-soaked spots on leaves, dieback, wilt, hypertrophy, rot, hyperplasia and cankers (Rudolph, 1993; Jacques *et al.*, 2016). This diversity of symptoms reflects different life cycles for *Xanthomonas*. Indeed, while some infection steps are commonly shared by most *Xanthomonas* species, important differences are observed at the pathovar level depending on the host and the infected plant tissues (Jacques *et al.*, 2016).

In most cases, infection of aerial plant organs starts with an epiphytic phase, where bacteria attach themselves to the plant external surface using their own surface polysaccharides, adhesion proteins and type IV pilus, followed by biofilm formation (Jacques *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). Then bacteria enter through wounds or natural openings such as stomata, hydathodes, lenticels and nectaries leading to two distinct types of colonization (Jacques *et al.*, 2016). Indeed, some pathovars enter preferentially through stomata or wounds leading to invasion of the mesophyll, while others enter through hydathodes or wounds leading to invasion of the xylem. For example, within *X. oryzae* a pathogen of rice, two pathovars have been described based on differential tissue specificity (Niño-Liu *et al.*, 2006). *X. oryzae* pv. *oryzicola* infects only the mesophyll of rice leaves, while *X. oryzae* pv. *oryzae* colonize the xylem vessels leading to vascular leaf blight. Moreover, a few pathovars, such as *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* or *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, are able of both colonising the mesophyll and the vascular elements (Chen *et al.*, 2021b; Mijatovic *et al.*, 2021).

In addition to aerial attacks, which mostly correspond to secondary spreads, a key step for the life cycle of most pathogenic *Xanthomonas* is their ability to infect seeds, enabling transmission to next-generation seedlings (Rudolph, 1993; Roberts *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2020). This may also require specific interactions with the CW because seeds present specific CW composition with high content of storage polysaccharides (Meier & Reid, 1982; Buckeridge *et al.*, 2000; Buckeridge, 2010; Sechet *et al.*, 2018), which are then mobilized during germination and early seedling development (Parker, 1984). *Xanthomonas* seed transmission was mostly investigated in common bean (Zaumeyer, 1930; Darsonval *et al.*, 2008), where transmission to seeds involves invasion of both vessels and seed coat parenchyma (Darrasse *et al.*, 2018). Seed-to-seedling transmission can also lead to systemic spread through vascular tissues, as it was shown in cotton (Mijatovic *et al.*, 2021), showing that seed-

transmitted *Xanthomonas* are able to colonize different tissues with different CW composition across their life cycle.

Breaking the plant cell wall

The degradation of the plant CW plays a key role during *Xanthomonas* infection. Indeed, pathogenic *Xanthomonas* bacteria use a repertoire of CWDEs secreted via the *xps* type 2 secretion system (T2SS), including cellulases, xylanases, pectinases, and esterases (Wang *et al.*, 2008; Vandroemme *et al.*, 2013; Tayi *et al.*, 2016a,b). For example, the capacity of the citrus canker agent *X. citri* pv. *citri* (*Xcc*) to hydrolyse cellulose is closely linked to its T2SS, which contributes to the infection process (Baptista *et al.*, 2010).

CWDEs from rice bacterial leaf blight agent *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) have been extensively studied for their role in virulence and aggressiveness (Tayi *et al.*, 2016b,a, 2018). For instance, *eglXoB* encodes an endo-1,4- β -D-glucanase that hydrolyses cellulose and is essential for *Xoo* virulence and *in planta* growth (Hu *et al.*, 2007). Additional enzymes such as the cellulase ClsA, the cellobiosidase CbsA and the esterase LipA also play a pivotal role in the virulence of *Xoo* (Rajeshwari *et al.*, 2005; Jha *et al.*, 2007). ClsA is a cellulase that seems to have both an exo- and an endoglucanase activity (Jha *et al.*, 2007). LipA might cleave alkyl ester cross-links within polysaccharide chains of the lignin, making it accessible for other degrading enzymes (Aparna *et al.*, 2009). While the exact function of LipA remains to be proven, its importance is emphasized by its high conservation across *Xanthomonas* genus (Aparna *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2017). CbsA hydrolyses glycosidic bonds (Nathawat *et al.*, 2022). CbsA, with its exoglucanase activity, might possibly perform processive hydrolysis of crystalline cellulose (Kumar *et al.*, 2012; Tayi *et al.*, 2018). CbsA enzymatic activity seems essential for efficient hydrolysis of host cell walls during *Xoo* growth within rice xylem vessels (Tayi *et al.*, 2018).

The xylanase XynB is another important *Xoo* virulence factor that degrades xylan, a major component of the hemicellulose complex in plant CWs (Rajeshwari *et al.*, 2005). *Xcc* also harbours XynB, which performs the same role as in *Xoo* (Rajeshwari *et al.*, 2005; Ramos Santos *et al.*, 2014). In addition to XynB, *Xcc* also possesses XynA, an enzyme initially predicted as an endo- β -1,4-xylanase, which turns out to be a rare reducing end xylose-releasing

exo-oligoxyylanase (Ramos Santos *et al.*, 2014). In fact, XynB breaks down xylan while XynA further degrades XynB-derived xylooligosaccharides into xylose units (Ramos Santos *et al.*, 2014). It was proposed that while XynB might cleave the CW to ease nutrients access and bacterial type 3 effectors translocation, XynA could contribute to the inhibition of oligosaccharide-induced immune responses (Ramos Santos *et al.*, 2014). The loss of extracellular endoglucanases in *Xcc* mutants delays the onset of canker symptoms, which mirrors T2SS mutant phenotype and underlines the importance of these enzymes in the course of infection (Xia *et al.*, 2016). One of these endoglucanases, BglC3, is required for full virulence of *Xcc* (Xia *et al.*, 2016). In addition, comparative genomics between *Xcc* and *X. arboricola* pv. *pruni*, and the latest being pathogenic on *Prunus* spp., showed that both pathovars bear very different repertoires of CWDEs (Garita-Cambronero *et al.*, 2019), further illustrating that CW degradation are important components of host specificity in *Xanthomonas*.

Xanthomonas also seem to use DAMPs as signals for the regulation of the expression of certain genes. Indeed, in *X. campestris* pv. *campestris*, a Brassicaceae pathogen, genes from the xylan CUT system (carbohydrate utilization with TonB-dependent outer membrane transporter), used in parts for nutrient uptake, are strongly induced by short xylo-oligosaccharides and, to a lesser extent, xylose (Déjean *et al.*, 2013; Ramos Santos *et al.*, 2014). A large proportion of these genes are repressed by XylR LacI-type repressor (Déjean *et al.*, 2013). In *Xoo*, *XylR* is inactivated in presence of xylose, which leads to enhanced xylan and xylose utilization, as well as increased expression of *hrp* genes involved in T3SS (Ikawa *et al.*, 2018). Through the use of CWDEs and the associated DAMPs they generate, *Xanthomonas* not only find entry into the plant and nutrition sources but also as utilize them as signals for prepping for host invasion.

Resisting invasion by maintaining cell wall integrity

There is compelling evidence implicating the CW in plant resistance to *Xanthomonas*. A first illustration comes from the use of CWDE inhibitors, which help maintaining CWI during defence responses. For instance, in pepper, treatment with salicylic acid strongly induces *CaPMEI1*, a gene coding a pectin methylesterase inhibiting enzyme, whose silencing leads to increased susceptibility to *Xanthomonas* (An *et al.*, 2008). Similarly in rice, the polygalacturonase-inhibiting protein OsPGIP1 contributes to resistance against *Xoc* and when overexpressed in the plant, leads to the expression of CW-associated genes and several MYB transcription factor genes (Wu *et al.*, 2019).

Another way to boost CWI is to reinforce or repair the CW by enhancing cellulose synthesis. For instance, the rice *Xa4* gene confers disease resistance to *Xoo* by encoding a CW-associated kinase that strengthens the CW by promoting cellulose synthesis and suppressing CW loosening, which contributes to enhanced resistance (Hu *et al.*, 2017). CW reinforcements during infection can be orchestrated by several transcription factor families linked to resistance such as WRKY and MYB. For example, *OsMYB63*-overexpressing and *OsWRKY53* knockout rice lines, present thickened CWs and higher resistance to *Xoo* (Xie *et al.*, 2021). Indeed, *OsMYB63* promotes the overexpression of three secondary CW-related cellulose synthase genes, thus boosting cellulose accumulation and resulting in thickened sclerenchyma CW. Conversely, *OsWRKY53* is upregulated during *Xoo* infection and increases disease rice susceptibility to *Xoo* by suppressing the expression of *OsMYB63* (Xie *et al.*, 2021). These studies show that resistance to *Xanthomonas* correlates with cell-wall thickening and synthesis of cellulose.

Callose and lignin deposits: another brick in the wall

As shown for plant resistance to various pathogens, resistance to *Xanthomonas* usually involves callose and/or lignin deposits. In lemon (*Citrus x limon* L.), RNAi knockdown of a gene encoding a callose synthase leads to an enhanced susceptibility to *Xcc*, indicating a significant role of callose biosynthesis for resistance (Enrique *et al.*, 2011). In rice, *OsWRKY42* leads to increased callose deposition and reduced CW damage, though it does not enhance tolerance to *Xoo* (Pillai *et al.*, 2018). The importance of callose deposition is also exemplified by inhibition of callose biosynthesis by *Xanthomonas* during compatible interaction. For example, *X. campestris* pv. *campestris* suppresses callose deposition in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* through the production of the exopolysaccharide xanthan (Yun *et al.*, 2006). Similarly, *X. campestris* pv. *campestris* virulence factor cyclic β -(1,2)-Glucan is excreted by the bacteria during infection and suppresses callose deposits and PR1 expression in *N. benthamiana* (Rigano *et al.*, 2007). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* has also the capacity to suppress callose papilla deposition in pepper (Brown *et al.*, 1995).

Lignin deposition also seems to play an important role in plant resistance to *Xanthomonas*. Indeed, resistance of cassava to *X. phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) revealed a twofold increase in CW-bound peroxidase activity, with production of phenolic compounds, possibly related to lignin deposition. In addition, *Xcm* has been shown to trigger vascular

defence responses in both resistant and susceptible cassava, but with higher intensity in resistant plants (Kpémoua *et al.*, 1996). Resistance was associated with enhanced lignification and suberization of the phloem, and callose deposition, while pectin and/or lignin were produced to plug the xylem. Phenol-like molecules secreted by tyloses and hyperplastic activity of phloem cells were only observed in the resistant cultivar (Kpémoua *et al.*, 1996). In rice, resistance to *Xoo* mediated by both *Xa21* and *Xa10* is associated with lignin accumulation, and *Xa21* is additionally linked to cellulose deposition (Reimers & Leach, 1991; Shamsunnaher *et al.*, 2020).

Interplay between suppression of defences and cell wall degradation

Plant resistance can be bypassed, in part, by the action of bacterial Type III effectors (T3E), which are secreted in the host cell via a T3SS (White *et al.*, 2009). T3E production and function appears to be tightly linked to CW degradation and/or CW-based defences. For example, XopJ is a T3E from *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) that targets the plasma membrane of host cells and inhibits cell wall-based defences in *Solanaceous* plants (Bartetzko *et al.*, 2009). Similarly, XopB from *Xcv* interferes with cell wall-bound invertase to suppress sugar-enhanced defence responses (Sonnewald *et al.*, 2012). In rice, the action of bacterial CWDEs ClsA, CbsA and Xyn, plays a critical role in inducing defence responses during infection by *Xoo* (Tayi *et al.*, 2016b). These three enzymes possibly lead to the production of soluble DAMPs, leading to induction of innate immunity, which is then suppressed by T3Es produced by *Xoo* (Jha *et al.*, 2007). Similarly, XopN, XopQ, XopX and XopZ are T3Es from *Xoo* that are capable of suppressing rice innate immune responses induced by the bacterial esterase LipA (Sinha *et al.*, 2013).

The intricate relationship between *Xanthomonas* T3SS and plant CW degradation can also be exemplified by the regulatory network existing between these two processes. Recent work in citrus demonstrated that xyloglucan degradation products are imported via TonB-dependent transporters into *Xcc* cells, where they are further depolymerized in galactose, which in turn triggers the expression of the T3SS system via the master regulator HrpX (Vieira *et al.*, 2021). In *Xcc*, inactivation of the xylose isomerase XylA leads to xylose accumulation, slowing bacterial growth *in vitro*, but enhancing *Xcc* virulence *in vivo* (Alexandrino *et al.*, 2023). This suggests that xylose could function as a signal for the bacteria to prepare for host

invasion. In *Xcv*, the expression of T2SS genes is activated by HrpX and HrpG, two master regulators of the T3SS (Szczesny *et al.*, 2010). Moreover, the T2SS contributes to both promoting disease through CWDE secretion and by helping the translocation of T3Es into the plant cell (Szczesny 2010). Therefore, breaking plant barriers by using CWDEs appears to serve a dual purpose for *Xanthomonas*. Indeed, it not only aids bacteria to progress into the plant tissues by dismantling the CWs and freeing new sources of nutrients, but it could also pave way for the T3SS machinery to access the plant cell and disrupt plant immunity responses. In this regard, CW degradation stands as a pivotal stage for both *Xanthomonas* and plants. This juncture sets the stage for a race against time: while plant defences are set to detect the presence of bacteria through PAMPs and DAMPs, *Xanthomonas* must act swiftly to avoid being spotted by them.

Role of the CW in Xanthomonas tissue specificity

Tissue specificity in *Xanthomonas* is best exemplified by the two rice pathogens, *Xoo* and *Xoc*, which respectively adopt vascular and parenchyma lifestyles (Niño-Liu *et al.*, 2006). Indeed, colonizing vascular or parenchymatic tissues might represent different challenges due to the composition of the xylan-rich, highly fortified dead cell walls in the xylem, compared to the living cells of the parenchyma, rich in proteinaceous compounds (Zou *et al.*, 2012). Although both *Xoo* and *Xoc* can grow within the intercellular spaces between mesophyll cells, only *Xoc* demonstrates the ability to propagate within extracellular spaces, resulting in streak lesions (Cao *et al.*, 2020). In comparison to *Xoo*, *Xoc* shows a greater ability to inflict severe damage to the mesophyll CW and cellulose filter papers (Cao *et al.*, 2020). This suggests that *Xoc* must possess a stronger CW degradation ability in order to effectively rupture the CW junction between mesophyll cells, thus facilitating its spread (Cao *et al.*, 2020). Interestingly, the C-terminal residues of the extracellular protease EcpA, differ in *Xoo* and in *Xoc*, making the protein inactive in *Xoo* (Zou *et al.*, 2012). The mutation of *ecpA* leads to reduced virulence in *Xoc*, but does not impact *Xoo* aggressiveness. Moreover, infiltration of purified EcpA into rice leaves led to similar symptoms than for *Xoc* infection (Zou *et al.*, 2012). The authors hypothesize that EcpA serves as a tissue-specific virulence factor, specific to the protein-rich mesophyll environment. Recent combination of genomics and functional analyses highlighted the cellobiosidase CbsA as a key factor of tissue specificity. Strikingly, heterologous expression of *cbsA* was sufficient to confer vascular pathogenesis to a non-vascular *Xanthomonas*. Analysis of presence/absence and horizontal gene transfers led the authors to hypothesize that

repeated gains and losses of *cbsA* modulated the evolution of vascular versus non-vascular lifestyles (Gluck-Thaler *et al.*, 2020). Tissue specificity also appears to involve specific immune mechanisms from the plant side. In *Arabidopsis*, the MKP1-MAPK cascade has been demonstrated to negatively regulate mesophyll resistance, but positively regulates vascular resistance by activating lignin biosynthesis through the repression of MYB4 transcription factors (Lin *et al.*, 2022). This insight into tissue-defence responses sheds light on how a single signalling cascade can drive distinct immune outcomes against pathogens with varying lifestyles (Lin *et al.*, 2022).

Vascular and non-vascular *Xanthomonas* usually employ distinct points of entry to invade the plant. How these different entry points reflect on plant defences? A classical defence method against mesophilic bacteria is to restrict access to the apoplast by stomata closure and cell death upon pathogen detection (Melotto *et al.*, 2006). Conversely, vascular *Xanthomonas* such as *X. campestris* pv. *campestris* enter preferentially through hydathodes, which are stomata-like pores at the leaf margin, which cannot fully close (Cerutti *et al.*, 2019; Bellenot *et al.*, 2022). Hydathodes excrete xylem sap and the re-uptake of this guttation fluid provides epiphytic bacteria with access to an aqueous extracellular cavity beneath the pores (Cerutti *et al.*, 2017, 2019). In addition, hydathodes constitute a specific tissue with thin, fibrillar cell walls, which display specific immune responses (Paauw *et al.*, 2023). Hydathodes act as gatekeepers displaying specific immune signalling involving BAK1 and EDS1-PAD4-ADR1, and restricting entry to non-vascular pathogens (Paauw *et al.*, 2023). In addition to presenting specific CW morphology, hydathodes can present specific lignification and peroxidase activity to prevent infection by vascular *X. campestris* pv. *campestris* (Gay & Tuzun, 2000). Therefore, cell walls could play a central role of defining *Xanthomonas* tissue specificity, although the molecules involved are yet to be described.

Transcriptomics of Xanthomonas-inoculated plants reveal CW-related genes

Transcriptomic studies highlight differential expression of CW-associated genes upon infection, often with contrasted patterns between resistant and susceptible plants. Dual RNA-Seq in rice plants inoculated by *Xoc* revealed upregulation of genes involved in cell expansion, including expansin genes, suggesting that *Xoc* may exploit this pathway to weaken cell wall strength (Liao *et al.*, 2019). In line with this, infection of susceptible common bean plants by *X. phaseoli* pv. *phaseoli* led to upregulation of genes involved in CW modification such as

expansins and pectate lyases (Foucher *et al.*, 2020). In sweet orange, *Xcc* strongly increased expression of genes encoding cell-wall remodelling enzymes and proteins associated with cell division and expansion (Cernadas *et al.*, 2008). These observations suggest that *Xanthomonas* is able to manipulate the regulation of plant CW by modifying gene families related to cell expansion and CW loosening to promote infection.

By contrast, *X. citri* pv. *aurantifolii* (*Xca*) pathotype C, another pathovar responsible for citrus canker disease, triggers a hypersensitive response (HR) in sweet oranges. *Xca* upregulates genes linked to cell wall cross-linking and lignification like endoglucanase inhibitors or the phenylpropanoid biosynthetic pathway (Cernadas *et al.*, 2008). *Xca* also down-regulates different CW-modifying and structural proteins. *Xcc* induces an incompatible response in kumquat, involving downregulation of genes related to CW remodelling and expansion such as endoglucanases, while genes encoding xyloglucan endotransglycosylases or hydrolases, involved in CW reorganization, were upregulated (Khalaf *et al.*, 2011). Similar results were obtained when comparing kumquat (incompatible) to sweet orange (compatible) (Fu *et al.*, 2012). In resistant rice varieties, recognition of the lipopolysaccharide (LPS) from *Xoo* led to the upregulation of genes involved in lignins biosynthesis and CW organization in rice leaves (Girija *et al.*, 2017). Rice *Xa23*-mediated resistance to *Xoo* involved upregulation of peroxidase and CW-related genes (Wang *et al.*, 2019). Rice responses to flagellin stimulation revealed an upregulation of genes involved in the CW precursor synthesis, degradation and modification (Yu *et al.*, 2014).

Transcription activator-like effectors: transcriptomic hijack at the plant cell wall

Transcription activator-like effectors (TALE) are T3Es specialized in hijacking plant transcriptomes by inducing specific target genes (Perez-Quintero & Szurek, 2019). Several TALEs target transcription factors linked to the overexpression of CW remodelling enzymes and contribute to increased symptoms. For instance, in tomato, AvrHah1 from *X. gardneri* induces water-soaked lesions by transcriptionally inducing two bHLH transcription factors, which in turn upregulate two pectin modification genes, a pectate lyase and pectinesterase (Schwartz *et al.*, 2017). These changes suggest that the TALE modifies the plant CW to promote water uptake, thereby enhancing tissue damage (Schwartz *et al.*, 2017). Additionally, AvrBs3 from *Xcv* induces hypertrophy of the mesophyll tissue of pepper by targeting a bHLH transcription factor gene *upa20* (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). This TALE appears to directly or indirectly induce auxin-induced and expansin-like genes, known to contribute to cell enlargement (Marois *et al.*, 2002). In *Citrus* spp., PthA4 and PthAw are TALE from *Xcc*, both

able to induce *CsLOB1*, a Lateral Organ Boundaries (LOB) gene family of transcription factors, promoting pustule symptom formation (Hu *et al.*, 2014). Overexpression of *CsLOB1* is linked to the upregulation of genes associated with cell expansion such as expansins and pectate lyases. In addition, PthA4-mediated infection significantly upregulated cell-wall degradation, modification and division genes (Hu *et al.*, 2016).

Interestingly, upregulation of CW-associated enzymes by *Pth4* seems to play a dual role in kumquat. (Teper *et al.*, 2020). Indeed, when Meiwa kumquat leaves are inoculated with *Xcc*, they initially exhibit symptoms of hypertrophy and hyperplasia in the early stages of the infection, followed by the development of an HR-like phenotype (Teper *et al.*, 2020). When inoculated with a *Xcc pthA4* deletion mutant, kumquat leaves do not display HR-like phenotype and early leaf abscission anymore. Similarly, when the T2SS-*xps* of *Xcc* is mutated, infected kumquat displays delayed HR-like phenotype symptoms and leaf abscission (Teper *et al.*, 2020). However, as *xps* mutant are not able to colonize kumquat to the same extent than the wild-type strain, it is not possible to conclude if the reduction of the plant defence is really due to the loss of the T2SS, or to the fact that pathogen recognition requires a bacterial population threshold that is not reached by *XccΔxps* mutant. Therefore, resistance to kumquat could be explained by a recognition of the CW damage caused by the combined effect of plant and bacterial CWDEs (Teper *et al.*, 2020).

One of the most-studied class of TALE targets are sugar transporters from the *SWEET* family (Chen, 2014; Perez-Quintero & Szurek, 2019; Mondal *et al.*, 2021). In rice, five *SWEET* genes were demonstrated to be targeted by TALEs from *Xoo*, *OsSWEET11*, *OsSWEET12*, *OsSWEET13*, *OsSWEET14* and *OsSWEET15* (Streubel *et al.*, 2013). *OsSWEET14* (also called *Os11N3*) expression is induced by Tal5, TalC, AvrXa7 and PthXo3, which suggest an evolutionary convergence (Antony *et al.*, 2010; Römer *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2013). PthXo1 induces *OsSWEET11* (also called *Os8N3*) (Yang *et al.*, 2006). TAL20 from *X. axonopodis* pv. *manihotis* also targets *MeSWEET10a* in cassava to promote virulence (Cohn *et al.*, 2014). These transmembrane transporters are thought to release sucrose in the apoplast, which would favor *Xanthomonas* proliferation. However, to reach the apoplast sucrose molecules have to cross the cell wall after the plant cell membrane (Paiva, 2016; Dora *et al.*, 2022), a process has been so far underestimated and poorly described in TALE-induced susceptibility.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Many examples underscore the important role of the plant CW in the intricate interplay between *Xanthomonas* and plants. Nevertheless, it appears that the significance of this interaction remains somewhat overlooked, considering that this is the first comprehensive review on the subject and that dedicated research papers are not numerous. A more thorough exploration of the interplay between *Xanthomonas* and the plant cell wall during both susceptible and resistant interactions holds the potential to unveil novel avenues for combating *Xanthomonas* infections.

REFERENCES

- Abou-Saleh RH, Hernandez-Gomez MC, Amsbury S, Paniagua C, Bourdon M, Miyashima S, Helariutta Y, Fuller M, Budtova T, Connell SD, et al. 2018.** Interactions between callose and cellulose revealed through the analysis of biopolymer mixtures. *Nature Communications* **9**.
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A. 2010.** *Plant cell walls*.
- Alexandrino AV, Prieto EL, Nicolela NCS, da Silva Marin TG, Dos Santos TA, de Oliveira da Silva JPM, da Cunha AF, Behlau F, Novo-Mansur MTM. 2023.** Xylose Isomerase Depletion Enhances Virulence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in *Citrus aurantifolia*. *International journal of molecular sciences* **24**.
- An SQ, Potnis N, Dow M, Vorhölter FJ, He YQ, 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* **44**: 1–32.
- An SH, Sohn KH, Choi HW, Hwang IS, Lee SC, Hwang BK. 2008.** Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta* **228**: 61–78.
- Anderson CT, Kieber JJ. 2020.** Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. *Annual Review of Plant Biology* **71**: 39–69.
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. 2010.** Rice xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene Os-11N3. *the Plant Cell Online* **22**: 3864–3876.
- Aparna G, Chatterjee A, Sonti R V., Sankaranarayanan R. 2009.** A cell wall-degrading esterase of *xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. *Plant Cell* **21**: 1860–1873.
- Arias SL, Block CC, Mayfield DA, Santillana G, Stulberg MJ, Broders KD, Jackson-Ziems TA, Munkvold GP. 2020.** Occurrence in seeds and potential seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in maize in the United States. *Phytopathology* **110**: 1139–1146.
- Assis RDAB, Polloni LC, Patané JSL, Thakur S, Felestrino ÉB, Diaz-Caballero J, Digiampietri LA, Goulart LR, Almeida NF, Nascimento R, et al. 2017.** Identification and analysis of seven effector protein families with different adaptive and evolutionary histories in

plant-associated members of the Xanthomonadaceae. *Scientific Reports* **7**: 1–17.

Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* **93**: 614–636.

Baptista JC, Machado MA, Homem RA, Torres PS, Vojnov AA, Do Amaral AM. 2010. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genetics and Molecular Biology* **33**: 146–153.

Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Börnke F. 2009. The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **22**: 655–664.

Bellenot C, Routaboul JM, Laufs P, Noël LD. 2022. Hydathodes. *Current Biology* **32**: R763–R764.

Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–8.

Brown I, Mansfield J, Bonas U. 1995. hrp Genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Determine Ability to Suppress Papilla Deposition in Pepper Mesophyll Cells. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **8**: 825–836.

Buckeridge MS. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* **154**: 1017–1023.

Buckeridge MS, Dietrich SMC, de Lima DU. 2000. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *Developments in Crop Science* **26**: 283–316.

Cantu D, Vicente AR, Greve LC, Dewey FM, Bennett AB, Labavitch JM, Powell ALT. 2008a. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 859–864.

Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB, Powell ALT. 2008b. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science* **13**: 610–617.

Cao J, Chu C, Zhang M, He L, Qin L, Li X, Yuan M. 2020. Different Cell Wall-Degradation Ability Leads to Tissue-Specificity between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. : 1–11.

Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE. 2008. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology* **9**: 609–631.

Cerutti A, Jauneau A, Auriac MC, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R, Noël LD. 2017. Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiology* **174**: 700–716.

Cerutti A, Jauneau A, Laufs P, Leonhardt N, Schattat MH, Berthomé R, Routaboul JM, Noediel LD. 2019. Mangroves in the Leaves: Anatomy, Physiology, and Immunity of Epithelial Hydathodes. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 91–116.

Chen LQ. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist* **201**: 1150–1155.

- Chen J, Chen H, Liu F, Fu ZQ. 2021a.** A war on the cell wall. *Molecular plant* **15**: 219–221.
- Chen NWG, Ruh M, Darrasse A, Foucher J, Briand M, Costa J, Studholme DJ, Jacques MA. 2021b.** Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology* **22**: 1464–1480.
- Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou BH, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2014.** Xanthomonas axonopodis virulence is promoted by a transcription activator-like effector - Mediated induction of a SWEET sugar transporter in Cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 1186–1198.
- Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850–861.
- Darrasse A, Barret M, Cesbron S, Compant S, Jacques MA. 2018.** Niches and routes of transmission of Xanthomonas citri pv. fuscans to bean seeds. *Plant and Soil* **422**: 115–128.
- Darsonval A, Darrasse A, Meyer D, Demarty M, Durand K, Bureau C, Manceau C, Jacques MA. 2008.** The type III secretion system of Xanthomonas fuscans subsp. fuscans is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2669–2678.
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, Baum TJ. 2008.** Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 360–366.
- Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, De Bernonville TD, Girard AL, 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 Phytologist* **198**: 899–915.
- Dora S, Terrett OM, Sánchez-Rodríguez C. 2022.** Plant-microbe interactions in the apoplast: Communication at the plant cell wall. *Plant Cell* **34**: 1532–1550.
- Eggert D, Naumann M, Reimer R, Voigt CA. 2014.** Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Scientific Reports* **4**: 1–6.
- Ellinger D, Voigt CA. 2014.** Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: What we have learned within the last decade. *Annals of Botany* **114**: 1349–1358.
- Enrique R, Siciliano F, Favaro MA, Gerhardt N, Roeschlin R, Rigano L, Sendin L, Castagnaro A, Vojnov A, Marano MR. 2011.** Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against Xanthomonas citri subsp. citri. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 394–407.
- Foucher J, Ruh M, Préveaux A, Carrère S, Pelletier S, Briand M, Serre RF, Jacques MA, Chen NWG. 2020.** Common bean resistance to Xanthomonas is associated with upregulation of the salicylic acid pathway and downregulation of photosynthesis (BMC Genomics (2020) 21 (566) DOI: 10.1186/s12864-020-06972-6). *BMC Genomics* **21**: 1–18.
- Fu XZ, Gong XQ, Zhang YX, Wang Y, Liu JH. 2012.** Different transcriptional response to Xanthomonas citri subsp. citri between kumquat and sweet orange with contrasting canker tolerance. *PLoS ONE* **7**.
- Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Ferragud E, Sabuquillo P, Redondo C, Cubero J. 2019.** Xanthomonas citri subsp. Citri and Xanthomonas arboricola pv. Pruni: Comparative

analysis of two pathogens producing similar symptoms in different host plants. *PLoS ONE* **14**.

Gay PA, Tuzun S. 2000. Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot disease in cabbage. *Canadian Journal of Botany* **78**: 1144–1149.

Girija AM, Kinathi BK, Madhavi MB, Ramesh P, Vungarala S, Patel HK, Sonti R V. 2017. Rice leaf transcriptional profiling suggests a functional interplay between *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide in modulation of defense responses during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **30**: 16–27.

Gluck-Thaler E, Cerutti A, Perez-Quintero AL, Butchacas J, Roman-Reyna V, Madhavan VN, Shantharaj D, Merfa M V., 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**: 1–11.

Hamann T. 2012. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–5.

Hayward A. 1993. The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings J, Civerolo E, eds. *Xanthomonas*. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1–119.

Hématy K, Cherk C, Somerville S. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 406–413.

Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A. 2016. The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–18.

Hu K, Cao J, Zhang J, Xia F, Ke Y, Zhang H, Xie W, Liu H, Cui Y, Cao Y, et al. 2017. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nature Plants* **3**.

Hu Y, Duan S, Zhang Y, Shantharaj D, Jones JB, Wang N. 2016. Temporal transcription profiling of sweet orange in response to PthA4-Mediated *xanthomonas citri* subsp. *citri* infection. *Phytopathology* **106**: 442–451.

Hu J, Qian W, He C. 2007. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* eglXoB endoglucanase gene is required for virulence to rice. *FEMS Microbiology Letters* **269**: 273–279.

Hu Y, Zhang J, Jia H, Sosso D, Li T, Frommer WB, Yang B, White FF, Wang N, Jones JB. 2014. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**.

Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.

Ikawa Y, Ohnishi S, Shoji A, Furutani A, Tsuge S. 2018. Concomitant regulation by a LacI-Type transcriptional repressor XylR on genes involved in xylan and xylose metabolism and the type III secretion system in rice pathogen *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 605–613.

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.

- Jha G, Rajeshwari R, Sonti R V. 2007.** Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 31–40.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. 2007.** A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.
- Khalaf AA, Gmitter FG, Conesa A, Dopazo J, Moore GA. 2011.** *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Plant Biology* **11**: 1–17.
- King BC, Waxman KD, Nenni N V., Walker LP, Bergstrom GC, Gibson DM. 2011.** Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for Biofuels* **4**: 1–14.
- Koziel E, Otulak-Koziel K, Bujarski JJ. 2021.** Plant Cell Wall as a Key Player During Resistant and Susceptible Plant-Virus Interactions. *Frontiers in Microbiology* **12**.
- Kpémoua K, Boher B, Nicole M, Calatayud P, Geiger JP. 1996.** Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 1131–1143.
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. 2014.** Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 427–451.
- Kumar S, Haque AS, Jha G, Sonti R V., Sankaranarayanan R. 2012.** Crystallization and preliminary crystallographic studies of CbsA, a secretory exoglucanase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **68**: 1191–1194.
- Lee M, Jeon HS, Kim SH, Chung JH, Roppolo D, Lee H, Cho HJ, Tobimatsu Y, Ralph J, Park OK. 2019.** Lignin-based barrier restricts pathogens to the infection site and confers resistance in plants. *The EMBO Journal* **38**: 1–17.
- Liao ZX, Ni Z, Wei XL, Chen L, Li JY, Yu YH, Jiang W, Jiang B Le, He YQ, Huang S. 2019.** Dual RNA-seq of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* infecting rice reveals novel insights into bacterial-plant interaction. *PLoS ONE* **14**: 1–16.
- Lin H, Wang M, Chen Y, Nomura K, Hui S, Gui J, Zhang X, Wu Y, Liu J, Li Q, et al. 2022.** An MKP-MAPK protein phosphorylation cascade controls vascular immunity in plants. *Science Advances* **8**.
- De Lorenzo G, Ferrari S, Giovannoni M, Mattei B, Cervone F. 2019.** Cell wall traits that influence plant development, immunity, and bioconversion. *Plant Journal* **97**: 134–147.
- Lorrai R, Ferrari S. 2021.** Host cell wall damage during pathogen infection: Mechanisms of perception and role in plant-pathogen interactions. *Plants* **10**: 1–21.
- Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt K V. 2009.** The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany* **60**: 367–376.
- Marois E, Van Den Ackerveken G, Bonas U. 2002.** The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 637–646.
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. 1984.** Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual review of biochemistry* **53**: 625–663.

- Meents MJ, Watanabe Y, Samuels AL. 2018.** The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of Botany* **121**: 1107–1125.
- Meier H, Reid JSG. 1982.** Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Plant carbohydrates I: Intracellular carbohydrates. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 418–471.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006.** Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Mijatovic J, Severns PM, Kemerait RC, Walcott RR, Kvitko BH. 2021.** Patterns of Seed-to-Seedling Transmission of *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*, the Causal Agent of Cotton Bacterial Blight. *Phytopathology* **111**: 2176–2184.
- Mondal KK, Rashmi ER, Ghoshal T. 2021.** Rice SWEET proteins: the key targets by the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to ensure nutrition in the rice apoplast during infection. *Indian Phytopathology* **74**: 323–331.
- Nathawat R, Maku R V., Patel HK, Sankaranarayanan R, Sonti R V. 2022.** Role of the FnIII domain associated with a cell wall-degrading enzyme cellobiosidase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **23**: 1011–1021.
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ. 2006.** *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* **7**: 303–324.
- Paauw M, van Hulten M, Chatterjee S, Berg JA, Taks NW, Giesbers M, Richard MMS, van den Burg HA. 2023.** Hydathode immunity protects the Arabidopsis leaf vasculature against colonization by bacterial pathogens. *Current Biology* **33**: 697–710.e6.
- Paiva EAS. 2016.** How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany* **117**: 533–540.
- Parker ML. 1984.** Cell wall storage polysaccharides in cotyledons of *Lupinus angustifolius* L. I. Deposition during seed development. *Protoplasma* **120**: 224–232.
- Peng Y, Van Wersch R, Zhang Y. 2018.** Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 403–409.
- Perez-Quintero AL, Szurek B. 2019.** A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 459–481.
- Pesquet E, Korolev A V., Calder G, Lloyd CW. 2011.** Mechanisms for shaping, orienting, positioning and patterning plant secondary cell walls. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 843–849.
- Pillai SE, Kumar C, Patel HK, Sonti R V. 2018.** Overexpression of a cell wall damage induced transcription factor , OsWRKY42 , leads to enhanced callose deposition and tolerance to salt stress but does not enhance tolerance to bacterial infection. : 1–15.
- Pontiggia D, Benedetti M, Costantini S, Lorenzo G De, Cervone F, Lorenzo G De. 2020.** Dampening the DAMPs : How Plants Maintain the Homeostasis of Cell Wall Molecular Patterns and Avoid. **11**.
- Rajeshwari R, Jha G, Sonti R V. 2005.** Role of an In Planta-Expressed Xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Promoting Virulence on Rice. *Molecular Plant-Microbe*

Interactions MPMI **18**: 830–837.

Ramos Santos C, Hoffmam ZB, De Matos Martins VP, Zanthorlin LM, De Paula Assis LH, Honorato RV, De Oliveira PSL, Ruller R, Murakami MT. 2014. Molecular mechanisms associated with xylan degradation by xanthomonas plant pathogens. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 32186–32200.

Reimers PJ, Leach JE. 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **38**: 39–55.

Rigano LA, Payette C, Yun M, Castagnaro AP, Oirdi E, Dufour V, Malamud F, Dow M, Bouarab K, Alberto A. 2007. Bacterial Cyclic b - (1 , 2) -Glucan Acts in Systemic Suppression of Plant Immune Responses. **19**: 2077–2089.

Roberts SJ, Hiltunen LH, Hunter PJ, Brough J. 1999. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica transplants: Effects of dose and watering regime. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 879–889.

Römer P, Recht S, Strauß T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S, Lahaye T. 2010. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **187**: 1048–1057.

Rudolph K. 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings J, Civerolo E, eds. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 193–264.

Schwartz AR, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2017. TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: E897–E903.

Sechet J, Marion-Poll A, North HM. 2018. Emerging functions for cell wall polysaccharides accumulated during eudicot seed development. *Plants* **7**.

Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux JP. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–8.

Shamsunnaher, Chen X, Zhang X, Wu XX, Huang X, Song WY. 2020. Rice immune sensor XA21 differentially enhances plant growth and survival under distinct levels of drought. *Scientific Reports* **10**: 1–11.

Sinha D, Gupta MK, Patel HK, Ranjan A, Sonti R V. 2013. Cell Wall Degrading Enzyme Induced Rice Innate Immune Responses Are Suppressed by the Type 3 Secretion System Effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS ONE* **8**: 1–19.

Sonnewald S, Priller JPR, Schuster J, Glickmann E, Hajirezaei MR, Siebig S, Mudgett MB, Sonnewald U. 2012. Regulation of Cell Wall-Bound Invertase in Pepper Leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Type Three Effectors. *PLoS ONE* **7**.

Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **200**: 808–819.

- Swaminathan S, Lionetti V, Zabolina OA. 2022.** Plant Cell Wall Integrity Perturbations and Priming for Defense. *Plants* **11**: 1–26.
- Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Coge V, Bonas U, Büttner D. 2010.** Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytologist* **187**: 983–1002.
- Tayi L, Kumar S, Nathawat R, Haque AS, Maku R V., Patel HK, Sankaranarayanan R, Sonti R V. 2018.** A mutation in an exoglucanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, which confers an endo mode of activity, affects bacterial virulence, but not the induction of immune responses, in rice. *Molecular Plant Pathology* **19**: 1364–1376.
- Tayi L, Maku R V., Patel HK, Sonti R V. 2016a.** Identification of pectin degrading enzymes secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* and determination of their role in virulence on rice. *PLoS ONE* **11**: 1–15.
- Tayi L, Maku R, Patel HK, Sonti R V. 2016b.** Action of multiple cell Wall-Degrading enzymes is required for elicitation of innate immune responses during *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**: 599–608.
- Teper D, Xu J, Li J, Wang N. 2020.** The immunity of meiwa kumquat against *xanthomonas citri* is associated with a known susceptibility gene induced by a transcription activator-like effector. *PLoS Pathogens* **16**: 1–28.
- Toth IK, Birch PRJ. 2005.** Rotting softly and stealthily. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 424–429.
- Vandroemme J, Cottyn B, Baeyen S, De Vos P, Maes M. 2013.** Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics* **14**.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010.** Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**: 895–905.
- Vieira PS, Bonfim IM, Araujo EA, Melo RR, Lima AR, Fessel MR, Paixão DAA, Persinoti GF, Rocco SA, Lima TB, et al. 2021.** Xyloglucan processing machinery in *Xanthomonas* pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors. *Nature Communications* **12**: 1–15.
- Vogel J. 2008.** Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 301–307.
- Walton JD. 1994.** Deconstructing the cell wall. *Plant Physiology* **104**: 1113–1118.
- Wang D, Kanyuka K, Papp-Rupar M. 2023.** Pectin: a critical component in cell-wall-mediated immunity. *Trends in Plant Science* **28**: 10–13.
- Wang Y, Li X, Fan B, Zhu C, Chen Z. 2021.** Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–15.
- Wang L, Rong W, He C. 2008.** Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, pghAxc and pghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 555–563.
- Wang C, Tariq R, Ji Z, Wei Z, Zheng K, Mishra R, Zhao K. 2019.** Transcriptome analysis of a rice cultivar reveals the differentially expressed genes in response to wild and mutant strains

of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Scientific Reports* **9**: 1–13.

White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R. 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **10**: 749–766.

Wolf S. 2022. Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annual Review of Plant Biology* **73**: 323–353.

Wu T, Peng C, Li B, Wu W, Kong L, Li F, Chu Z, Liu F, Ding X. 2019. OsPGIP1-Mediated Resistance to Bacterial Leaf Streak in Rice is Beyond Responsive to the Polygalacturonase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Rice* **12**.

Xia T, Li Y, Sun D, Zhuo T, Fan X, Zou H. 2016. Identification of an extracellular endoglucanase that is required for full virulence in *xanthomonas citri* subsp. *citri*. *PLoS ONE* **11**: 1–10.

Xie W, Ke Y, Cao J, Wang S, Yuan M. 2021. Knock out of transcription factor WRKY53 thickens sclerenchyma cell walls, confers bacterial blight resistance. *Plant Physiology* **187**: 1746–1761.

Yang B, Sugio A, White FF. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10503–10508.

Young JM, Dye DW, Bradbury JF, C.G P, C.F R. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**: 153–177.

Yu C, Chen H, Tian F, Leach JE, He C. 2014. Differentially-expressed genes in rice infected by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* relative to a flagellin-deficient mutant reveal potential functions of flagellin in host–pathogen interactions. *Rice* **7**: 1–11.

Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B. 2011. Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 Os11N3 Gene . *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1102–1113.

Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin XF. 2021. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102030.

Yun MH, Torres PS, Oirdi M El, Rigano LA, Gonzalez-lamothe R, Marano R, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K. 2006. Xanthan Induces Plant Susceptibility by Suppressing Callose Deposition. **141**: 178–187.

Zaumeyer WJ. 1930. The bacterial blight of beans caused by bacterium phaseoli. *USDA Technical Bulletin* **186**: 36.

Zou HS, Song X, Zou LF, Yuan L, Li YR, Guo W, Che YZ, Zhao WX, Duan YP, Chen GY. 2012. EcpA, an extracellular protease, is a specific virulence factor required by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* but not by *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Microbiology (United Kingdom)* **158**: 2372–2383.

**Colonization of leaf surface
(nonpathogenic and pathogenic strains)**

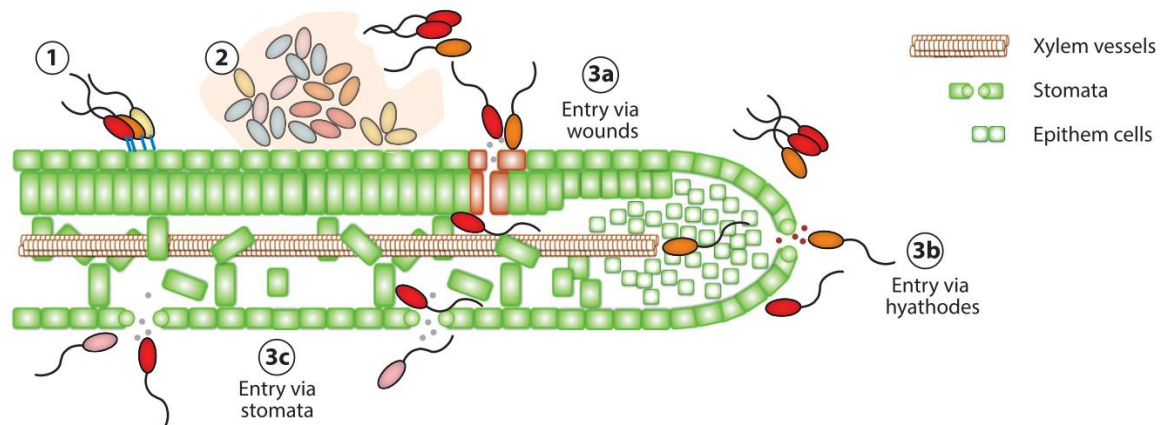


Figure 5. Cycle de colonisation des *Xanthomonas* (d'après Jacques *et al.*, 2016). (1) Les bactéries s'attachent aux tissus végétaux via leurs adhésines et (2) forment un biofilm à la surface des feuilles. (3a) Elles peuvent pénétrer à l'intérieur des plantes par les blessures. (3b) Les agents pathogènes vasculaires rentrent pas les hydathodes, (3c) tandis que les agents pathogènes foliaires pénètrent par les stomates.

III. Les bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas*

Le genre *Xanthomonas* est composé de plus de 30 espèces comprenant très majoritairement des bactéries phytopathogènes capables de causer des maladies sur plus de 400 espèces de plantes, d'intérêt socio-économique majeur, telles que le riz, le poivron, la tomate, les céréales, les agrumes ou le haricot. Les espèces bactériennes composant ce genre sont elles-mêmes subdivisées en pathovars, une division infra sous spécifique groupant des souches partageant la même gamme d'hôtes, généralement étroite, et entraînant la même symptomatologie (Rudolph, 1993; Jacques *et al.*, 2016).

1. Cycle infectieux

Les *Xanthomonas* colonisent les plantes de manière épiphyte, en adhérant aux parties aériennes des végétaux à l'aide d'adhésines, d'exopolysaccharides et de pilus de type IV (Figure 5_1) (Jacques *et al.*, 2016; An *et al.*, 2019). Une fois attachées à leur hôte, les *Xanthomonas* forment un biofilm, composé d'une diversité de cellules microbiennes enrobées d'une matrice d'origine bactérienne (Figure 5_2). Cette matrice polysaccharidique protège les cellules bactériennes contre différents stress environnementaux tels que les UV, la sécheresse ou bien encore les défenses constitutives des plantes (Costerton & Lewandowski, 1995; Morris & Monier, 2003; Jacques *et al.*, 2005).

De très nombreuses bactéries, dont les *Xanthomonas*, sont capables de communiquer entre elles grâce au système de quorum sensing (Miller & Bassler, 2001). Ce système leurs permet de percevoir leurs congénères (densité bactérienne) dans un environnement proche via une molécule dite auto-inductrice ou encore nommée facteur de signalisation diffusible chez les *Xanthomonas* (DSF pour Diffusible signaling factor) (He & Zhang, 2008; Büttner & Bonas, 2010). Le quorum sensing permet ainsi à ces bactéries de réguler et coordonner des processus cellulaires en fonction de cette concentration. Lorsqu'une densité suffisante de population sera atteinte, ces bactéries vont ainsi moduler l'expression de très nombreux facteurs de virulence impliqués dans leur fitness et leur capacité à interagir avec la plante, dont les différents systèmes de sécrétions de protéines (Büttner & Bonas, 2010; Zhou *et al.*, 2017) (Figure 6).

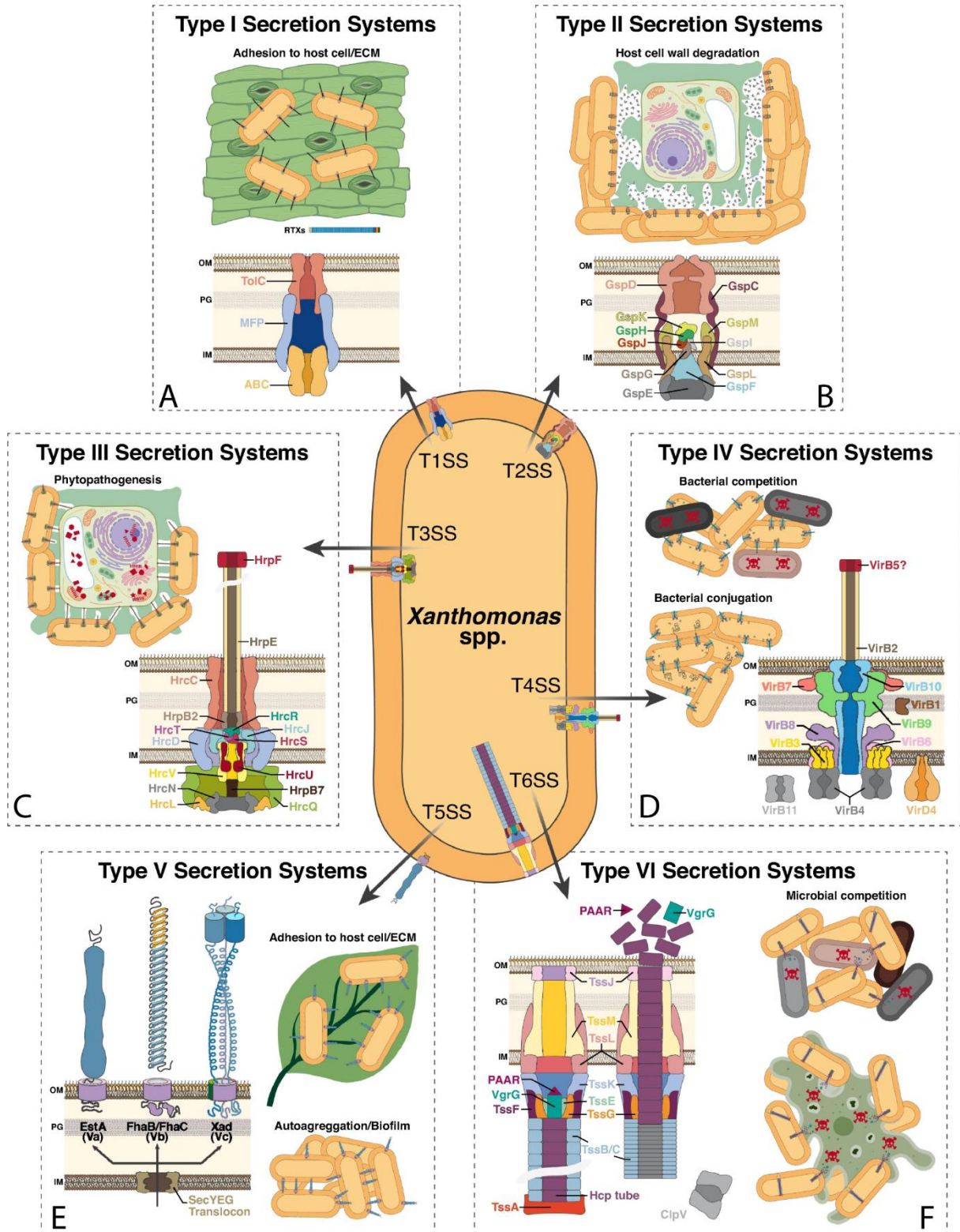


Figure 6. Représentation schématique des SST1 à -6 (=Type I to VI) caractérisés chez *Xanthomonas* (d'après Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). **A)** Le SST1 est composé d'une protéine membranaire externe de type TolC, d'une protéine de fusion membranaire (MFP) et d'un transporteur ABC, chargé de reconnaître les substrats et de fournir l'énergie nécessaire à leur translocation vers le milieu extracellulaire. Les substrats SST1 peuvent être subdivisés en bactériocines, protéines contenant une répétition nonapeptide dans le motif de toxines (RTX) et de grandes adhésines RTX, ayant des activités antimicrobiennes et des rôles dans l'invasion de la cellule hôte et l'adhésion à la cellule hôte et à la matrice extracellulaire (ECM). **B)** Le T2SS est constitué de plusieurs copies d'au moins onze sous-unités différentes et recouvre l'enveloppe bactérienne. Il exporte des enzymes extracellulaires de dégradation de la paroi cellulaire végétale qui ont d'abord été transportées à travers la membrane interne par les voies Sec ou Tat. Le SST2 est

impliqué dans la sécrétion. **C)** Le SST3 est codé par le locus *hrp/hrc*. Plus de 20 protéines constituent les sous-ensembles majeurs du SST3 : la plateforme de tri (HrcQ, HrcL, HrcN, HrpB7), l'appareil d'exportation (HrcV, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU), le complexe aiguille (HrcD, HrcJ, HrcC, HrpE) et le translocon (HrpF). Le SST3 permet d'injecter dans la cellule hôte de nombreux effecteurs de type 3 (ET3) dont certains visent à supprimer les réponses immunitaires des plantes hôtes, permettant ainsi l'infection et le développement de la maladie. **D)** Le SST4 possède 12 sous-unités formant un appareil qui traverse les deux membranes bactériennes. Il en existe de deux types. Le X-SST4 est un système bactéricide qui transfère un cocktail d'effecteurs dotés d'activités enzymatiques antibactériennes dans les cellules d'autres espèces bactériennes. Les *Xanthomonas* peuvent aussi porter un SST4 conjugal permettant la conjugaison bactérienne. **E)** Le SST5 se compose d'une ou deux protéines fixées dans la membrane externe. La translocation à travers la membrane interne est médiée par la voie générale Sec. Trois sous-groupes existent (Va, Vb et Vc) et sont impliqués dans plusieurs processus tels que l'attachement aux surfaces végétales, la vie épiphyte et la colonisation des feuilles hôtes, ainsi que l'attachement de cellule à cellule et la formation de biofilm. **F)** Le SST6 est organisé en trois structures principales qui s'assemblent pour former un système contractile : le complexe membranaire (TssJ, TssL et TssM), un socle (TssK, TssF, TssG, TssE, VgrG et PAAR) et un tube interne extensible (Hcp) entouré d'une gaine contractile (TssB et TssC). Le SST6 transfère directement les protéines vers les cellules cibles procaryotes et eucaryotes. Il est associé à un antagonisme interbactérien et à la promotion de la résistance contre la prédation par les amibes du sol. IM, membrane interne ; PG, peptidoglycane ; OM, membrane externe.

1. Les systèmes de sécrétion et leurs effecteurs

a. Le système de sécrétion de type 1 (SST1)

Trois SST1 sont décrits chez les *Xanthomonas* comme étant impliqués dans les interactions hôtes pathogènes. Il s'agit des systèmes hlyDB, raxAB-raxC et pctAB. Ils ne semblent jamais présents simultanément tous les trois dans une même souche, les souches présentant aucun, un ou deux SST1 (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). Le système RaxABC est constitué d'un transporteur de type ATP-binding cassette (ABC) dans la membrane interne et de deux protéines compagnes localisées dans le périplasma et la membrane externe codées respectivement par les gènes *raxB*, *raxA*, et *raxC* (Figure 6A) (Welch, 1991; Shen *et al.*, 2002; Burdman *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2019). L'expression de ce SST1 est régulée par HrpX, un régulateur majeur de très nombreux facteurs de virulence chez les *Xanthomonas* (Joe *et al.*, 2021). Le peptide RaxX sulfaté par l'activité de RaxST codée par un gène localisé dans le même opéron que *raxX*, *raxA* et *raxB* active ou participe à l'activation du récepteur de l'immunité du riz XA21. Un précurseur peptidique de RaxX (proRaxX) a été identifié comme étant processé et sécrété par le transporteur RaxB (Fonseca *et al.*, 2019; Luu *et al.*, 2019; Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). Globalement le rôle du SST1 dans l'interaction entre les *Xanthomonas* et leurs plantes hôtes reste à étayer.

b. Les systèmes de sécrétion de type 2 (SST2)

Les *Xanthomonas* possèdent tous au moins un SST2 (Figure 6B) de type Xps et de nombreuses espèces ou pathovars présentent en plus un autre SST2 de type Xcs (Moreira *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008; Alvarez-Martinez *et al.*, 2021).

Le SST2-Xps est responsable de la sécrétion de diverses enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (CWDE) alors que le SST2-Xcs pourrait être impliqué dans la survie des *Xanthomonas* (Hu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Filloux, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2010; Szczesny *et al.*, 2010). Les protéines effectrices de type CWDE sont transloquées dans le périplasme à travers la membrane interne des bactéries par un mécanisme sec- ou tat-dépendant, selon qu'elles sont respectivement dépliées ou repliées. Ces protéines sont ensuite sécrétées à l'extérieur de la cellule par un mécanisme complexe requérant plus de 12 protéines nommées de GspC à GspO (Charkowski *et al.*, 2012; Shaliutina-Loginova *et al.*, 2023).

Les effecteurs sécrétés dans le milieu intercellulaire par ce SST2-Xps sont des cellulases, lipases, xylanases, endoglucanases, polygalacturonases, pectate lyases et protéases (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). L'implication de certaines de ces enzymes dans l'agressivité des souches a été démontrée de longue date (Baptista *et al.*, 2010; Szczesny *et al.*, 2010), tandis que les interactions collaboratives avec le SST3, supportée par la co-régulation de ces deux systèmes par HrpX, fait l'objet de travaux plus récents (Maphosa *et al.*, 2023).

c. Système de sécrétion de type 3 (SST3)

Le SST3 (Figure 6C) est l'un des facteurs de pathogénie essentiels à l'infection réussie d'un hôte par les *Xanthomonas* (Büttner & Bonas, 2010). Deux familles de SST3 sont observées chez les *Xanthomonas* : Hrp2, largement prédominant dans ce genre bactérien, et SPI-1 qui est plus rare (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). Ce système est régi par l'expression des gènes *hrp* (pour hypersensitive response and pathogenicity) formant un îlot de pathogénie d'une vingtaine de gènes. Cet îlot en plus d'être régulé par les niveaux de DSF, est aussi dépendant des régulateurs transcriptionnels HrpG et HrpX (Büttner & Bonas, 2010; Teper *et al.*, 2021). Le SST3 est une seringue moléculaire composée d'un corps basal ancré dans les membranes bactériennes, d'un translocon capable de s'intégrer dans la membrane plasmique de l'hôte et d'un pilus reliant ces deux structures tel un canal (Izoré *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2017; Alvarez-Martinez *et al.*, 2021).

Cette seringue permet d'injecter des effecteurs de type 3 (ET3) directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces effecteurs sont reconnus par la machinerie du SST3 grâce à leur signal de sécrétion de type 3 en N-terminal (Sory *et al.*, 1995). En plus d'être essentiels à la pathogénie de *Xanthomonas*, les ET3 sont également des déterminants de la fitness du pathogène ainsi que de la spécificité d'hôte (Merda *et al.*, 2017). Les effecteurs participent à l'agressivité et à la virulence de la bactérie, certains, à l'inhibition des réponses immunitaires

de l'hôte. Pour cela les ET3 comme XopR, XopN, XopX, XopZ, ciblent différents acteurs de la PTI (Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2012; Sinha *et al.*, 2013; Kim & Hwang, 2015). D'autres tels que XopB, XopQ interfèrent à la fois avec les voies de la PTI et de l'ETI (Schulze *et al.*, 2012; Sinha *et al.*, 2013; Teper *et al.*, 2014). Enfin, le SST3 permet également la sécrétion d'une famille de protéines appelés Transcription Activator-Like Effectors (TALE). Ces ET3 si particuliers dans leur structure et leur fonction sont abordés plus bas.

d. Système de sécrétion de type 4 (SST4)

Le SST4 (Figure 6D) est historiquement connu comme permettant la conjugaison bactérienne, c'est-à-dire le transfert d'ADN plasmidique ou chromosomique d'une bactérie à une autre bactérie (Alegria *et al.*, 2005; El Yacoubi *et al.*, 2007; Niu *et al.*, 2015). Les *Xanthomonas* peuvent également posséder un autre SST4, dont la fonction a été récemment élucidée par Souza *et al.*, (2015). Ce X-SST4 secrète des toxines à effet bactéricide leur conférant un avantage sélectif dans des communautés microbiennes diversifiées (Souza *et al.*, 2015). La structure générale du SST4 est constituée d'un core complexe ancré dans la membrane externe connecté à un complexe de la membrane interne formant une sorte de canal de translocation s'étendant de la membrane interne à la membrane externe, reliant ainsi le cytoplasme à l'espace extracellulaire ; des ATPases et un pilus extracellulaire complète la machinerie permettant la sécrétion des protéines ou le transfert d'ADN dans d'autres cellules bactériennes (Sgro *et al.*, 2018; Alvarez-Martinez *et al.*, 2021).

e. Système de sécrétion de type 5 (SST5)

Le SST5 peut se résumer en deux types de structures (Figure 6E). Le premier comprend un transporteur fixé dans la membrane externe relié à son effecteur (appelé auto-transporteur) par la même chaîne polypeptidique (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). La seconde structure présente un transporteur et des effecteurs distincts, ainsi qu'un système de transport dans la membrane interne afin de transférer les effecteurs vers le périplasme. Ce système secrète différents types d'adhésines permettant l'accrochage entre cellules bactériennes ou à d'autres surfaces. Ces adhésines sont ainsi impliquées dans la formation de biofilms (Stoodley *et al.*, 2002; Darsonval *et al.*, 2009; Alvarez-Martinez *et al.*, 2021).

f. Système de sécrétion de type 6 (SST6)

Le SST6 est constitué d'un complexe membranaire, un socle et un tube interne entouré d'une gaine contractile, qui s'assemblent afin de former un système d'injection ressemblant à

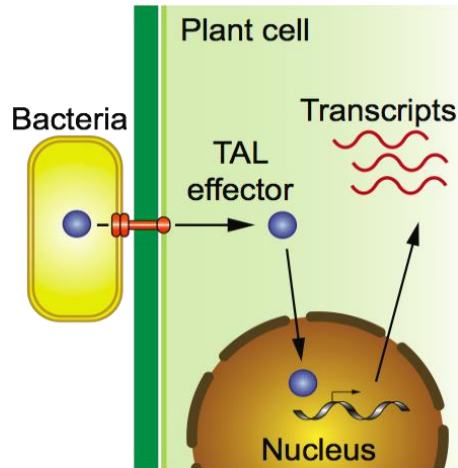


Figure 7. Fonctionnement des TALE (d'après Boch *et al.*, 2010). *Xanthomonas* injectant un TALE (en bleu) via le SST3 (en rouge) dans une cellule de plante. L'effecteur migre ensuite dans le noyau où il se fixe à l'ADN au niveau de la région promotrice d'un gène cible dont il active la transcription.

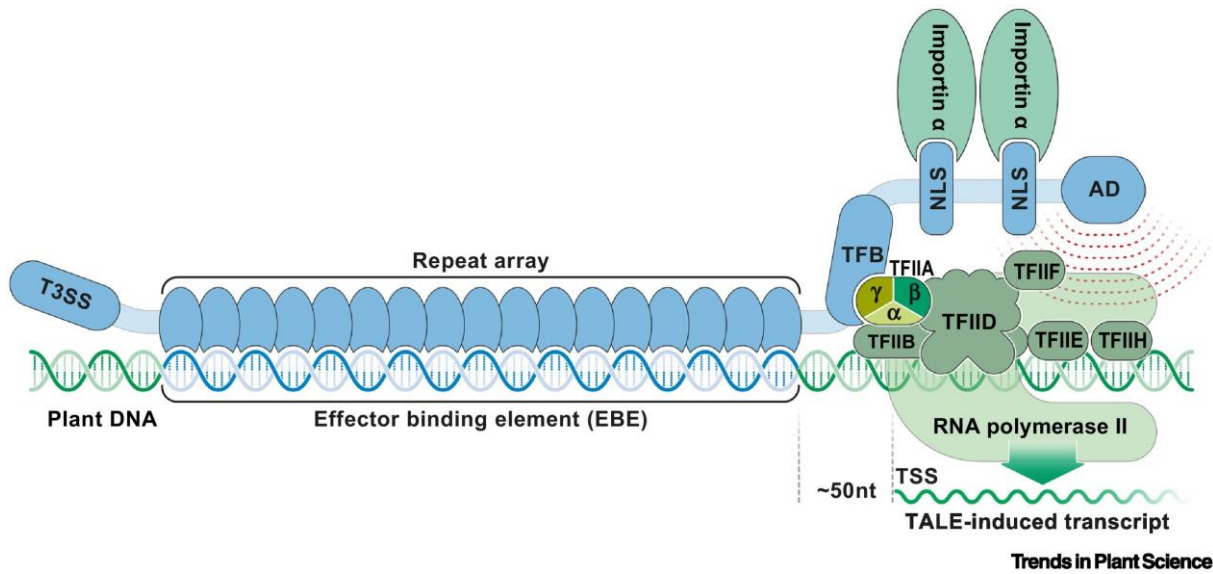


Figure 8. Activation transcriptionnelle d'un gène végétal par un TALE (d'après Nowack *et al.*, 2022). Un signal de sécrétion de type III N-terminal (T3SS) marque les protéines effectrices pour leurs translocations de la bactérie au cytoplasme de la plante. Les modules répétitifs disposés en tandem se lient de manière spécifique à l'EBE. Le domaine du *transcription factor binding* (TFB) assure l'interaction avec la sous-unité gamma (γ) du facteur de transcription TFIIF faisant partie du complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase II de l'hôte. Le domaine d'activation de la transcription (AD) en C-terminal stimule l'activation transcriptionnelle. Le site de départ de la transcription (TSS) induite par le TALE commence à environ 50-100 nucléotides (nt) en aval de l'EBE. Le TSS induit par le TALE est généralement distinct du transcrit natif correspondant. Abréviation : NLS, nuclear localisation signal.

un bactériophage inversé (Figure 6F). Ce système permet de transloquer, entre autres, des protéines dans des cellules bactériennes et des cellules eucaryotes (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). Chez les *Xanthomonas*, le rôle de ce système a pour le moment été montré dans la résistance à la prédation par une espèce d'amibe (*Dictyostelium discoideum* vs *X. citri* pv. *citri*) et dans la compétition avec d'autres bactéries (*E. coli* et *Ochrobactrum oryzae* vs *X. oryzae* pv. *oryzicola*) (Bayer-Santos *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

2. Les effecteurs Transcription Activator-Like

a. Structure et mécanisme d'action

Les bactéries du genre *Xanthomonas* possèdent des ET3 particuliers nommés Transcription Activator-Like Effector (TALE) qui agissent comme des facteurs de transcription eucaryotes et participent à l'agressivité et/ou à la virulence des bactéries qui les expriment (Figure 7) (Perez-Quintero & Szurek, 2019). Ces protéines sont injectées dans la cellule de la plante par le SST3 grâce à des signaux présents dans leur région N-terminale (Figures 8, 9) (Van Den Ackerveken *et al.*, 1996). Elles pénètrent ensuite dans le noyau grâce à des signaux de localisation nucléaire situés en C-terminal en interagissant avec l'importine α de la machinerie d'import nucléaire importine α/β de la plante (Figures 7-9) (Yang & Gabriel, 1995; Szurek *et al.*, 2001, 2002; Hui *et al.*, 2019b). Les TALE se fixent spécifiquement à l'ADN au niveau de la région promotrice de gènes cibles, ce qui leur permet d'en induire l'expression et ainsi de faciliter l'infection de leur hôte (Boch & Bonas, 2010). Les TALE agissent par recrutement de la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte en interagissant avec la sous-unité γ du facteur de transcription IIA, à l'aide du domaine d'activation localisé dans leur région C-terminale (Figure 8) (Zhu *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2016; Hui *et al.*, 2019a).

a. Une reconnaissance spécifique de l'ADN

La partie centrale des TALE est composée d'un nombre variable de répétitions de 34 acides-aminés, ce qui engendre une structure hélicoïdale permettant au TALE de s'enrouler autour de la double-hélice de l'ADN (Figure 11A-B) (Deng *et al.*, 2012; Nga-Sze Mak *et al.*, 2012). En plus de cette structure tridimensionnelle, les répétitions permettent la liaison spécifique de l'effecteur à une séquence cible appelée Effector Binding Element (EBE) qui est généralement une séquence nucléotidique située en région promotrice d'un gène cible (Römer *et al.*, 2007). En effet, le doublet d'acides-aminés en positions 12 et 13 de chaque répétition, nommé repeat variable diresidue (RVD), détermine la spécificité de liaison à chaque nucléotide

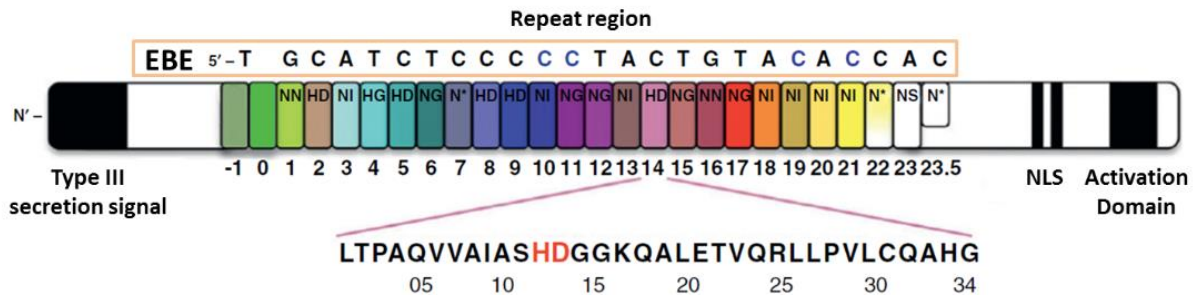


Figure 9. Représentation schématique d'un TALE (d'après Nga-Sze Mak *et al.*, 2013). Il contient, en N-terminal, des signaux qui permettent à la bactérie une sécrétion de l'effecteur via le SST3, au centre, des répétitions variables responsables de la fixation spécifique à l'ADN de l'hôte et en C-terminal, des signaux permettant l'entrée dans le noyau (NLS, de l'anglais nuclear localization signal), ainsi qu'une région nécessaire à l'activation de la transcription du gène cible. Au sein de chaque répétition, les acides-aminés 12 et 13 sont responsables de la liaison spécifique à un nucléotide. Par exemple, ici dans la répétition 14, le doublet HD (en rouge) va cibler une cytosine. La séquence nucléotidique de l'hôte ciblée par un TALE est appelée EBE (effector binding element).

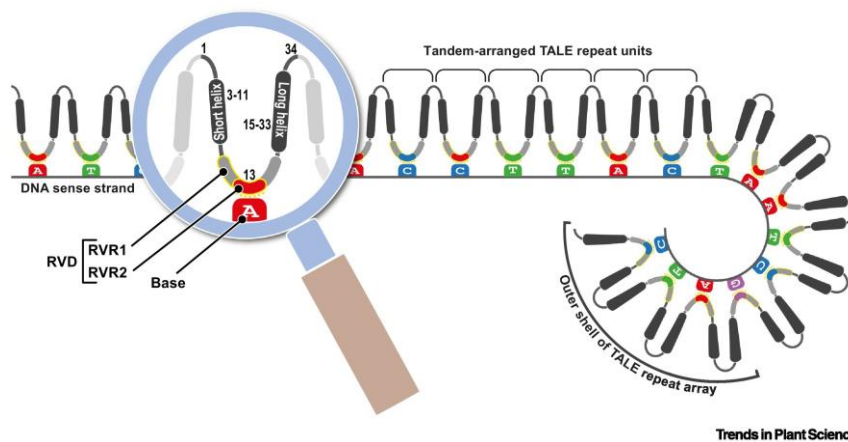


Figure 10. Base structurale de l'interaction entre un TALE et de l'ADN (d'après Nowack *et al.*, 2022). L'interaction TALE-ADN est représentée de manière linéaire (à gauche) et hélicoïdale (à droite), où le réseau de répétitions du TALE s'enroule autour de la structure hélicoïdale de l'ADN. Les répétitions sont généralement très proches les unes des autres en termes de séquence, les résidus 12 et 13 étant les plus variables et désignés par conséquent comme *diresidue variable de répétition* (RVD) (mis en évidence par un cadre jaune). Le résidu variable de répétition 1 (RVR1) (résidu 12) et RVR2 (résidu 13) définissent la préférence de base de l'ADN d'une répétition donnée. Les résidus 12 à 14 forment collectivement la boucle de liaison à l'ADN qui est flanquée de régions hélicoïdales courtes et longues. Les répétitions disposées en tandem s'enroulent autour de l'ADN et forment une structure superhélice.

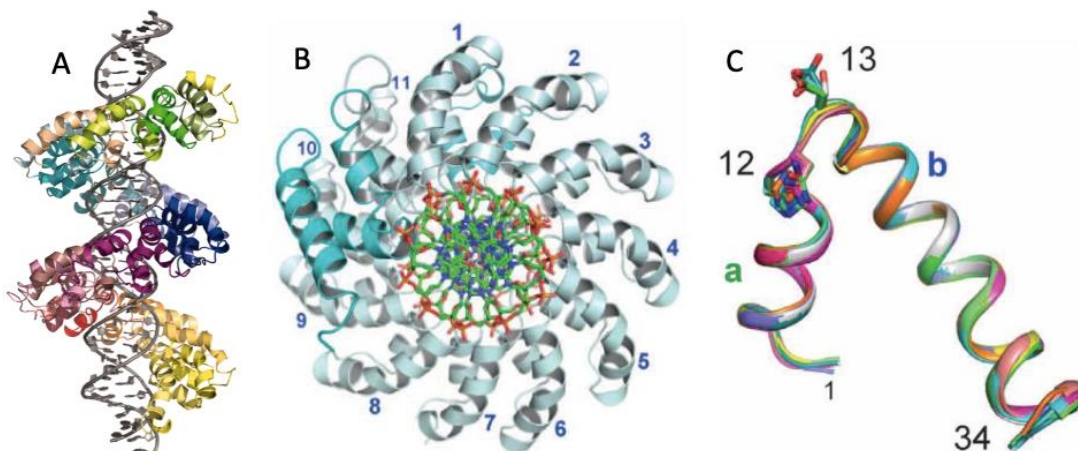


Figure 11. Structure des TALE (d'après Nga-Sze Mak *et al.*, 2012 et Dong Deng *et al.*, 2012). **A)** Structure 3D du TALE PthXo1 lié à l'ADN, vue de côté. **B)** Structure 3D du TALE dHax3 lié à l'ADN, vue en coupe transversale. Les chiffres désignent 11 répétitions formant une superhélice enroulée autour de l'ADN (au centre). **C)** Structure d'une répétition. Chaque répétition fait 34 acides aminés et présente une structure en hélices α courte (a) et longue (b), connectées par une boucle contenant les acides aminés 12 et 13.

de l'EBE (Figure 9, 10). L'acide aminé en position 13 interagit avec l'ADN pendant que le 12^e stabilise la conformation de la boucle RVD, contribuant indirectement à la liaison (Figure 11C) (Deng *et al.*, 2012; Nga-Sze Mak *et al.*, 2012). La séquence des RVD contenues dans les répétitions du TALE détermine donc la spécificité de liaison à une EBE ciblée (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009).

b. Applications du code TALE

Le code TALE reliant chaque RVD à son ou ses nucléotide(s) cible(s) a été déchiffré en 2009 (Figure 12). Grâce à lui, il est donc possible de prédire les EBE potentiellement ciblées par un TALE dans le génome d'une plante hôte à l'aide de logiciels bioinformatiques (Lavorgna *et al.*, 1999; Boch *et al.*, 2009, 2014; Moscou & Bogdanove, 2009; Grau *et al.*, 2013; Pérez-Quintero *et al.*, 2013; Erkes *et al.*, 2019). De plus, à partir de la structure répétée des TALE, des kits de construction des TALE artificiels (designer TALE ou dTALE) ont été mis au point (Boch *et al.*, 2009; Geißler *et al.*, 2011). Ces kits permettent de construire des dTALE dont l'ordre des RVD est choisi, ce qui permet de cibler des séquences souhaitées dans le génome de l'hôte (Figure 13). Les dTALE sont communément utilisés afin de valider des cibles de TALE naturellement présents chez le genre *Xanthomonas* (Boch *et al.*, 2014).

c. Les TALE dans d'autres genres bactériens

Les TALE ne sont pas totalement spécifiques du genre *Xanthomonas*. En effet, des séquences similaires à celles codant les TALE des *Xanthomonas* ont été retrouvées chez *Ralstonia* (RipTAL) (de Lange *et al.*, 2013), *Burkholderia* (BAT) (De Lange *et al.*, 2014) et dans des données métagénomiques marines (MorTL) (De Lange *et al.*, 2015). Les RipTAL fonctionnent de manière similaire aux TALE et semblent impliqués dans la compétition face à d'autres espèces bactériennes (de Lange *et al.*, 2013), tandis que les BAT pourraient impacter la mise en place d'une symbiose (Richter *et al.*, 2020). Les MorTL dont l'origine est encore inconnue, sont similaires aux TALE dans leur séquence protéique à environ 40% mais conservent tout de même une capacité d'accroche à l'ADN (De Lange *et al.*, 2015). Prises dans leur ensemble, ces études interrogent sur l'origine des TALE et leur histoire évolutive.

d. Rôle dans la sensibilité des plantes

Chez les *Xanthomonas*, les TALE semblent avoir des cibles privilégiées (Figure 14). Par exemple, chez *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), agent responsable du flétrissement bactérien du riz, de nombreux TALE ciblent spécifiquement des gènes de la famille *SWEET* qui codent pour

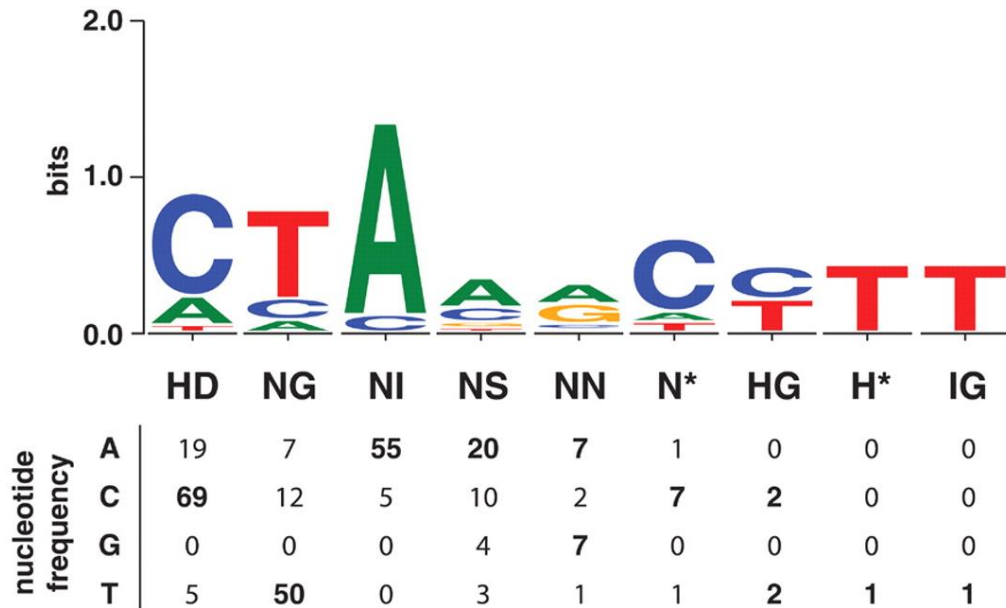


Figure 12. Code TALE reliant les RVDs à leur(s) nucléotide(s) cible(s) (d'après Boch *et al.*, 2009). La taille des nucléotides est proportionnelle à leur fréquence de liaison avec les RVD de différents TALE.

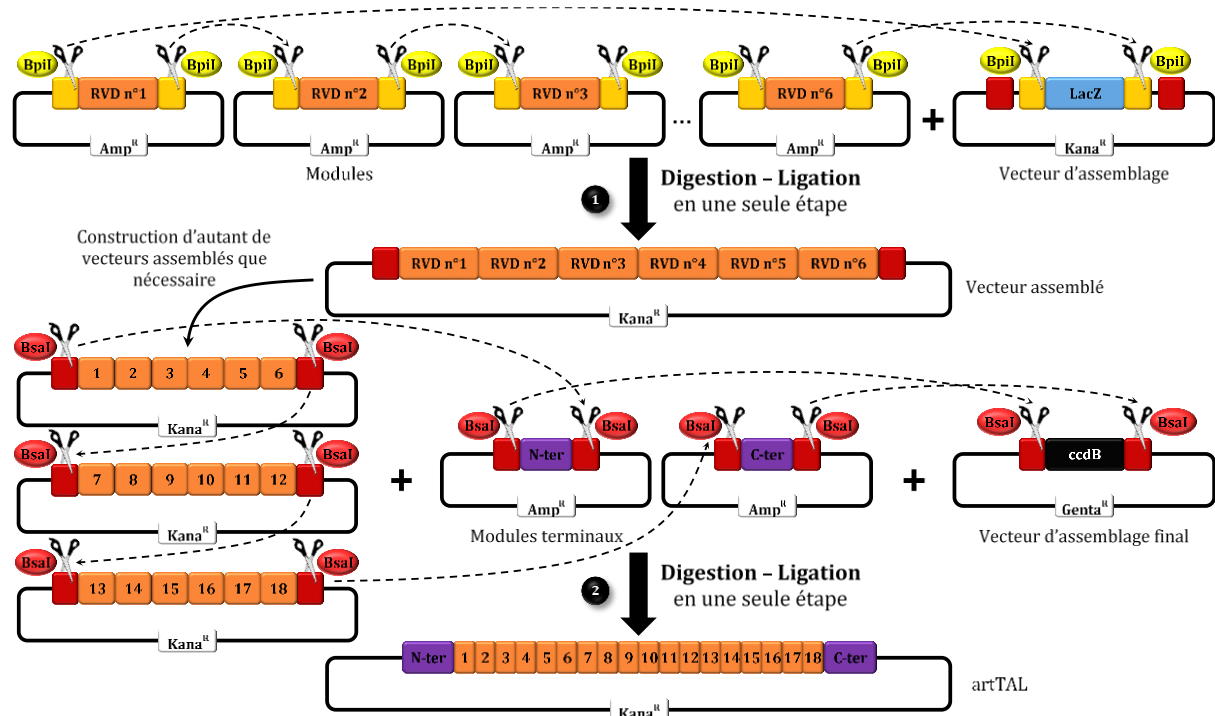


Figure 13. Principe de construction d'un dTALE (d'après Ruh *et al.*, 2017, adapté de Cernak *et al.*, 2011). Un kit de construction de dTALE se compose de vecteurs d'assemblage et de modules, contenant les répétitions, avec différents RVD, et les régions N-terminale et C-terminale. (1) Assemblage d'une série de six répétitions (RVD n°1 à 6) dans un vecteur contenant un gène LacZ par digestion / ligation utilisant BpiI, suivi d'une transformation bactérienne et d'une sélection des bons clones avec un crible blanc / bleu. (2) Assemblage de vecteurs assemblés avec des modules terminaux dans un vecteur contenant un gène *ccdB* en utilisant BsaI, suivi d'une transformation bactérienne et d'une sélection des bons clones, contenant des dTALE, avec un crible positif.

des protéines membranaires exportant le sucrose et le glucose dans l'apoplasme (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2018). Les souches de *Xoo* ciblent au moins trois membres de cette famille avec parfois un même gène ciblé par plusieurs TALE à différents sites de son promoteur. Cela indique l'importance de cette famille pour l'infection du riz. Les SWEET sont donc un bon exemple de convergence de cible observé chez les TALE (Perez-Quintero & Szurek, 2019). D'autres TALE ciblent différents facteurs de transcription tel que des bHLH (basic helix loop helix) (Kay *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2017), bZIP (leucine zipper domain) (Sugio *et al.*, 2007), ERF (ethylene response factor) (Wang *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2018) et LOB (lateral organ boundary) (Hu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2018).

A contrario, certains TALE permettent le contournement des résistances des plantes. Par exemple, chez *X. oryzae* pv. *oryzicola*, agent de la maladie des stries bactériennes du riz, l'activation de l'expression d'un suppresseur de l'immunité par l'effecteur Tal7 a pour conséquence d'inhiber l'ETI chez le riz (Cai *et al.*, 2017). Chez les *Xanthomonas* pathogènes du riz, l'utilisation de versions de TALE tronqués, les iTALE, pour contrecarrer la résistance médiée par *Xa1* a été mise en évidence (Ji *et al.*, 2016). Les iTALE sont des TALE qui ne possèdent pas de domaine d'activation de la transcription (AD) mais conservent leurs signaux de localisation nucléaire.

e. Mécanismes de résistance aux TALE

Les plantes ne sont cependant pas sans défense face aux TALE (Figure 15) (Bogdanove *et al.*, 2010). Leurs défenses face aux TALE impliquent plusieurs stratégies : la reconnaissance directe, la résistance par perte de sensibilité ou le déclenchement des défenses par l'induction d'un gène *executor*.

La reconnaissance des TALE de façon directe par des protéines qui déclenchent ensuite l'ETI de façon traditionnelle est un cas classique de défense des plantes. C'est le cas de *Bs4* chez la tomate et *Xa1* chez le riz, qui codent tous deux pour des NLR (Figure 3A) (Yoshimura *et al.*, 1998; Schornack *et al.*, 2004).

Plusieurs formes de résistance proviennent d'une perte de sensibilité aux TALE (Figure 3B). Par exemple, le gène de résistance *xa5* chez le riz correspond à la version mutée d'un gène codant pour la sous-unité γ facteur de transcription IIA. Les TALE ne peuvent ainsi plus recruter l'ARN polymérase II et par conséquent induire l'expression de leurs cibles (Iyer & McCouch, 2004). Un autre moyen de parvenir à cette perte de sensibilité est la mutation de l'EBE. Le

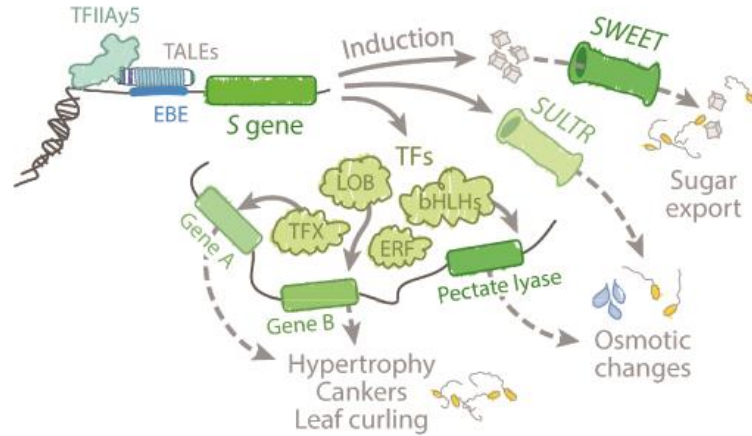
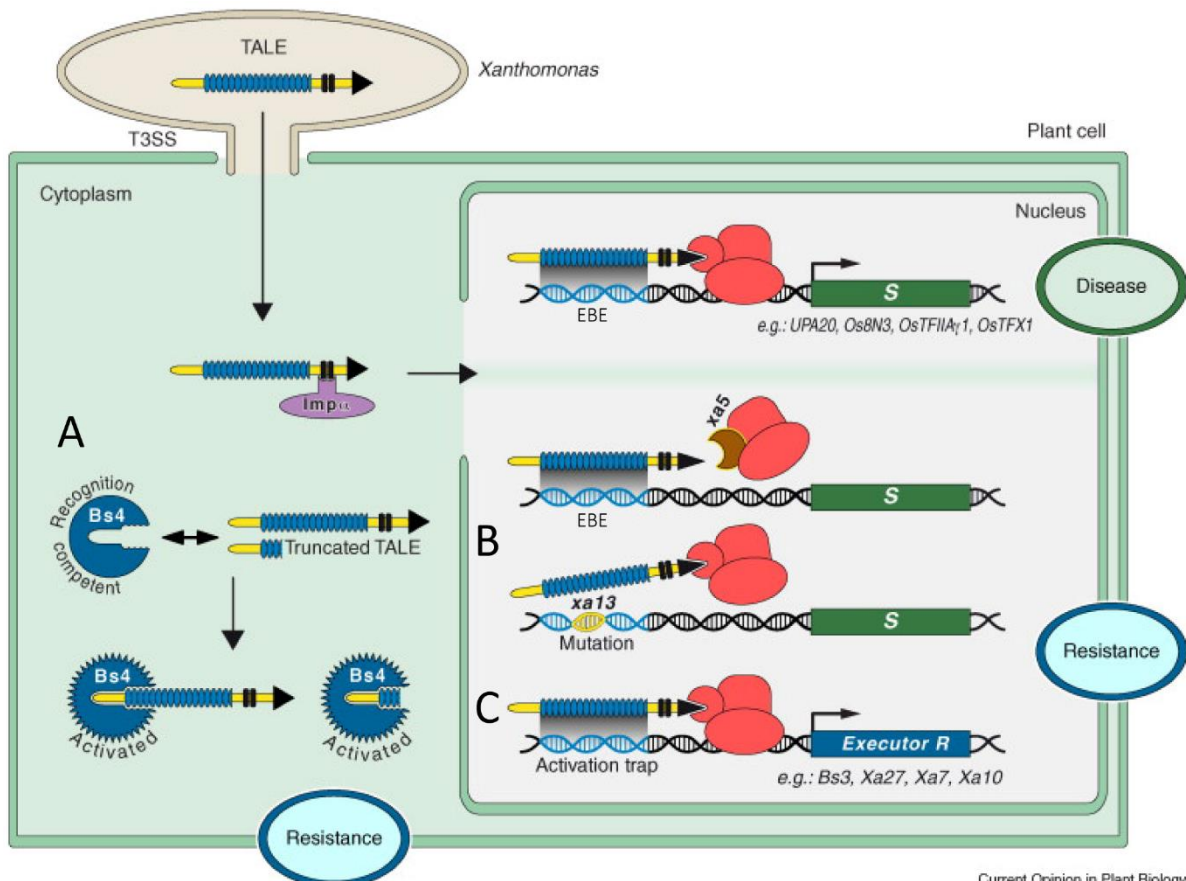


Figure 14. Résumé des fonctions de gènes ciblés par les TALE chez le genre *Xanthomonas* (d'après Perez-Quintero *et al.*, 2019). Le TALE se fixe à l'EBE d'un promoteur d'un gène de sensibilité et recrute l'ARN polymérase II de son hôte en se liant au TFIIAγ. Les facteurs de transcription (TF), SULTR et SWEET font parties des cibles observées. Les TF mènent indirectement à une hypertrophie ainsi que des symptômes de chancre et d'enroulement des feuilles ou encore des changements osmotiques. Ce dernier trait est partagé avec les SULTR. Les SWEET induisent un export de sucre. Abréviations : bHLH, basic helix-loop-helix; EBE, effector binding element; LOB, lateral organ boundary.



Current Opinion in Plant Biology

Figure 15. Rôles des TALE dans les maladies et la résistance des plantes (d'après Bogdanove *et al.*, 2010). Lors de leur injection via le système de sécrétion de type III (T3SS), les TALE peuvent être détectés dans le cytoplasme de l'hôte, comme le montre la protéine de résistance (Bs4) de type NB-LRR qui est capable de détecter le TALE AvrBs4 dans son entièreté ainsi que ses dérivés tronqués. Les TALE se déplacent vers le noyau grâce à l'importine α (impα) puis se lient aux EBE. Ils activent la transcription de gènes de sensibilité de l'hôte (S), tels que *UPA20*, *Os8N3*, *OsTFIIAγ1* ou *OsTFX1*, ce qui entraîne la maladie. L'activation des gènes S peut être inhibée soit par une variation dans le complexe ARN II polymérase (formes rouges), comme pour *xa5* (forme brune), soit par des mutations dans les EBE (mutation *xa13*). Les gènes executor R, sous le contrôle transcriptionnel d'EBE normalement présentes dans les promoteurs des gènes S, déclenche la résistance.

TALE n'est plus capable de reconnaître sa cible ce qui mène alors à une résistance de la plante à *Xanthomonas* (Hutin *et al.*, 2015). C'est le cas des gènes de résistance *xa13* et *xa25*, qui en réalité sont des allèles des gènes de susceptibilité *OsSWEET11* et *OsSWEET13* dont les EBE sont mutées (Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Römer *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015).

La stratégie du déclenchement des défenses repose sur les gènes dits *executors* (Figure 3C) (Zhang *et al.*, 2015). Ce sont des gènes dont l'induction par les TALE confère une résistance chez les plantes. Ainsi, si l'EBE ciblée par le TALE se trouve non pas devant un gène de sensibilité mais devant un gène de résistance, l'induction de la transcription de ce gène peut entraîner une résistance de la plante à *Xanthomonas* (Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Hummel *et al.*, 2016; Hutin *et al.*, 2016). Ce phénomène a pour conséquence de déclencher un mécanisme de HR qui préviendra la progression des bactéries. Pour le moment, six gènes *executor* (*Bs3*, *Bs4C*, *Xa7*, *Xa10*, *Xa23* et *Xa27*) ont été mis en évidence conférant des spectres de résistance plus ou moins large contre les TALE (Yoshimura, 1983; Hokins *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 2004, 2005; Römer *et al.*, 2007; Strauß *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2021a). Quatre de ces gènes (*Xa7*, *Xa10*, *Xa23* et *Xa27*) sont présents chez le riz et deux (*Bs3*, *Bs4C*) sont efficaces à la fois chez la tomate et le poivron. De plus, les protéines codées par ces gènes ne présentent pas d'homologie avec d'autres protéines de résistance connues, ni entre elles, sauf pour *Xa10* et *Xa23* (Zhang *et al.*, 2015).

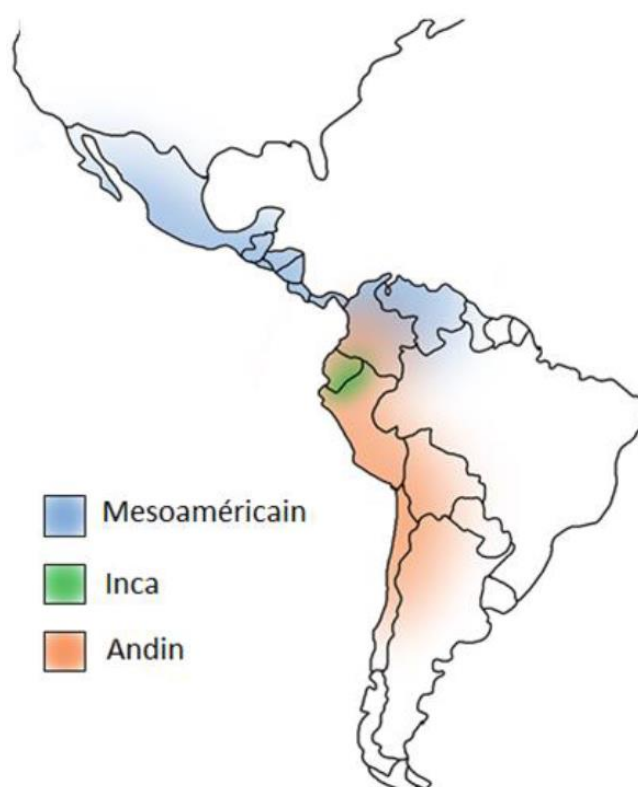


Figure 16. Distribution des différents pools géniques de *P. vulgaris* (d'après Justine, 2020 ; adaptée de Bitocchi *et al.*, 2017).

IV. Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*)

1. Origine et évolution : L'histoire génétique du haricot commun

Le genre *Phaseolus* ($2n = 22$) englobe au moins 50 espèces, parmi lesquelles figurent cinq espèces domestiquées, dont le haricot commun *Phaseolus vulgaris* L (Papa *et al.*, 2006). Cette plante, diploïde et annuelle, se reproduit principalement de manière autogame, bien qu'une pollinisation allogame entomophile (bourdons, abeilles), plus rare, soit également décrite (Papa *et al.*, 2006; Paulino *et al.*, 2023). *P. vulgaris* a émergé au Mexique et a ensuite migré jusqu'aux Andes (Chacón S. *et al.*, 2007). Un goulot d'étranglement géographique, potentiellement créé par la géographie particulière de l'isthme du Panama et/ou la fin de la formation de la cordillère des Andes, aurait mené à l'isolement reproductif partiel de ces groupes (Chacón S. *et al.*, 2007; Bitocchi *et al.*, 2012). Il y a plus de 100 000 ans, *P. vulgaris* s'est alors divisée en deux pools géniques : le pool Mésoaméricain et le pool Andin (Figure 16) (Papa *et al.*, 2006; Schmutz *et al.*, 2014; Bitocchi *et al.*, 2017). Certains de ces auteurs décrivent un troisième pool Inca, bien que son existence semble controversée. La domestication des pools Mésoaméricain et Andin s'est réalisée indépendamment l'une de l'autre (Papa *et al.*, 2006; Bitocchi *et al.*, 2017). Leurs domestications ont créé des goulots d'étranglement qui ont mené à une réduction de leurs diversités génétiques respectives.

Les échanges biologiques entre l'Ancien et le Nouveau Monde se mettent en place après le voyage de Christophe Colomb en 1492 et le haricot commun a probablement été introduit en 1506 en Espagne et au Portugal (Papa *et al.*, 2006). L'introduction et la dissémination du haricot commun en Europe sont complexes et impliquent plusieurs introductions depuis le Nouveau Monde, combinées à des échanges directs entre les pays européens et d'autres pays méditerranéens (Papa *et al.*, 2006). L'arrivée en Europe a marqué la levée de la barrière géographique qui séparait jusqu'alors l'espèce en deux pools, favorisant ainsi des hybridations entre le pool Mésoaméricain et le pool Andin (Bitocchi *et al.*, 2017). Les haricots communs européens possèdent une prédominance de gènes provenant du pool Andin par rapport au pool Mésoaméricain. Au final, l'arrivée en Europe semble avoir limité la diversité du haricot commun dans cette région du monde, provoquée par un fort effet fondateur, une adaptation à un nouvel environnement et les préférences des consommateurs (Papa *et al.*, 2006; Bitocchi *et al.*, 2017). Ainsi, l'Europe constituerait un centre de diversité à part entière pour le haricot commun (Bitocchi *et al.*, 2017).

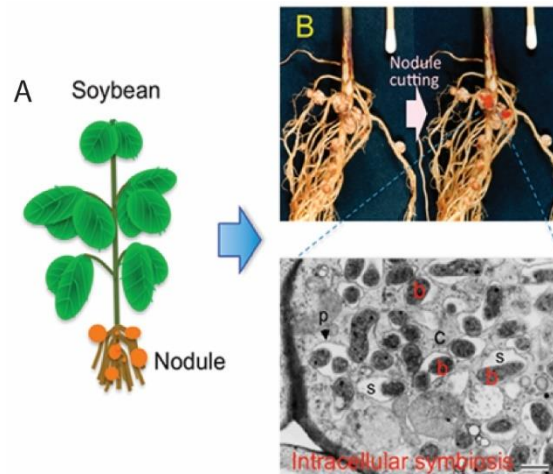


Figure 17. Éléments illustrant une symbiose entre bactéries fixatrices de l'azote et légumineuses (d'après Yoneyama *et al.*, 2019). (A) représentation de la symbiose racinaire entre le soja (*Glycine max*) et *Bradyrhizobium diazoefficiens* aboutissant à la formation de nodules racinaires. (B) Nodules racinaires de soja (*Glycine max*. cv. *Enrei*) et micrographie obtenue par microscopie électronique à transmission de cellules infectées dans le nodule. Les lettres "b", "c", "p" et "s" indiquent respectivement les bactéroïdes de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, le cytoplasme de la cellule végétale, la membrane bactérienne et l'espace du symbiosome (espace entre les bactéroïdes et la membrane plasmique de la cellule hôte).



Figure 18. Photographie d'un champ de milpa (d'après Fonteyne *et al.*, 2023). La milpa est un système de culture traditionnel Méso-américain basé sur l'association de haricots, de maïs et de courges.



Figure 19. Variation de la taille des graines chez le haricot commun (d'après Schmutz *et al.*, 2014). Les graines des haricots sauvages mésoaméricains (MA) et andins (deux pour chacun) sont plus petites que les graines correspondant au génotype de référence (G19833) et aux multiples types commerciaux de haricots communs cultivés aux États-Unis (du blanc au rouge foncé).

2. Symbioses et rotation de cultures : un atout pour une agriculture durable

De manière générale, le haricot commun semble être une culture propice à l'agroécologie. En effet, les légumineuses, dont *P. vulgaris* fait partie, établissent des symbioses avec les bactéries du genre *Rhizobium*, capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2) présente dans le sol en ammoniac (NH_3), une forme assimilable par les plantes (Figure 17) (Giraud, 2007). Cette symbiose a lieu au niveau des racines de la plante dans des organelles appelés nodules qui permettent un échange de nutriments entre les deux acteurs. Cette association permet à cette culture de pousser dans des sols relativement pauvres en azote.

De plus, les variétés de *P. vulgaris* commerciales utilisées en France présentent un cycle de vie court (entre 55 et 110 jours)¹. Cette espèce est donc une bonne candidate pour la rotation des cultures (Foyer *et al.*, 2016; Uebersax *et al.*, 2022). Une rotation de trois ans est conseillée pour les haricots secs, en association avec des espèces idéales à la couverture du sol tel que l'avoine, le blé, le seigle et l'orge (Uebersax *et al.*, 2022). Une technique d'association de culture Mésoaméricaine, la milpa aussi appelée « les trois sœurs », allie la culture du haricot commun (apport en azote), du maïs (tuteur) et de la courge (paillage du sol) et est utilisée en permaculture (Figure 18) (Bitocchi *et al.*, 2017; Fonteyne *et al.*, 2023). Enfin, à la différence des gousses qui se consomment fraîches, les haricots secs se conservent plus longtemps ce qui permet une consommation toute au long de l'année.

3. Importance nutritionnelle et économique

Le haricot commun est la source de protéines la plus importante parmi les espèces de plantes domestiquées pour la consommation humaine directe (Papa *et al.*, 2006). Cette espèce est consommée en grains (haricots secs ou frais) ou en gousses (haricot vert) et offre une grande diversité en termes de tailles et de couleurs (Figure 19). Les haricots secs, de manière générale, sont naturellement riches en protéines (jusqu'à environ 30%), fibres alimentaires, minéraux et vitamines, tout en contenant moins de glucides que les céréales (Tableau 1) (Koehler *et al.*, 1987; Didinger & Thompson, 2022; Uebersax *et al.*, 2022).

¹ Vilmorin Mikado : <https://www.vilmorinmikado.fr/Produits/haricots/tout>, consulté le 02/10/2023.

Tableau 1. Composition nutritionnelle de différentes céréales et légumineuses à huile ou à grain pour 100 calories. (d'après Didinger & Thompson, 2022).

	Chickpea (~1/3 cup)	Cowpea (~1/2 cup)	Dry bean (~1/2-1/3 cup)	Dry pea (~1/2 cup)	Lentil (~1/2 cup)	Peanut (~2 Tbs)	Soybean (~1/3 cup)	Rice, brown (~2/5 cup)	Rice, white (~1/2 cup)	Quinoa (~1/2 cup)
Protein (g)	5.4	6.7	6.7	7.2	7.8	4.6	10.6	2.2	2.1	3.7
Total lipid (g)	1.6	0.5	0.4	0.3	0.3	8.7	5.2	0.8	0.2	1.6
Carbohydrate (g)	16.7	17.9	18.0	17.7	17.4	2.8	4.9	20.0	21.7	17.8
Dietary fiber (g)	4.6	5.6	6.6	7.2	6.8	1.5	3.5	1.3	0.3	2.3
Folate (µg)	104.9	179.3	112.9	56.0	156.0	42.3	31.4	7.4	45.0	35.0
Iron (mg)	1.8	2.2	1.6	1.1	2.9	0.8	3.0	0.5	0.9	1.2
Potassium (mg)	177.4	239.7	268.9	312.1	318.1	124.3	299.4	70.5	27.1	143.3
FDC ^a ID	173757	175252	173735	175257	172421	1100536	174,299	1101631	1101625	168917

^a FoodData Central, United States Department of Agriculture (USDA) (<https://fdc.nal.usda.gov/>). Les informations nutritionnelles pour des portions de 100 kcal sont fournies et les numéros d'identification FDC sont indiqués dans le tableau. Les fibres alimentaires sont classées par l'USDA comme un composant alimentaire préoccupant pour la santé publique, et des différences considérables en termes de fibres sont évidentes entre les légumineuses sèches, les légumineuses oléagineuses et les céréales. Toutes les légumineuses, le soja et les céréales ont été bouillis et l'arachide n'a pas été grillée.

Une alimentation riche en fibres favorise la satiété et est associée à une réduction des risques de diverses maladies chroniques et mortalité précoce, faisant ainsi de cet aliment un composant idéal à une alimentation saine (Foyer *et al.*, 2016; Didinger & Thompson, 2022). De plus, les haricots secs sont très peu transformés avant d’atteindre les consommateurs, ce qui les rendent à la fois bénéfiques pour la santé et respectueux de l’environnement. Avec environ 300 millions de consommateurs de haricots dans le monde chaque année, ces légumineuses jouent un rôle majeur dans la lutte contre la malnutrition et la garantie de la sécurité alimentaire (Uebersax *et al.*, 2022). En 2022, l’Asie occupait la première place de la production total de haricots secs (43%), suivie des Amériques (29%), de l’Afrique (26%) et enfin de l’Europe et l’Océanie (2%) (Uebersax *et al.*, 2022). La culture de cette espèce est financièrement abordable, ce qui la rend accessible à tous et permet de profiter de ses nombreux bienfaits, aussi bien nutritionnels qu’écologiques.

4. Agents pathogènes et maladies

Les cultures de haricots communs sont confrontées à divers agents pathogènes tels que les champignons, les oomycètes, les virus et les bactéries (Rossman *et al.*, 2017; Uebersax *et al.*, 2022). Au champ, il est courant que cette espèce soit attaquée simultanément par deux à trois agents pathogènes. Parmi les maladies fongiques sont retrouvées l’anthracnose causée par *Colletotrichum lindemuthianum* et la fusariose du collet due à *Fusarium solani* (Schwartz *et al.*, 2005). Le genre *Pythium* (oomycète) provoque la pourriture des racines. Les virus ont également leur part de responsabilité dans les pertes de récolte, avec des exemples tel que le virus de la mosaïque commune du haricot (BCMV) et le virus de la nécrose commune du haricot (BCMNV) (Schwartz *et al.*, 2005; Uebersax *et al.*, 2022). Enfin, trois bactérioses attaquent principalement le haricot commun : la graisse à halo causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, la tache brune bactérienne induite par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* et la graisse commune causée par *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* et *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Schwartz *et al.*, 2005; Akhavan *et al.*, 2013).

5. Génomique du haricot commun pour la sélection

Le génome du haricot commun est estimé entre 587 et 637 Mpb (Arumuganathan & Earle, 1991; Schmutz *et al.*, 2014). A l’heure actuelle, dix assemblages de génomes de haricots d’origine andine ou mésoaméricaine ont été publiés (Schmutz *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2016; Alvarez-Díaz *et al.*, 2022; Carrère *et al.*, 2023) et/ou sont disponibles sur la plateforme Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) ou au NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=phaseolus%20vulgaris>). En plus de ces données génomiques, différentes cartes génétiques, associées à un ensemble de marqueurs et de QTL (Quantitative Trait Loci) ainsi que d'associations pangénomiques (GWAS, Genome-Wide Association Studies) ont été développées (Assefa *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021b). L'étude du croisement des variétés BAT93 et JaloEE558 représentent une partie importante de ces travaux (McClean *et al.*, 2004). Toutes ces ressources génomiques et génétiques permettent des études transcriptomique, d'évolution de gènes d'intérêt ainsi que l'utilisation de techniques de modification génétique ou de sélection assistée par marqueurs (MAS : Marked-Assisted Selection). Ces ressources sont donc précieuses afin d'améliorer le haricot commun non seulement en termes de rendement, mais aussi de résistance et d'adaptation aux stress abiotiques ainsi qu'aux bioagresseurs.

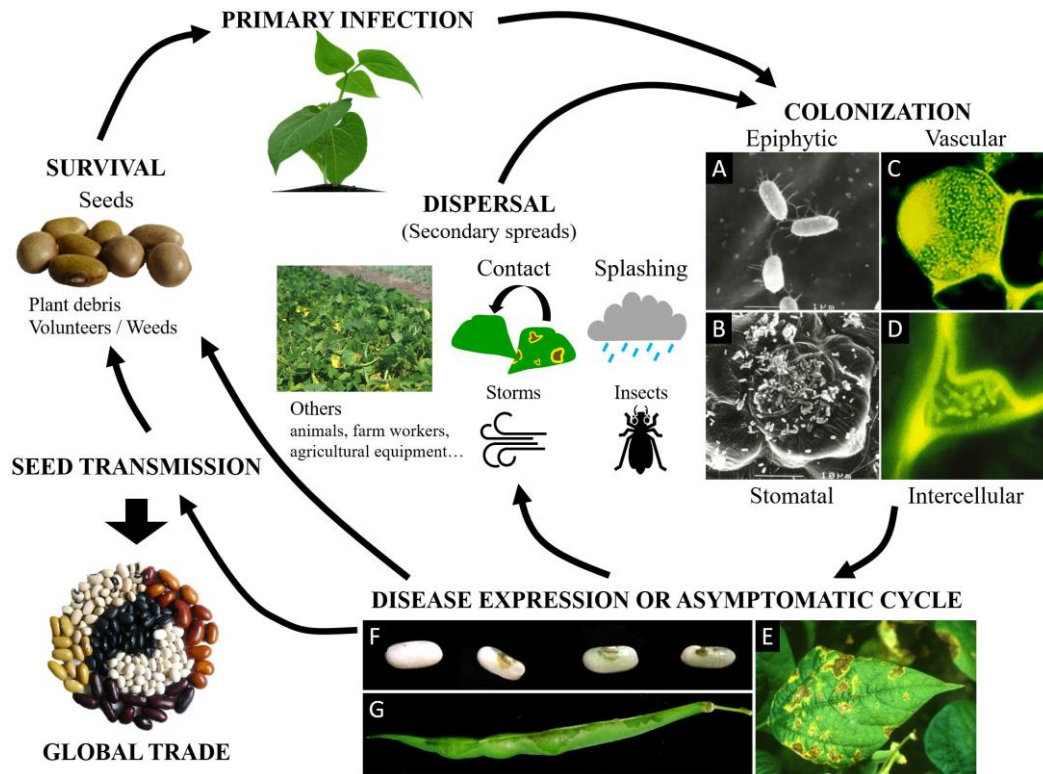


Figure 20. Cycle et symptômes de la CBB (d'après Chen *et al.*, 2021. L'infection primaire est principalement causée par des semences contaminées ou des débris végétaux infectés, ainsi que par des plantes adventives. Les bactéries commencent par se développer en biofilms sur la surface de la plante, puis pénètrent par des ouvertures telles que les stomates, les hydathodes ou les plaies. Elles se multiplient dans les tissus de la plante, aussi bien dans l'espace intercellulaire que dans les vaisseaux, provoquant des symptômes visibles sur toutes les parties aériennes de la plante. Les infections secondaires se propagent par contact direct, éclaboussures, tempêtes et insectes. La transmission à longue distance résulte souvent du commerce international de semences. (a) Micrographie au microscope électronique à balayage (MEB) de cellules solitaires de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (Xcf) épiphyte sur des feuilles de haricot. (b) Micrographie MEB de cellules Xcf agrégées en biofilm dans des stomates ouverts, dont les cellules de garde et les cellules voisines sont largement colonisées par des cellules épiphytes. (c) Image de microscopie confocale à balayage laser (CLSM) montrant des cellules de Xcf marquées à la protéine fluorescente verte (GFP) agrégées dans un biofilm adhérant à la surface interne d'un vaisseau de xylème dans la tige d'une plantule de haricot et bouchant le vaisseau. (d) Image CLSM montrant des cellules de Xcf marquées GFP dans l'espace intercellulaire du parenchyme d'une feuille de haricot. (e-g) Images de l'expression de la maladie sur différents organes de la plante. (e) Symptômes typiques sur feuille, montrant des lésions nécrotiques brunes entourées d'un halo jaune. (f) Graine saine (à gauche) et trois graines symptomatiques (à droite) présentant des symptômes brunâtres au niveau du hile. (g) Gousse présentant des symptômes grasseyés se propageant à partir de la suture de la gousse.

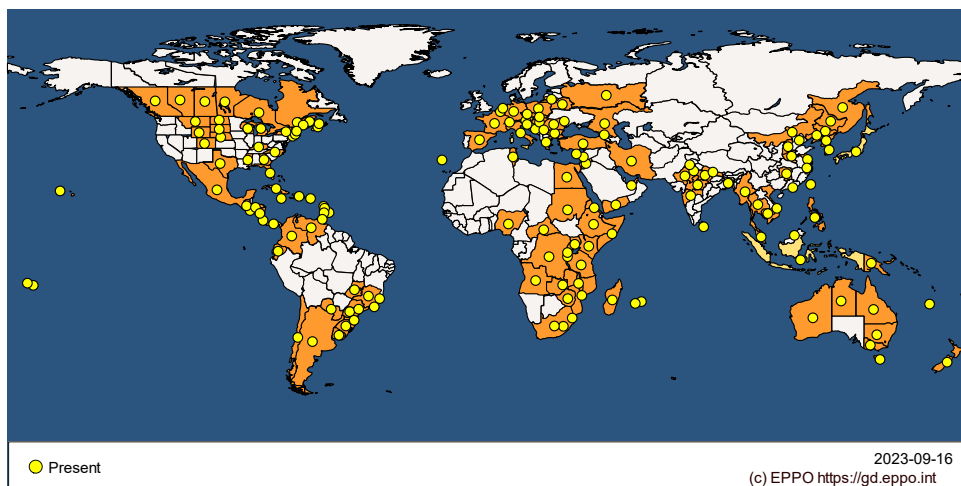


Figure 21. Distribution mondiale de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* et *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* responsables de la CBB (d'après d'EPPO 2023).

V. La graisse commune du haricot

1. Symptomatologie et incidence de la maladie

La graisse commune du haricot (en anglais Common Bacterial Blight, CBB) est une maladie bactérienne qui touche toutes les parties aériennes de la plante (Figure 20E-G). Elle est caractérisée par l'apparition de petites taches graisseuses, qui évoluent en nécroses et fusionnent pour former de larges plages nécrotiques entourées d'un halo chlorotique (Figure 20E), dont la taille et l'intensité semblent dépendre du cultivar de haricot (Zaumeyer, 1930; Swings *et al.*, 1993). La CBB est la bactériose la plus dévastatrice du haricot, provoquant une réduction de production allant jusqu'à 40 % chez les géotypes sensibles (Wallen & Jackson, 1975; Opio *et al.*, 1992). La CBB est présente partout où le haricot est cultivé (Figure 21) et est considérée comme une contrainte majeure à la production de semences dans la zone tropicale humide (EFSA, 2014). Elle a un impact particulièrement important en Amérique du Sud et Afrique de l'Est, où le haricot tient une place majeure dans l'agriculture vivrière (Blair *et al.*, 2010; Petry *et al.*, 2015). La CBB étant principalement transmise par la semence, cette maladie représente une menace économique et agricole à la fois pour la production de haricot et pour l'industrie semencière (EFSA, 2014).

2. Les agents responsables de la graisse commune

Xanthomonas phaseoli pv. *phaseoli* (*Xpp*) et *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (*Xcf*) sont les deux agents responsables de la graisse commune. Ces deux espèces forment deux pathovars phylogénétiquement distants l'un de l'autre et causant des symptômes similaires de graisse sur *P. vulgaris* (EFSA, 2014; Chen *et al.*, 2021b; EPPO, 2023a,b). Le pathovar *Xcf* est constitué de trois lignées génétiques distinctes : la lignée *fuscans* caractérisée par la production d'un pigment mélanique et deux lignées ne le produisant pas, GL2, GL3 ; *Xpp* correspond à la lignée GL1, également non *fuscans* (Alavi *et al.*, 2008; Constantin *et al.*, 2016) (Figure 22). La lignée GL1 est donc phylogénétiquement éloignée des autres lignées. Parmi ces différentes lignées, les souches de la lignée *fuscans* sont en général décrites comme plus agressives (Vidaver, 1993; Opio *et al.*, 1996). Le haricot est l'hôte principal de ces bactéries, bien qu'elles aient été retrouvées sur d'autres légumineuses proches dont *P. lunatus* et plusieurs espèces du genre *Vigna*.

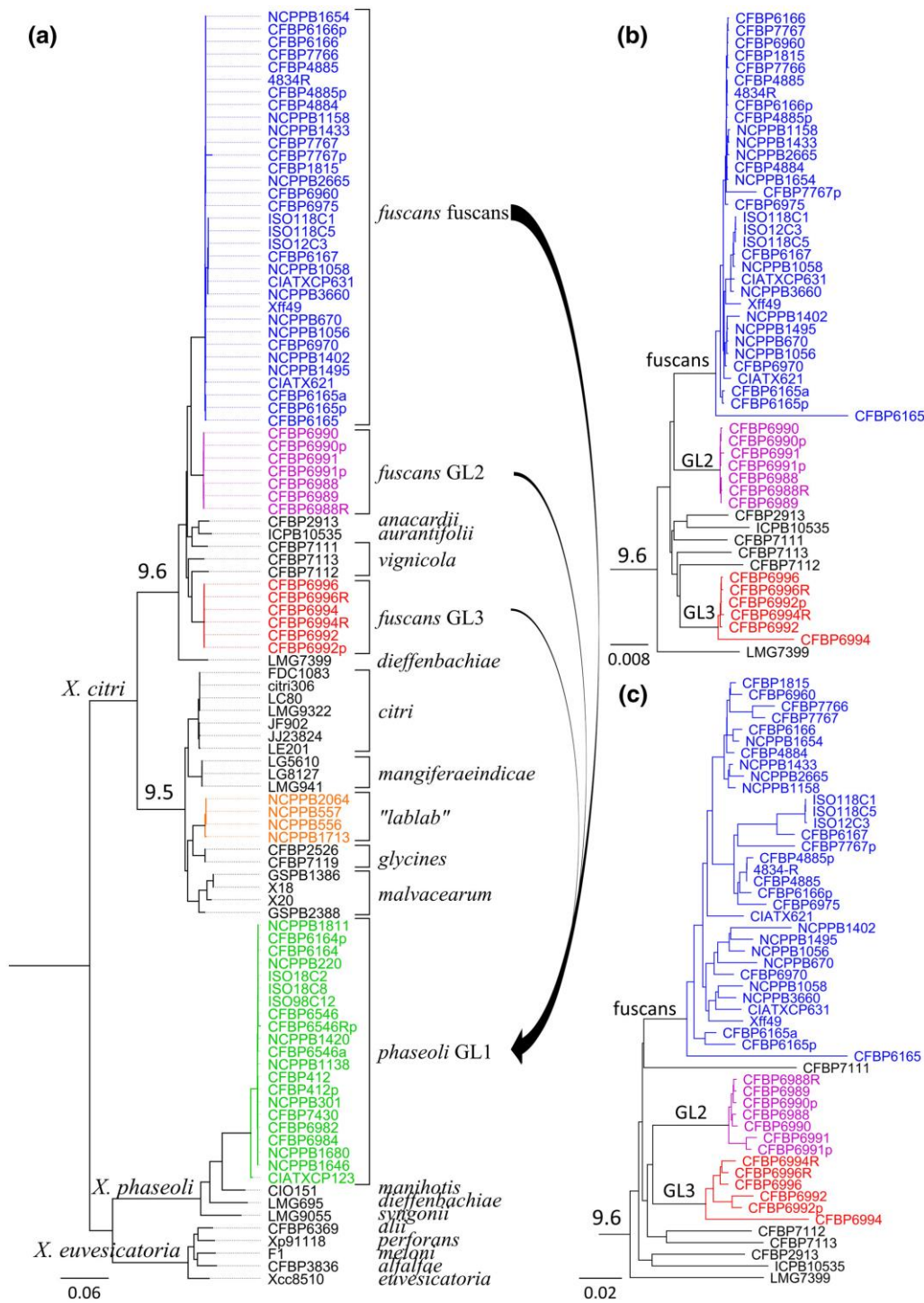


Figure 22. Phylogénie des agents de la CBB (d'après Chen *et al.*, 2021). (a) Arbre phylogénétique basé sur le core génome de *Xanthomonas*. 1 335 core gènes à copie unique ont été alignés et les positions variables ont été extraites pour construire une matrice SNP du génome central qui a permis de construire l'arbre phylogénétique. Les flèches représentent les principaux événements de transfert horizontal de gènes détectés entre les ancêtres *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* et *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. L'enracinement a été effectué en utilisant la souche NCPPB702 de *Xanthomonas vasicola*, la souche NCPPB4381 de *Xanthomonas campestris* et les souches KACC10331, MAFF 311018, PXO99A, BAI15, BAI20, BAI21 et BLS256 (non montrées) de *Xanthomonas oryzae* en tant qu'outgroup. (b, c) Sous-arbres du groupe rep-PCR 9.6 sur le même ensemble de données de souches que pour l'arbre présenté en (a). Ces arbres sont basés sur la fréquence d'apparition d'oligopeptides chevauchants de longueur K = 6. L'arbre en (b) a été construit sur la base des mêmes 1 335 gènes principaux qu'en (a), tandis que l'arbre en (c) a été construit sur la base du pan-génome constitué de toutes les séquences codantes prédites. Les topologies en (a) et (b) sont congruentes l'une avec l'autre.

3. Cycle infectieux

a. Sources d'inoculum primaire

Comme évoqué un peu plus haut, *Xcf* et *Xpp* sont transmissibles par la semence, qui est la principale source d'inoculum primaire de la CBB. La contamination des graines peut survenir à l'intérieur de la plante mère par voie florale ou par voie vasculaire, ou bien encore par contact direct avec la gousse infectée ou des résidus de culture infectés lors des opérations de battage à la récolte (Zaumeyer, 1930; Rudolph, 1993; Darsonval *et al.*, 2008; Darrasse *et al.*, 2010, 2018). Ces bactéries peuvent survivre plus de 30 ans sur graines de haricot et sont transmissibles à la fois par des semences de génotypes sensibles et tolérants (Schuster & Sayre, 1967; Cafati & Saettler, 1980a). *Xcf* et *Xpp* peuvent être présentes sur des graines asymptomatiques (Darrasse *et al.*, 2010). C'est pourquoi le seuil de tolérance de leur présence dans les lots de semences est de 0% bien qu'elles soient listées en tant qu'organismes réglementés non de quarantaine depuis décembre 2019 en Europe (EPPO, 2023a,b). Avant leurs commercialisations, les lots de semences produits ou introduits en Europe sont soumis à un protocole de détection de *Xcf* et *Xpp* suivant la méthode ISTA (Grimault *et al.*, 2014).

De plus, en régions tropicales et subtropicales *Xpp* et *Xcf* sont capables de survivre plus de sept mois sur des débris de haricots laissés sur le sol, leurs permettant ainsi de survivre aux rotations de cultures (Arnaud-Santana *et al.*, 1991; Fininsa & Tefera, 2001; Karavina, 2014; Chen *et al.*, 2021b). Cette stratégie est particulièrement efficace pour la dissémination de la CBB dans les régions tropicales et subtropicales. Les études sur la survie de ces pathovars en climat tempéré ne permettent pas de conclure clairement sur l'impact de ces débris en tant qu'inoculum primaire dans ces conditions (Saettler, 1989). L'impact d'hôtes alternatifs en tant qu'inoculum primaire a également été étudié, notamment dans le contexte de rotation de culture (da Silva Júnior *et al.*, 2022). Par exemple, *Xpp* est retrouvée de manière épiphyte sur les plants asymptomatiques d'oignons, uniquement dans les champs où le haricot a été précédemment cultivé (Gent *et al.*, 2005). Une autre étude a montré que *Xpp* restait vivant jusqu'à parfois 21 jours sur les feuilles d'espèces d'adventices et de différentes cultures (par exemple *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Phaseolus acutifolius*, *Amaranthus retroflexus*) (Cafati & Saettler, 1980b).

Les semences, les débris de végétaux et les hôtes alternatifs représentent donc des sources d'inoculum primaire importants pour la contamination des futures cultures de haricot.

b. Colonisation

A ce jour, aucune différence entre le cycle de colonisation de *Xcf* et *Xpp* n'a été mis en évidence (Figure 22). La colonisation de la plante commence par une phase épiphyte pendant laquelle les bactéries ne causent pas de symptômes (Belete & Bastas, 2017). Cette colonisation peut concerner l'ensemble de la durée de vie du haricot et conduire à une transmission asymptomatique à la semence (Darrasse *et al.*, 2010). Durant cette phase les bactéries peuvent se trouver soit en cellules solitaires ou en biofilm (Jacques *et al.*, 2005). La colonisation épiphyte est favorisée par l'agrégation en biofilm qui protège et stabilise la population bactérienne. Les agents pathogènes vont ainsi pouvoir pénétrer dans les tissus par les ouvertures naturelles (stomates et hydathodes) ainsi que par les blessures (Chen *et al.*, 2021b).

La colonisation du mésophylle est consécutive à la pénétration par les stomates ou les blessures (Zaumeyer, 1930; Rudolph, 1993; Jacques *et al.*, 2005; Akhavan *et al.*, 2013). La pénétration par les hydathodes et les blessures peut également conduire à la vascularisation de la bactérie dans le xylème (Zaumeyer, 1930; Zaumeyer & Rex Thomas, 1957; Vidaver, 1993; Jacques *et al.*, 2016). A l'intérieur des feuilles la densité de population doit atteindre environ 10^6 CFU/cm² afin de mener à un développement de symptômes, ce qui correspond en général au début de la phase de reproduction des plantes, sans doute le moment lors duquel les conditions environnementales (température et humidité) sont les plus favorables à la multiplication bactérienne et donc à l'atteinte de ce seuil de population (Jacques *et al.*, 2005; Darrasse *et al.*, 2010). Lorsque les bactéries ne sont pas dans de conditions optimales (humidité basse ou faible inoculum primaire) la colonisation du haricot reste asymptomatique, pendant toute la saison de culture (Weller & Saettler, 1980; Darrasse *et al.*, 2007).

c. Dissémination

Plusieurs facteurs interviennent dans la dissémination de la maladie. A une échelle locale, les pratiques culturales tel que l'utilisation d'outils non désinfectés peut être un moyen de transmission entre plantes (EFSA, 2014). Le climat a également un impact sur la sévérité et l'incidence de la maladie, les bactéries préférant des conditions chaudes et humides (Saettler, 1991). La technique d'arrosage (irrigation par aspersion, par exemple) peut également favoriser l'incidence de la maladie dans un champ de haricots (Akhavan *et al.*, 2013). Une dissémination peut avoir lieu par contact direct avec des débris de végétaux infectés, pouvant être dispersés par la pluie ou le vent (EFSA, 2014). Certaines études montrent une dissémination passive de la bactérie par des insectes mangeurs de feuilles, *Cerotoma ruficornis* et *Diaprepes abbreviata* (Kaiser & Vakili, 1978). La transmission de *Xcf* et *Xpp* à l'échelle mondiale se fait par le

transport et le commerce de semences infectées (Zaumeyer & Rex Thomas, 1957). La distribution mondiale de la maladie pourrait donc être liée à la fois à sa capacité de transmission par les graines et aux échanges de semences contaminées dans un commerce international (Chen *et al.*, 2021b).

4. Gestion de la maladie

a. Lutte chimique et biologique

La sélection sanitaire des lots de semences est la méthode la plus utilisée pour limiter la dissémination et/ou l'introduction de cette maladie (EFSA, 2014). Les autres méthodes de lutte sont globalement d'efficacité limitée et peu durables. Les produits chimiques tels que le sulfate de cuivre et l'hydroxyde de cuivre, ou encore des antibiotiques, tels la streptomycine et la kasugamycine sont les seuls moyens de lutte chimique disponibles (Chen *et al.*, 2021b). Cependant l'utilisation de produits cupriques est soumise à une réglementation de plus en plus stricte en France (2019, Plan Ecophyto). Les antibiotiques sont quant à eux interdits dans de nombreux pays comme en Europe et en Afrique de l'Est (Verhaegen *et al.*, 2023). Et pour cause, leur utilisation peut conduire à la dissémination de gènes de résistance entre les bactéries (Davies, J., 1994; Choudhury *et al.*, 2012). L'utilisation d'huiles essentielles bien qu'efficace contre les agents de la CBB, n'en reste pas moins délétère pour l'environnement due au large spectre d'action de ces produits (Gakuubi *et al.*, 2016; Todorović *et al.*, 2016). Des microorganismes antagonistes de *Xcf* et *Xpp* ont également été étudiés, mais leur utilisation sur le terrain doit encore être concrétisée (Giorgio *et al.*, 2016; Belete *et al.*, 2021).

a. Pratiques culturales

La désinfection des outils est vivement recommandée et les résidus de haricots infectés par la CBB doivent être détruits ou enfouis profondément dans la terre afin de réduire le temps de survie de *Xcf* et *Xpp* (Belete & Bastas, 2017). Malgré la persistance des bactéries sur les débris de haricot en surface, la rotation des cultures permet de limiter l'inoculum primaire disponible. Ainsi, il est conseillé d'attendre au moins trois ans entre deux cultures de haricots (EFSA, 2014). Certaines associations de plantes telles que le maïs et le sorgho diminuent la vitesse de progression, l'incidence (de 36%) et la sévérité (de 20%) de la maladie sur haricot (Fininsa & Yuen, 2002).

Tableau 2. Liste des QTL de résistance identifiés chez le haricot commun contre la CBB (d'après Chen et al., 2021).

Chromosome	Genetic marker	Leaves	Pods	Seeds	Field	Reference
Resistance source from <i>Phaseolus vulgaris</i>						
2	D0108	x				Nodari et al. (1993)
3	PvSNP85p745405	x				Xie et al. (2017)
5	D1081	x				Nodari et al. (1993)
7	D1390	x				Nodari et al. (1993)
7	AD4.1150	x				Jung et al. (1996, 1999)
7	AA19.600-L6.800	x			x	Miklas et al. (2000)
9	D0157	x				Nodari et al. (1993)
10	SAP6.820	x	x		x	Miklas et al. (1996, 2003)
10	BC409.1250	x	x			Jung et al. (1996, 1999)
10	W10.550	x	x			Ariyaratne et al. (1999)
10	Xap1	x				Zapata et al. (2010)
10	BMp10s174/s244	x				Zhu et al. (2016)
11	BNG25A	x				Yu et al. (1998)
11	BNG154	x				Yu et al. (1998)
Resistance source from <i>Phaseolus acutifolius</i>						
1	R20.1250	x	x			Ariyaratne et al. (1999)
2	U8.1100	x				Jung et al. (1996)
2	AM02.1500	x				Jung et al. (1997)
2	A10.1750	x	x			Ariyaratne et al. (1999)
3	BNG21	x			x	Tar'an et al. (2001)
3	C1.1550	x				Jung et al. (1996)
4	BNG71	x			x	Tar'an et al. (2001)
5	PHVPVPK-1	x			x	Tar'an et al. (2001)
6	BC420.900	x				Jung et al. (1997); Yu et al. (2000)
6	BC420-CG14	x				Shi et al. (2012)
7	AL7.1050	x	x	x		Jung et al. (1997)
7	G17.400	x	x			Ariyaratne et al. (1999)
7	Pv-tttc001	x				Yu et al. (2004)
8	SU91	x				Pedraza García et al. (1997)
8	R7313	x			x	Bai et al. (1997)
8	SU91-CG11	x				Shi et al. (2012)
8	BC432.1000			x		Jung et al. (1997)
9	Y4.1600	x				Ariyaratne et al. (1999)
11	BC446.1200	x				Jung et al. (1996)
11	SNP47467	x	x			Viteri, Cregan, et al. (2014)
Resistance source from <i>Phaseolus coccineus</i>						
7	BNG40	x				Yu et al. (1998)
8	BNG139	x				Yu et al. (1998)

b. La sélection sanitaire des semences

L'utilisation de semences saines est un pilier de la lutte contre la graise commune. Ces dernières peuvent être produites dans des régions où *Xcf* et *Xpp* ne sont pas présents ou dans des conditions environnementales non favorables au développement de la maladie tels que les climats arides ou frais (EFSA, 2014; Karavina, 2014). De plus, les lots de semences qu'ils soient produits dans des zones défavorables ou favorables à la maladie doivent être testés par des méthodes validées pour montrer l'absence de la bactérie (Grimault *et al.*, 2014).

c. Lutte génétique

L'utilisation de variétés de haricot commun résistantes est un atout primordial à une lutte durable contre la maladie. Afin d'améliorer la résistance de *P. vulgaris* des croisements avec d'autres espèces de *Phaseolus* ont été réalisés. De nombreux croisements entre *P. vulgaris*, *P. coccineus* et *P. acutifolius* ont permis d'obtenir des variétés avec différents degrés de résistance (Miklas *et al.*, 1994, 1999, 2003; Zapata *et al.*, 2011; Viteri & Singh, 2014). Les croisements de *P. vulgaris* et *P. acutifolius* ont produit les résistances les plus fortes contre la CBB (Thomas & Waines, 1984). Cependant, à ce jour aucune variété n'est résistante contre tous les isolats et l'efficacité de résistances partielles à la CBB varie grandement avec l'agressivité des souches de l'agent pathogène (Tugume *et al.*, 2018).

Au vu de l'impact de la maladie, la résistance a beaucoup été étudiée et implique de nombre QTL (quantitative trait loci). En effet, au moins 27 QTL de résistance à la CBB ont été cartographiés à l'aide de neuf populations biparentales (Tableau 2). Ces QTL sont dispersés sur les 11 chromosomes du haricot et co-localisent peu entre eux (Foucher *et al.*, 2020). Le croisement entre les génotypes BAT93 et JaloEEP558 a notamment permis de cartographier quatre QTL sur les chromosomes 2, 5, 7 et 9 (Nodari *et al.*, 1993). Ces QTL expliquent 75% de la variation de tolérance observée entre BAT (résistant) et JaloEEP558 (sensible). Les QTL sont associés à différents marqueurs qui permettent de les localiser et de les introgresser dans des génotypes d'intérêt (Miklas *et al.*, 2006). C'est le cas de SAP6, QTL majeur de résistance à la CBB dérivé de la lignée Great Northern, qui a été utilisé pour générer des variétés résistantes en Amérique du nord et du sud (Miklas *et al.*, 2003).

La résistance à la CBB chez le haricot commun est donc complexe. Non seulement quantitative et polygénique, elle est également influencée par divers facteurs additionnels. En effet, la tolérance à la maladie et les gènes impliqués peuvent varier entre les différents organes du haricot, la maturité des plantes, l'environnement et les souches attaquant la plante (Opio *et al.*, 1996; Miklas *et al.*, 2006; Singh & Schwartz, 2010; Singh & Miklas, 2015). Ces facteurs

contribuent à la variabilité de l'expression des QTL de résistance, qui présentent également une héritabilité variable. Cette complexité globale fait que l'utilisation des QTL de résistance à la CBB pour améliorer le haricot est un défi délicat (Opio *et al.*, 1996; Singh & Schwartz, 2010).

Un aspect limitant à l'étude des gènes responsables de la résistance et à l'amélioration génétique du haricot commun de manière générale, est le manque de protocoles de transformation reproductible et universel. Bien qu'il y ait quelques exemples de cas de réussite de transformation (Aragão *et al.*, 1998; Bonfim *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2015), les protocoles demeurent dépendants des variétés et présentent encore des taux de transformation et de régénération très bas (Veltcheva *et al.*, 2005; Hnatuszko-konka *et al.*, 2014, 2019). L'adaptation des méthodes d'édition de gènes telle que CRISPR/Cas9 reste un défi à relever pour le haricot commun (Toili, 2022). Des méthodes d'expression transitoire basées sur l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* ou de silencing de gènes induit par un virus (VIGS) utilisant le virus de la marbrure des gousses du haricot ont été mises au point (Zhang *et al.*, 2013; Pflieger *et al.*, 2014; Richard *et al.*, 2021). Cependant l'expression ou l'extinction du gène ciblé demande plusieurs jours, ce qui peut être incompatible avec l'étude de certains bioagresseurs. Les génotypes utilisés pour l'approche VIGS doivent également être sensibles au virus, ce qui limite la diversité des variétés à étudier.

5. L'adaptation des *Xanthomonas* au haricot commun

Dans leurs histoires évolutives, les espèces phylogénétiquement distantes, *Xcf* et *Xpp*, ont convergé afin d'attaquer de manière similaire le haricot commun. Cette adaptation à l'hôte a été associée à des transferts horizontaux de nombreux gènes entre les différentes lignées génétiques, dont une majorité originaires de la lignée fuscans à destination de *Xpp* (Aritua *et al.*, 2015; Ruh *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Plus spécifiquement, les plasmides joueraient un rôle important dans ces transferts horizontaux. Ruh *et al.* (2017) et Chen *et al.* (2021b) ont ainsi émis l'hypothèse que *Xcf* a été le premier agent responsable de la maladie et que les transferts de nombreux gènes ont permis à l'ancêtre de *Xpp* de s'adapter au haricot commun. Plus d'une centaine de gènes sont associés à cette convergence pathologique entre les lignées de *Xcf* et *Xpp* (Aritua *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018). Parmi eux, 44 contiennent des polymorphismes non synonymes spécifiques aux agents de la CBB, dont des gènes en lien avec les SST2, SST3 et SST4, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle important dans l'adaptation au haricot commun (Chen *et al.*, 2018).

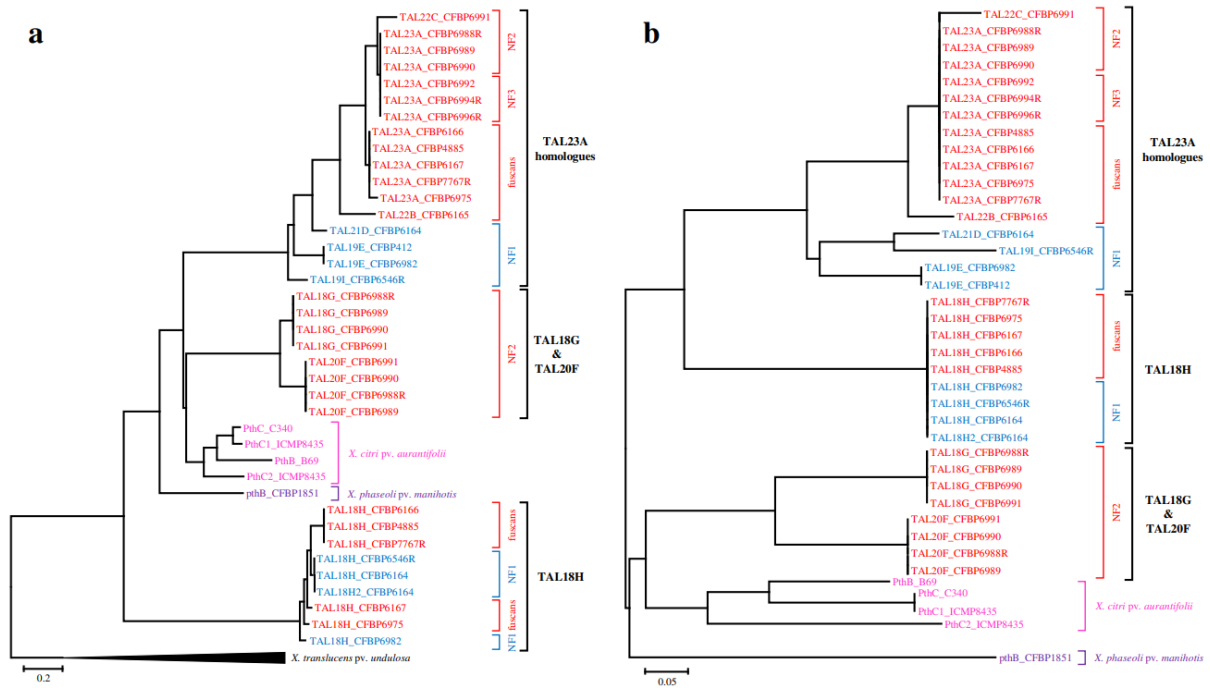


Figure 23. Phylogénie des régions répétées ou des séquences RVD des TALE des agents de la CBB (d'après Ruh *et al.*, 2017). Les TALE des lignées génétiques GL2 et GL3 sont indiqués en rouge, la lignée GL1 en bleu, *X. citri* pv. *aurantifolii* en rose et *X. phaseoli* pv. *manihotis* en violet. a) Classification phylogénétique des régions répétées des TALE. L'analyse a été réalisée sur les séquences d'acides aminés de la région répétée (hors RVD) des TALE, en utilisant huit TALE de *X. translucens* pv. *undulosa* XT4699 comme outgroups. b) Arbre de Neighbour Joining représentant la distance entre les séquences RVD. L'analyse a été effectuée sur les séquences RVD des TALE.

6. Les TALE chez *Xcf* et *Xpp*

La colonisation du haricot commun est facilitée par divers facteurs de virulence de *Xcf* et *Xpp*, incluant les différents systèmes de sécrétion. Par exemple, la souche CFBP6546R de *Xpp* possède un SST1, les deux SST2 (*xps* et *xcs*), un SST3 de type *hrp2*, le X-SST4, les SST5 Va et Vb et un SST6 (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021; Briand *et al.*, 2021). Toutes les souches ne possèdent cependant pas le même arsenal pour attaquer le haricot (Alavi *et al.*, 2008). Dans cette étude, toutes les lignées génétiques possèdent le SST3 de la famille *Hrp2*, tandis que seule la lignée GL1 possède un SST3 de la famille SPI-1. De plus, chaque souche possède un cocktail particulier de 14 à 29 ET3, dont des TALE (Hajri *et al.*, 2009; Darrasse *et al.*, 2013).

A ce jour, quatre gènes codant des TALE ont été décrits chez *Xcf* et *Xpp*, nommés *XfuTAL1*, *XfuTAL2*, *XfuTAL3* et *XfuTAL4* (Figure 23) (Darrasse *et al.*, 2013; Ruh *et al.*, 2017). Toutes les lignées possèdent *XfuTAL1*. *XfuTAL2* est partagé par les lignées GL1 et fuscans. *XfuTAL3* et 4 quant à eux sont spécifiques de la lignée GL2 (Ruh *et al.*, 2017). *XfuTAL1* est présent dans chacune des souches étudiées à ce jour, ce TALE semble donc être majeur pour la pathogénie de *Xcf* et *Xpp*. *XfuTAL1* et *XfuTAL2* ont été transmis par transfert horizontal entre *Xcf* et *Xpp* (Ruh *et al.*, 2017). Cela suggère que *XfuTAL1* et 2 ont été impliqués dans l'adaptation des *Xanthomonas* au haricot commun. L'importance de ces deux TALE est appuyée par le fait que deux souches, isolées à au moins 34 ans d'intervalle chez fuscans et chez GL1, contiennent des homologues de *XfuTAL1* et 2 indiquant leur maintien dans ces lignées sur plusieurs dizaines d'années. De manière assez intrigante, ces deux TALE se situent sur des plasmides distincts, suggérant que cette localisation plasmidique a pu faciliter leur transfert horizontal. A contrario, *XfuTAL3* et 4 se trouvent sur le chromosome. Ces deux TALE sont très similaires entre eux et divergent uniquement par deux RVD contigus. Cela et leur présence dans toutes les souches GL2, indiquent qu'ils correspondent à des paralogues issus d'une duplication antérieure à la diversification de la lignée GL2. Différentes combinaisons en TALE sont donc retrouvées dans chacune des lignées de *Xcf* et *Xpp*, ce qui indique que ces lignées ont évolué différents répertoires de TALE afin de manipuler le haricot (Ruh *et al.*, 2017).

VI. Problématique de la thèse et question de recherche

La CBB, causée par *Xcf* et *Xpp* est une bactériose d'importance majeure chez le haricot. Transmissible par la semence, la CBB représente une menace économique et agricole à la fois pour la production de haricot de consommation et pour l'industrie semencière (EFSA, 2014). Malgré les études antérieures sur la diversité des deux espèces responsables de la maladie et leur évolution convergente (Aritua et al., 2015; Ruh et al., 2017; Chen et al., 2018), la structuration mondiale des populations de *Xcf* et *Xpp* reste très peu étudiée (Chan & Goodwin, 1999; Mkandawire et al., 2004; Alavi et al., 2008). En particulier, la diversité des TALE, qui sont des acteurs clés dans la pathogénie de *Xanthomonas*, est restreinte à l'étude de 17 souches dont les génomes ont été séquencés (Ruh et al., 2017) dans le laboratoire où j'effectue mon doctorat.

Par ailleurs, la résistance à la graisse commune a été fortement étudiée, mettant en évidence une complexité génétique et multifactorielle considérable. Cependant aucun gène responsable de la résistance à la CBB n'a encore été cloné. Afin de mieux comprendre les mécanismes de cette résistance, une analyse transcriptomique par RNAseq a été précédemment réalisée au laboratoire, révélant une liste de gènes potentiellement impliqués dans le phénotype de résistance à la CBB (Foucher et al., 2020). Le rôle de ces gènes dans la résistance reste cependant à valider.

Dans ce contexte, la question de recherche de ma thèse a donc été la suivante :

Quelle est l'histoire évolutive des TALE chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot et quels sont les mécanismes impliqués dans la résistance du haricot à la graisse commune ?

Pour y répondre, j'ai scindé mon travail de sorte à atteindre deux objectifs correspondants aux deux chapitres de ce manuscrit.

Le premier objectif correspond à l'étude de la diversité des TALE dans la diversité des agents pathogènes du haricot. Pour cela, j'ai réalisé une analyse phylogénétique d'une diversité mondiale de souches de *Xcf* et *Xpp* ainsi que les séquences de leurs TALE. Cette étude couplée à une analyse de génétique des populations réalisée par d'autres membres de mon équipe d'accueil, vise à mieux comprendre la répartition des TALE dans les populations de *Xcf* et *Xpp* à une échelle mondiale.

Le second objectif est d'approfondir notre compréhension des mécanismes de résistance du haricot à la graisse commune par l'étude du rôle de gènes impliqués. Pour cela, je me suis

basée sur une approche utilisant des dTALE pour induire des gènes candidats dans un génotype de haricot sensible et ai réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq pour étudier l'impact de l'induction de l'un de ces gènes candidats sur le transcriptome du haricot.

Cette thèse contient également une annexe consacrée aux projets de vulgarisation auxquels j'ai participé au cours ces trois ans.

Chapitre 1 : Etude de la diversité des agents de la graisse commune du haricot et de leurs TALE.

I. Préambule

L'une des particularités des agents responsables de la graisse commune du haricot réside dans leur capacité à attaquer le haricot de manière similaire, malgré leur appartenance à deux pathovars inclus dans deux espèces phylogénétiquement éloignées, *X. citri* pv. *fuscans* (*Xcf*) et *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*). Les mécanismes de cette évolution convergente ont été décryptés par des études de génomique comparative qui ont révélé des transferts horizontaux de nombreux gènes entre *Xcf* et *Xpp* (Aritua *et al.*, 2015; Ruh *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Dans le but de mieux caractériser la diversité des *Xanthomonas* responsables de la CBB à une échelle mondiale, une étude a été conduite par une approche de MLVA pour explorer la diversité de 106 souches. La diversité de leurs TALE a également été évaluée, dans l'espoir d'en identifier de nouveaux. Ces travaux ont mis en lumière neuf souches d'agents responsables de la CBB présentant une forte diversité à la fois dans leurs profils MLVA et TALE. Le séquençage de ces neuf souches a été publié dans Microbiology Resource Announcements. J'ai rédigé cet article et en suis première auteure.

Avec l'aide de Martial Briand, j'ai réalisé l'analyse phylogénétique des souches sur la base de leurs génomes complets, j'ai réalisé une phylogénie des TALE ainsi que la diversité des séquences RVD des TALE et participé à la prédiction de leurs cibles potentielles. Les résultats de cette étude ainsi que l'approche MLVA sont décrits dans un article, dont je suis co-première-auteure, qui sera prochainement soumis pour publication. Pour cet article, j'ai produit l'ensemble des figures relatives aux analyses phylogénétiques sur génomes complets et TALE (Figures 4, 5 et 6) et rédigé le premier jet des sections correspondantes de l'article (Matériels et Méthodes et Résultats).



Whole Genome Sequences of Nine *Xanthomonas* Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean

Charlotte Gaudin,^a Christopher Gihaut,^a Martial Briand,^a Abi S. A. Marques,^b Marisa A. S. V. Ferreira,^c Marie-Agnès Jacques,^a Nicolas W. G. Chen^a

^aUniversité Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, Angers, France

^bPlant Quarantine Station, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

^cDepartamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

ABSTRACT We report the complete and circularized genome sequences of nine strains of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, which cause common bacterial blight of bean. These assemblies provide high-quality material for functional and evolutionary studies of these legume pathogens.

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is an important legume crop for direct human consumption that is used worldwide for its edible pods and seeds (1). Common bacterial blight (CBB) is a devastating seed-borne bacterial disease that represents an important economic and agricultural threat to both common bean production and the seed industry worldwide (2). CBB is caused by two phylogenetically distant bacterial species that cause identical symptoms on common bean, i.e., *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (2). These two species are subdivided into four genetic lineages. *X. phaseoli* pv. *phaseoli* corresponds to lineage GL1, while *X. citri* pv. *fuscans* comprises lineages GL2, GL3, and *fuscans* (2, 3).

Here, we produced Pacific Biosciences (PacBio) high-fidelity (HiFi) genome sequences of nine strains that had been isolated from *Phaseolus vulgaris* plants in different regions of the world and belonged to either GL1, GL2, or *fuscans* lineages (Table 1). Strains were isolated from symptomatic leaflets as described previously (4). The status as a CBB agent was confirmed by pathogenicity tests and sequencing of the housekeeping gene *gyrB* (5). Bacteria were grown on Trypticase soy (TS) agar medium for 2 days at 28°C, and then 5 or 6 clones were scraped, pooled, and cultured overnight in 100% TS broth to obtain fresh cultures. One milliliter of overnight culture was centrifuged for 2 min at 13,000 × *g*. Genomic DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations. DNA was mechanically sheared using g-TUBE columns (Covaris) and purified using PacBio AMPure PB beads. PacBio HiFi SMRTbell libraries were prepared from ~1 µg of genomic DNA using the SMRTbell Express template preparation kit v2.0. Single-molecule real-time (SMRT) sequencing was performed on a PacBio Sequel II system using the Sequel II binding kit v2.2, sequencing primer v5, and Sequel II sequencing plate v2.0.

PacBio reads were filtered and demultiplexed using the ccs v6.3.0 and lima v2.5.1 tools of the PacBio SMRT Tools v11.0.0.146107 toolkit and then assembled and circularized using Flye v2.9 (<https://github.com/fenderglass/Flye>) (6). For the BB007a strain, assembly and circularization were performed again using preselection of reads with Filtlong (<https://github.com/rwick/Filtlong>). Circularization failed for strains BRM48906 and UnB187. For circularized genomes, the sequence start was fixed using the fixstart option of Circlator v1.5.1 (7). Polishing was performed using Flye v2.9 (6).

The genome sequences consisted of 5,101,251 to 5,242,207 bp, forming a chromosome plus 1 to 3 plasmids, with an average G+C content of 64.7% (Table 1). A total of 4,038 to 4,236 predicted protein-coding sequences (CDSs) were identified using the NCBI Prokaryotic

Editor David A. Baltrus, University of Arizona

Copyright © 2023 Gaudin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Nicolas W. G. Chen, nicolas.chen@agrocampus-ouest.fr.

The authors declare no conflict of interest.

[This article was published on 13 February 2023 with information missing from the Acknowledgments section. The section was updated in the current version, posted on 16 March 2023.]

Received 1 December 2022

Accepted 13 January 2023

Published 13 February 2023

TABLE 1 Accession numbers and statistics

Pathovar	Lineage	Strain	Country (date) of collection	No. of reads ^a	Coverage (x)	N ₅₀ (bp) ^a	SRA accession no.	GenBank assembly no.	Size (bp)	G+C content (%)	No. of plasmids	No. of CDs	Source or collection
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	GL1	Un8187	Brazil (1981)	40,024	61	10,755	SRR22094557	GCA_025987765.1	5,217,655	64.9	2	4,187	This study
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	GL1	BB007a	USA (2007)	94,609	141	10,404	SRR22094556	GCA_025987745.1	5,242,207	64.8	1	4,236	This study
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	GL1	CFBP 7423	Iran (2006)	73,335	111	10,510	SRR22094555	GCA_025987785.1	5,214,828	64.8	3	4,209	CIRM-CFBP ^b
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	GL1	BB075a	USA (2014)	86,101	130	10,373	SRR22094554	GCA_025987725.1	5,161,803	64.9	2	4,145	This study
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	GL1	BB013a	USA (2007)	118,064	177	10,200	SRR22094553	GCA_025987685.1	5,199,960	64.8	2	4,194	This study
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	GL2	CFBP 6533	Tunisia (1989)	71,377	103	10,250	SRR22094552	GCA_025987705.1	5,154,616	64.6	1	4,209	CIRM-CFBP ^b
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	GL2	BRM48906	Brazil (2014)	42,986	64	10,574	SRR22094551	GCA_025987665.1	5,230,237	64.6	2	4,234	This study
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	GL2	LNPV 30.30	China (2006)	93,288	146	10,736	SRR22094550	GCA_025987645.1	5,156,952	64.6	1	4,212	This study
<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	Fuscans	X1008017	France (2010)	144,222	211	10,204	SRR22094549	GCA_025987485.1	5,101,251	64.7	2	4,038	This study

^a Calculated with the n50 tool (<https://github.com/quadrant-institute-bioscience/seqfu/wiki/n50>).

^b CIRM-CFBP, International Centre for Microbial Resources-French Collection for Plant-Associated Bacteria, INRAE (<https://doi.org/10.15454/EBXX-4Z18>).

Genome Annotation Pipeline (PGAP) (8). Genome sequences were estimated to be >99.3% complete and <0.02% contaminated using CheckM v1.1.6 (9). Chromosomes were assembled in 1 contig except for strain X1008017, with 2 contigs. Every strain contained plasmid A, which is consistent with previous data for CBB agents (10) and reinforced the idea that plasmid A was involved in the pathological convergence on bean by these two species (11). Each genome sequence included the usual arsenal of genes involved in pathogenicity, compared to the reference strain CFBP 4834-R (12), although the GL1 and GL2 lineages showed polymorphism in important components such as the lipopolysaccharide and secretion systems. These assemblies provide high-quality material for functional and evolutionary studies of these common bean pathogens.

Data availability. The reads and assemblies were all deposited in GenBank under the accession numbers listed in Table 1.

ACKNOWLEDGMENTS

Sequencing was performed at the GENTYANE sequencing platform (INRAE, Clermont-Ferrand, France). We thank the Limagrain group for funding the sequencing costs and providing strains isolated on bean seeds. C. Gaudin was funded by a Ph.D. grant (CRISTAL project) cofunded by L'Institut Agro Rennes-Angers and the French Pays de Loire region.

We thank Killian Grilloton for his help in DNA extractions and the CIRM-CFBP (<https://doi.org/10.15454/E8XX-4Z18>) for the handling of strains CFBP 7423 and CFBP 6533. Strain LNPV 30.30 was provided by ANSES—Laboratoire de santé des végétaux, Angers, France.

REFERENCES

1. Bitocchi E, Rau D, Bellucci E, Rodriguez M, Murgia ML, Gioia T, Santo D, Nanni L, Attene G, Papa R. 2017. Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. *Front Plant Sci* 8:722. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00722>.
2. Chen NWG, Ruh M, Darrasse A, Foucher J, Briand M, Costa J, Studholme DJ, Jacques MA. 2021. Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Mol Plant Pathol* 22:1464–1480. <https://doi.org/10.1111/mpp.13067>.
3. Alavi SM, Sanjari S, Durand F, Brin C, Manceau C, Poussier S. 2008. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Appl Environ Microbiol* 74:3295–3301. <https://doi.org/10.1128/AEM.02507-07>.
4. Jacques M, Josi K, Darrasse A, Samson R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl Environ Microbiol* 71:2008–2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2008-2015.2005>.
5. Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* 31:366–377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>.
6. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol* 37:540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>.
7. Hunt M, De Silva N, Otto TD, Parkhill J, Keane JA, Harris SR. 2015. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biol* 16:294. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0849-0>.
8. Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
9. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.
10. Ruh M, Briand M, Bonneau S, Jacques MA, Chen NWG. 2017. *Xanthomonas* adaptation to common bean is associated with horizontal transfers of genes encoding TAL effectors. *BMC Genomics* 18:670. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4087-6>.
11. Chen NWG, Serres-Giardi L, Ruh M, Briand M, Bonneau S, Darrasse A, Barbe V, Gagnevin L, Koebnik R, Jacques MA. 2018. Horizontal gene transfer plays a major role in the pathological convergence of *Xanthomonas* lineages on common bean. *BMC Genomics* 19:606. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4975-4>.
12. Darrasse A, Carrère S, Barbe V, Boureau T, Arrieta-Ortiz ML, Bonneau S, Briand M, Brin C, Cociancich S, Durand K, Fouteau S, Gagnevin L, Guérin F, Guy E, Indiana A, Koebnik R, Lauber E, Munoz A, Noël LD, Pieretti I, Poussier S, Pruvost O, Robène-Soustrade I, Rott P, Royer M, Serres-Giardi L, Szurek B, van Sluys MA, Verdier V, Vernière C, Arlat M, Manceau C, Jacques MA. 2013. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* 14:761. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-761>.

II. Worldwide diversity of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* reveals distinct evolution patterns for transcription activator-like effectors.

Christopher GIHAUT^{1*}, Charlotte GAUDIN^{1*}, Euvaris SOME², Martial BRIAND¹, Alvaro PEREZ-QUINTERO³, Karine DURAND¹, Abi S.A. MARQUES⁴, Marisa A.S.V. FERREIRA⁵, Gabriel MAHBOU SOMO TOUKAM⁶, Issa WONNI², Marie-Agnès JACQUES¹, Sophie CESBRON¹, Nicolas W.G. CHEN¹.

¹Univ Angers, institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

²INERA, Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles du Burkina Faso, Laboratoire de Phytopathologie, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

³Plant Health Institute of Montpellier (PHIM), University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France

⁴Plant Quarantine Station, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

⁵ Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁶Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Cameroon

* equal contribution

#Correspondence to: nicolas.chen@agrocampus-ouest.fr

ABSTRACT

Common bacterial blight (CBB) is a major disease of common bean caused by four phylogenetically distinct genetic lineages (GL) belonging to *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (GL1) and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (GL2, GL3 and *fuscans*). To analyse the structuration of these lineages at a global scale, we used a worldwide collection of strains (n=106) including reference strains from each lineage. GL1 was the most prevalent lineage in the USA while *fuscans* prevailed in France, Brazil and Cameroon. GL2 strains, although less frequent, were for the first time observed in China, Tunisia and Brazil, in addition to their already known presence on Reunion Island. On another hand, GL3 appeared to be endemic to East Africa. Development and use of a MultiLocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) scheme based on seven loci revealed intercontinental clonal complexes for *fuscans*, GL1 and GL2 lineages, indicative of frequent exchanges at a worldwide level. Analysis of

transcription activator-like effectors (TALE) revealed distinct TALE repertoires for each CBB lineage, indicating lineage-specific adaptations to common bean. Detection of a plasmidic type II toxin-antitoxin system conserved across all lineages and specific to CBB agents suggests that this system could be key to host specificity. Our study helps better understanding the diversity of CBB pathogens and their pathological convergence towards common bean, which has important practical implications with regard to genetic control of the disease.

INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume crop cultivated on all continents as a food-producing crop for its seeds (dry and fresh) and immature pods (French bean), which represents a significant source of nutrients in many countries (Broughton et al. 2003; Petry et al. 2015). Common bacterial blight (CBB) is a devastating seed-transmitted disease, present in all bean production areas (Chen et al. 2021). This disease represents an important economic and agricultural threat to both edible bean production and bean seed industry worldwide. CBB is caused by two phylogenetically distant bacterial species, *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *X. citri* pv. *fuscans*, yet developing undistinguishable symptoms on common bean (Constantin et al. 2016). *X. citri* pv. *fuscans* is subdivided in three genetic lineages called GL2, GL3 and fuscans, while only one lineage called GL1 was described for *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Chen et al. 2021).

Upon infection, *Xanthomonas* relies on a type three secretion system (T3SS) able to inject type three effectors (T3E) into the plant cell to promote virulence and/or aggressiveness (Büttner and Bonas 2010; Timilsina et al. 2020). Among T3Es, transcription activator-like effectors (TALEs) are complex proteins that mimic eukaryotic transcription factors to hijack the cell transcriptional machinery (Perez-Quintero and Szurek 2019). The central part of a TALE is composed of a number of repeats ranging from 33 to 35 amino acids each, forming a helicoidal structure able to wrap around DNA within the host cell (Deng et al. 2012; Nga-Sze Mak et al. 2012). Within a repeat, the amino acid pair at position 12 and 13, called repeat variable di-residue (RVD), is responsible for specific binding to DNA through an encryption link named as the TALE code (Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). As a result, the number of repeats and the RVD sequence within them determine the specificity of TALE binding to a DNA sequence called effector binding element (EBE), usually located in the promoter of a target gene to be induced (Perez-Quintero and Szurek 2019). The deciphering of the TALE code led to the development of bioinformatics tools to predict potential EBEs within

a plant genome (Doyle et al. 2012; Erkes et al. 2019; Grau et al. 2013; Pérez-Quintero et al. 2013). Most known TALE targets correspond to susceptibility genes whose induction favours symptom development (Boch, Bonas, and Lahaye 2014).

Previous whole-genome sequencing of 17 *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains revealed the existence of four TALE-encoding genes named *Xfuta1* to *Xfuta4* (Ruh et al. 2017). Interestingly, *Xfuta1* and *Xfuta2* were located on plasmids and shared between *Xcp* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* through recent horizontal gene transfers, while *Xfuta3* and *Xfuta4* were chromosomic and specific to the GL2 lineage of *X. citri* pv. *fuscans* (Ruh et al. 2017). Apart from this analysis, nothing is known about the diversity of TALEs in *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* populations on a global scale. Moreover, little is known about the diversity of CBB agents as such, except for few analyses based on Rep-PCR or amplification fragment-length polymorphism (Alavi et al. 2008; Duncan, Singh, and Gilbertson 2011; Mahuku et al. 2006; Mkandawire et al. 2004).

In order to characterise a worldwide diversity of *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, we isolated strains from common bean seeds and symptomatic plants from Brazil, Cameroon, France and the United States of America. Using previous genomic data, we searched for polymorphic microsatellite markers called variable number of tandem repeats (VNTRs) shared by *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* to develop a multilocus VNTR analysis (MLVA) (Schouls et al. 2004). To study the diversity of TALEs, we built TALE-specific PCR primers to identify the TALE profiles of these strains, and sequenced nine strains presenting either new TALE profiles or other interesting patterns.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growing conditions and DNA extraction

Xanthomonas strains used in this study are listed in Supplemental table 1. Strains were isolated from common bean leaves, pods or seeds collected in diverse countries between 1954 and 2017. Most strains came from seed lots produced in France (2006 to 2015, 21 strains) and the USA (2004 to 2017, 18 strains), or from symptomatic fields in Cameroon (2009, 17 strains) and Brazil (1990, 2013 and 2014, 9 strains). The other strains were provided by collections such as the CIRM-CFBP (31 strains), ANSES (5 strains), SNES-GEVES (3 strains) and CIAT (2 strains). For routine experiments, strains were grown at 28°C in trypticase soy broth (17.0 g.L⁻¹ pancreatic digest of casein; 3.0 g.L⁻¹ enzymatic digest of soy bean; 5.0 g.L⁻¹ NaCl; 2.5 g.L⁻¹

K₂HPO₄; 2.5 g.L⁻¹ glucose; qsp 1L H₂O) or plated on trypticase soy agar (TSA, *i.e.* trypticase soy broth supplemented with agar at 15 g.L⁻¹). Following first 2-3day plating on TSA, strains were plated for 24h at 28°C on a 1/10 dilution of TSA (except for agar kept at 15 g.L⁻¹) to obtain fresh bacterial cultures. Genomic DNA was extracted from 24h-old liquid cultures using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega; ref.A1120) following manufacturer's recommendations. Quality and quantity of DNA were assessed using a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer.

PCR amplification of *gyrB* and TALE-encoding genes

PCR amplifications were performed in a final volume of 50µL, comprising 0.2µL of GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5U/µL) (Promega; ref.M7805), 10µL of Green Buffer Flexi GoTaq (5X), 3µL of MgCl₂ (25mM), 4µL of dNTP (2.5mM each) (Promega; ref. U1515), 0.25µL primer corresponding to 20µM each, 2µL of DNA, 25.3µL of nuclease-free water. For amplification of TALE-encoding genes, 5µL of water were replaced by betaine (50mM) to facilitate PCR reaction. PCR products were run on a 1% agarose gel electrophoresis to assess amplicon sizes. All primers are listed in Supplemental table 2. For *gyrB*, PCR products were sequenced by the Sanger method at Genoscreen (France).

Phylogenetic analyses

Alignment of nucleotide (*gyrB*) or amino-acid (TALE) sequences was performed with MAFFT v7.308 using the L-ins-i strategy (Katoh et al. 2002; Katoh and Standley 2013). For TALEs, the amino-acid alignment was used as a template to make a nucleotide alignment using RevTrans 2.0 (Wernersson and Pedersen 2003). Maximum Likelihood phylogenetic trees were constructed using PhyML with 1,000 bootstrap iterations (Guindon et al. 2010).

VNTR primers

Primers used for MLVA were chosen based on their ability to amplify polymorphic tandem repeat loci common to both *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains. We started from 82 VNTR primer pairs either designed *de novo* on the genome of *X. citri* pv. *fuscans* strain CFBP4885 (Darrasse et al. 2013) or previously designed for VNTR amplification on *X. phaseoli* pv. *manihotis* (Arrieta-Ortiz et al. 2013), *X. citri* pv. *viticola* (Ferreira et al. 2019) and *X. citri* pv. *citri* (Bui Thi Ngoc et al. 2009). These 82 primer pairs were tested *in silico* using the genomes of 17 *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains previously sequenced (Briand et al. 2021). For 27 primer pairs common to *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv.

phaseoli, the size of the offset, the repeat motif and the number of tandem repeats were checked on the 17 aforementioned *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* genome sequences (Ruh et al. 2017) using Tandem repeats finder (Benson 1999) and Geneious v9.1.9 (<https://www.geneious.com>). This allowed us to selected seven conserved VNTR primer pairs, which were confirmed by PCR on the same 17 strains, then used for MLVA analysis (Supplemental table 1 ; Supplemental table 2). Discriminatory power of each VNTR was assessed using the Hunter-Gaston index (Hunter 1990; Hunter and Gaston 1988).

MLVA analysis

For each VNTR, the forward primer was labelled using one of three dyes (Supplemental table 2). PCR reaction was composed of 0.05µL of GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase at 5U/µL (Promega; ref.M7805), 4µL of Green Buffer Flexi GoTaq 5X, 1.2µL of MgCl₂ at 25mM, 0.5µL of dNTP at 2.5mM each, 0.25µL of each primer at 10µM, 1µL of genomic DNA, q.s.p. nuclease-free water to reach the final volume of 20µL. PCR amplifications were performed on a T100™ thermal cycler (Biorad), starting with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 32 amplification cycles consisting of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at annealing temperature for 30 s, elongation at 72°C for 30 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR products were multiplexed depending on the fluorescent dyes used, then diluted at 1/32 in ultrapure water. Then, 2.4µL of each multiplexed PCR product was mixed with 9.35µL of Hi-Di formamide and 0.15µL of Genscan 500 Liz internal line size standard for four-capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3130 genetic analyzer. Electrophoregrams were analysed using Peakscanner (Applied Biosystems) and each Liz peak was checked by eye. The amplicon size was read by eye and artefacts, or small peaks, were corrected. The number of tandem repeats (N) for each strain was calculated using the following equation: $N = (\text{amplicon size} - \text{offset size}) / \text{repeat size}$. In case of truncated repeat, copy number was rounded up to the next integer so that strains potentially having a single truncated element will be scored as 1 rather than 0, which might be confused with amplification failure (Ciarroni et al. 2015). To test the representativity of the dataset, allelic richness by rarefaction was estimated using HP-RARE v1.0 (Kalinowski 2005) and rarefaction curves were drawn for each MST on R studio v.1.3.1073 (Supplemental fig. 1). Clustering of allelic profiles was performed with PHYLOVIZ (Francisco et al. 2012), and minimum spanning trees (MST) were built with the goeBURST full MST algorithm.

Whole genome sequence data set and phylogeny

The whole genome sequence data set is described in Supplemental table 3. Briefly, whole genome sequences of the *Xanthomonas* genus were retrieved from the NCBI database (as of march 28th 2023) and their quality was assessed using single copy markers with CheckM v1.1.6 (Parks et al. 2015). Genome sequences affiliated to *Xanthomonas* with less than ten missing or multicopy CheckM markers were retained. A first phylogenetic tree was built using AutoMLST (Alanjary, Steinke, and Ziemert 2019). From this, we selected the subtree at the node comprising *X. citri* and *X. phaseoli* species (Supplemental fig. 2), which included both pathovars of CBB agents (Constantin et al. 2016). For further analysis, only genome sequences considered as “complete” according to the NCBI database were retained (plus strain 1008017) and duplicates were excluded. This data set of 154 genomes was analysed with Parsnp v.1.5.4 to identify single nucleotide polymorphisms. Recombination events were identified and removed using ClonalFrameML v1.12 (Didelot and Wilson 2015). The final phylogenetic tree was constructed using RaxML v.8.2.12 with 1000 bootstrap (Stamatakis 2014).

TALE analysis

TALE-encoding genes were retrieved by Blastn v2.11.0+ (Altschul et al. 1990) on the same genome sequence data set as described above, using nucleotide sequences of the N-ter (870 bp) and C-ter (843 bp) regions of *XfuTAL1* from strain CFBP4885 as queries (Ruh et al. 2017). TALEs containing gaps or premature STOP codons were removed from further analysis, except for TALEs with previously corrected sequences, which were manually edited (Ruh et al. 2017). The resulting data set consisted of 428 TALE-encoding genes including 77 from *X. citri* pv. *fuscans* or *X. phaseoli* pv. *phaseoli* genome sequences (data not shown). Phylogeny was performed separately on conserved N-ter and C-ter regions, as described above. The diversity of RVD sequences from CBB strains TALEs was analysed with FuncTAL v1.1, a program designed to identify TALE with a similar DNA-binding capabilities (Pérez-Quintero et al. 2015). TALE target (EBE) predictions were done with TAL Effector Nucleotide Targeter (TALE-NT) v2.0 (Doyle et al. 2012), Talvez (Pérez-Quintero et al. 2013) and PrediTALE (Erkes et al. 2019) on the promoterome of common bean reference genome (Schmutz et al. 2014), consisting of the 5'-UTR plus 500 bp for each annotated gene.

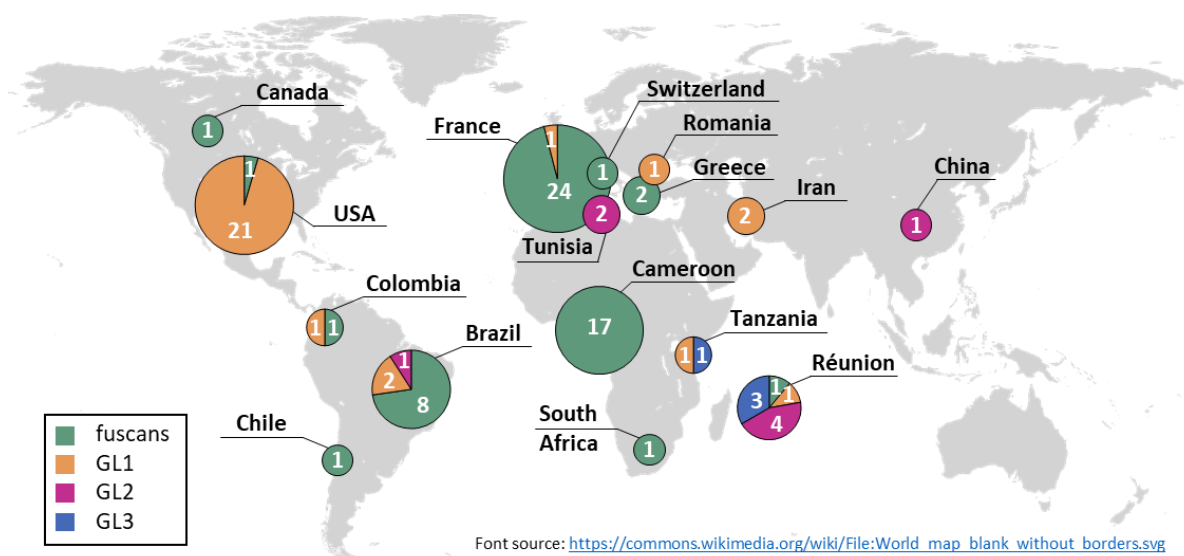


Figure 1. Worldwide distribution and number of strains used in this study.

RESULTS

Geographical distribution of CBB agents differs depending on genetic lineages.

To analyze the diversity of CBB agents on a global scale, we used 106 strains isolated from 16 different countries from Europe, North and South Americas, Africa and Asia (Supplemental table 1). Sequencing of the housekeeping gene *gyrB* was used to assess the belonging of these strains to either *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (i.e. GL1) or to genetic lineages fuscans, GL2 or GL3 from *X. citri* pv. *fuscans* (not shown). Fuscans was the most frequent lineage (62 strains), followed by GL1 (31), GL2 (9) and GL3 (4). Besides varying in proportion, these lineages also differed in terms of their distribution around the world (Fig. 1). The most striking observation was that both fuscans and GL1 lineages had a worldwide distribution except for fuscans in Asia, which was probably due to less sampling efforts in this area. However, fuscans was prominent in Europe, Africa and South America, while GL1 was by far the most frequent lineage in the USA. Despite being less frequent, GL2 strains were isolated from four different continents, suggesting that GL2 lineage may have been underestimated so far. With only four strains, GL3 appeared to be restricted to a small geographical area in the west of the Indian Ocean.

In countries where more than one strain was isolated, presence of at least two lineages was usually observed, including both *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains (Fig. 1). For example, a large diversity was observed in Brazil, where three lineages were isolated. La Réunion island was a special case. Indeed, as previously described, the four genetic lineages were retrieved in this small island (Alavi et al. 2008; Chen et al. 2018). These strains were isolated during the same isolation campaign in 2000, indicating that all CBB agent lineages coexisted at this place at the same time. These results indicated that sympatry existed between the different lineages of CBB agents. Moreover, GL2 and GL3 strains were more abundant than GL1 and fuscans in this region, as it was the case for China and Tunisia where only GL2 strains were isolated. This would suggest that GL2 and GL3 strains may be more abundant in the Pacific, Asian and/or North African regions, which have not been thoroughly prospected so far.

***X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* present distinct spatial structuration.**

To further analyze the structuration of CBB agent populations, we built a MLVA scheme including seven VNTR markers conserved across all CBB genetic lineages (Supplemental table 2) and constructed separate minimum spanning trees (MST) for *X. citri* pv.

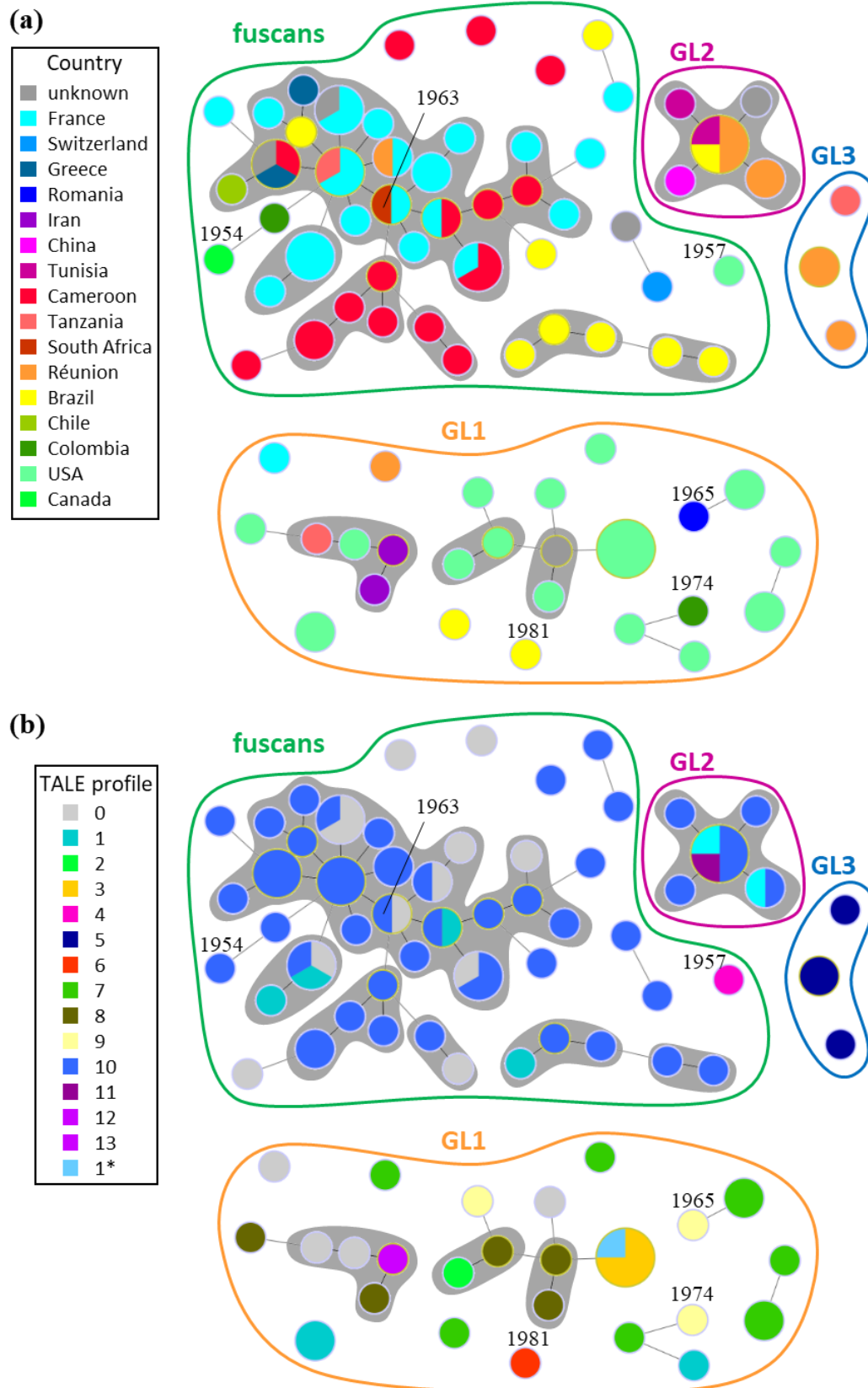


Figure 2. Minimum spanning tree (MST) representation of the MLVA clustering. Each circle represents a unique MLVA haplotype and its size is proportional to the number of strains within it. Branch length is proportional to the number of loci differing between two haplotypes. No link is indicative of variations at more than two loci. Grey halos indicate clonal complexes. MSTs were drawn separately for *X. citri* pv. *fuscans* (*fuscans*, GL2 and GL3) and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (GL1). For each strain, the color represents (a) the country of origin or (b) the TALE profile according to PCR (similar profiles have similar colors). For each species, years are indicated for the three oldest strains in our dataset.

fuscans and *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, respectively (Fig. 2). Despite being scattered across all continents and being isolated over more than five decades, *X. citri* pv. *fuscans* strains displayed a rather clonal structure (Fig. 2a). Indeed, the *fuscans* lineage was distributed around a major clonal complex comprising 32 strains from eight different countries, while GL2 strains were all clustered within a single clonal complex. The GL3 strains were more distant from each other, except for two strains from La Réunion island; which clustered together. This structuration could reflect different waves of disseminations of *X. citri* pv. *fuscans* strains around the globe through seed trade. This hypothesis was supported both by the existence of multi-country clones in *fuscans* and GL2 lineages and by the distribution of *fuscans* strains from Cameroon (red), France (light blue) and Brazil (yellow), which were scattered into small subpopulations closely linked to other countries. For example, all strains from Cameroon were isolated during a single campaign in 2009, but grouped in clusters separated by strains isolated at different dates in other countries, suggesting distinct origins for these clusters. Most strains from France were isolated in 2010 and 2011 and grouped together with strains from Cameroon isolated just one year before. This suggests that multiple exchanges occurred between the two countries at that time. For both countries, smaller clonal complexes specific to one country were indicative of local expansions. This was also the case for Brazilian strains isolated in 2013-2014, which formed a cluster apart from other countries.

By contrast to *X. citri* pv. *fuscans*, GL1 strains presented a higher genetic diversity, with most variations occurring at two loci or more between isolated strains (Fig. 2a). Three small clonal complexes comprising two to four strains were observed. This structuration suggested that *X. phaseoli* pv. *phaseoli* was less active than *X. citri* pv. *fuscans* in terms of dissemination events. However, one clonal complex grouped strains from Iran, Tanzania and USA, suggesting intercontinental dissemination of closely-related strains. Overall, most GL1 strains originated from the USA, which would suggest a North American origin for this pathovar. Intriguingly, the three oldest GL1 strains from our data set were from Greece, Colombia and Brazil, while most GL1 strains retrieved in the USA were isolated from 2004 onwards except one from 1990. By contrast, the only two *fuscans* strains from North America were also the oldest (Fig. 2a). Thus, it's tempting to speculate that *fuscans* strains formerly existing in North America were later replaced by *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, while *X. citri* pv. *fuscans* lineages took the upper hand in other places in the world.

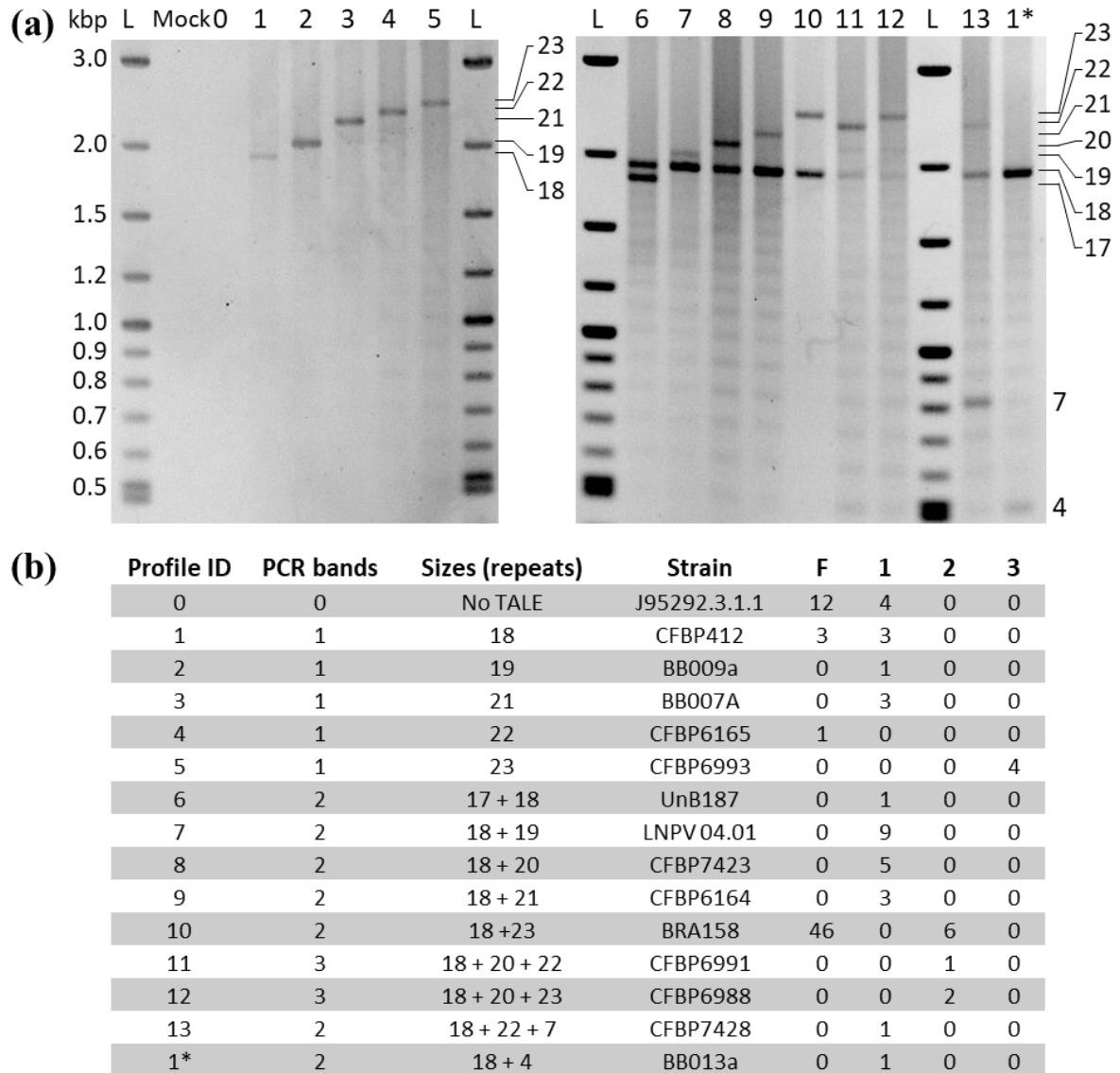


Figure 3. TALE PCR profiles. (a) Electrophoresis gels after PCR amplification using TALE-specific primers. Numbers on the right correspond to predicted number of internal repeats based on genomic data. L: ladder. Stars indicate bands putatively corresponding to shorter TALEs in profiles 13 and 1*. (b) Summary of TALE profiles. The strains used for PCR assay are indicated. Numbers in the four last columns indicate the number of strains in which each TALE profile was retrieved within each lineage (F: fuscans, 1: GL1, 2: GL2, 3: GL3).

CBB agent bear lineage-specific TALE repertoires

To analyze the TALE content of CBB agents, we designed specific PCR primers to amplify the central domain of TALE-encoding genes, composed of tandem repeats possibly varying in numbers through recombination events. PCR product sizes ranged from 17 to 23 predicted repeats, although few strains also contained smaller bands corresponding to TALEs of 7 or 4 repeats, respectively (Fig. 3). In all, we identified 15 PCR profiles comprising zero to three TALE bands per strain, suggesting that some strains do not bear any TALE-encoding genes while other have three or more, due to potential overlapping bands. A band corresponding to 18 repeats was comprised in nine out of the 15 profiles and this band was retrieved in 76 out of the 106 strains, suggesting that a 18-repeat TALE was conserved among most CBB agents, except in GL3 where it was not detected in any strain (Fig. 3b). Another TALE band of 23 repeats was conserved across most *X. citri* pv. *fuscans* strains, including all strains in GL3, 8/9 in GL2 and 46/62 in *fuscans*, but this band was never amplified in *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. This suggested that a TALE of 23 repeats was important for the life of most *X. citri* pv. *fuscans* strains, while it was not for *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains.

In all, CBB genetic lineages presented very distinct TALE profiles compared to each other (Fig. 2b ; Fig. 3b). Indeed, except for profiles 0 and 1 that were retrieved in both *fuscans* and GL1 and profile 10 in *fuscans* and GL2, other TALE profiles were not shared between lineages, indicating a lineage-specific structuration of TALE repertoires in CBB agents. Within *X. citri* pv. *fuscans*, the *fuscans* and GL2 lineages presented a core repertoire corresponding to profile 10, which was shared by a majority of *fuscans* and GL2 strains. However, some strains from the *fuscans* variants presented profiles corresponding to a loss of TALE-encoding genes (one or zero PCR bands), while GL2 variants acquired a TALE with 20 repeats, leading to three TALE bands (Fig. 2b). On the other hand, GL3 strains had a specific, simple profile, with all strains presenting a unique 23-repeat band. Within *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, strains presented different TALE profiles, which were much more diversified than in any other lineage. Indeed, this lineage was the only one presenting TALE profiles with 19 or 21 repeats, as well as smaller bands corresponding to 7- or 4-repeat TALEs. These specific bands were observed for 18/31 strains, indicating that most strains carry TALE-encoding genes that are specific to GL1. This GL1-specific diversification of TALEs may be due, in part, to the high diversity observed between GL1 strains.

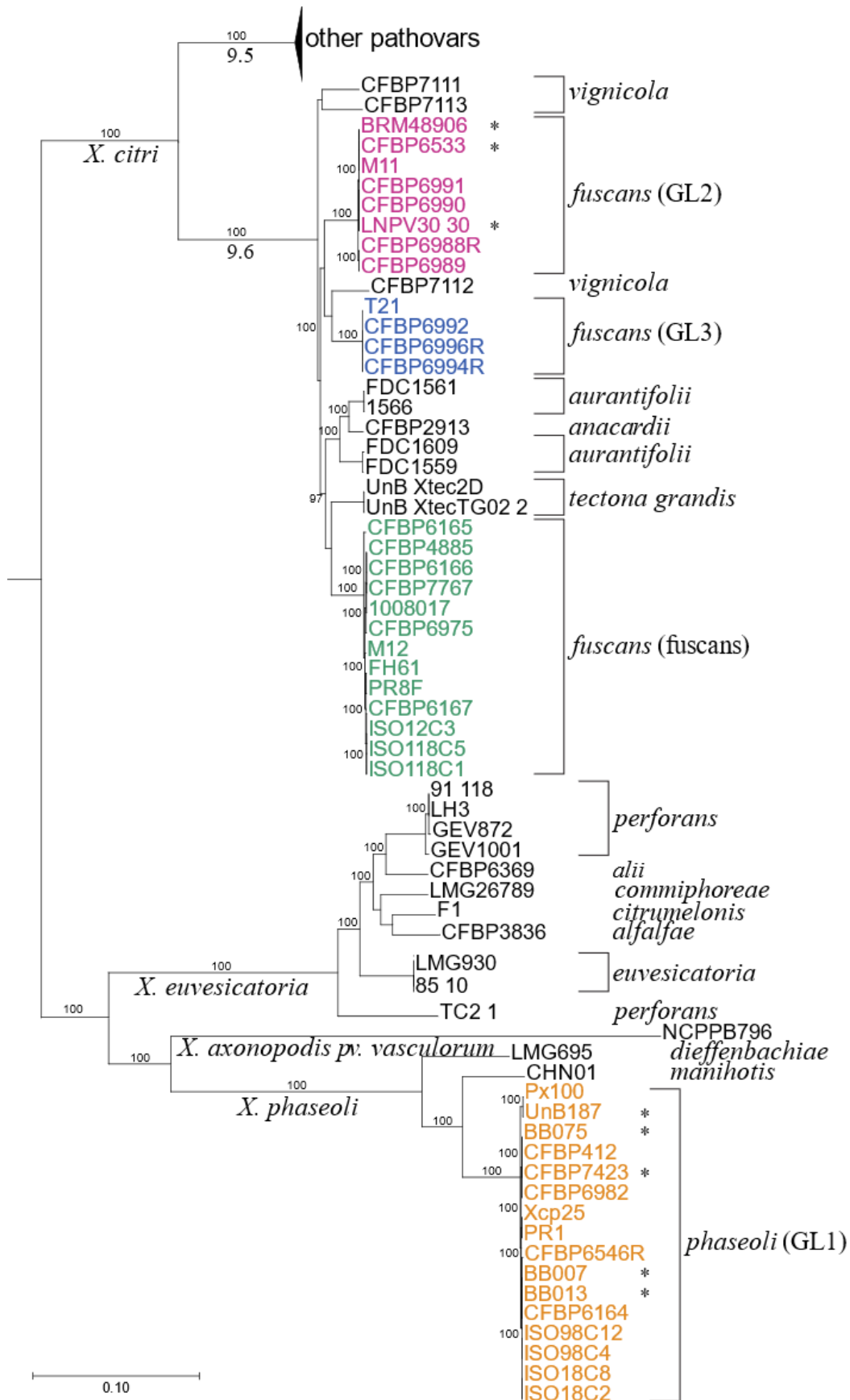


Figure 4. Genome-based phylogeny of sequenced strains. This tree was constructed using RaxML v. 8 (Stamatakis, 2014) based on complete genome sequence data available at the NCBI database. Species and rep-PCR 9.5 and 9.6 (Rademaker et al., 2005) are indicated at nodes, while brackets to the right correspond to pathovars. Number at nodes represent bootstraps after 1,000 iterations.

Horizontal transfers of TALE-encoding genes occurred between *fuscans* and *phaseoli* pathovars.

To study the diversity of TALE effectors from CBB agents, we used a data set of 154 *Xanthomonas* whole genome sequences available at the NCBI database, including *X. citri*, *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* and *X. phaseoli* species. This data set comprised 41 complete genomes from CBB agents, including 25 from *X. citri* pv. *fuscans* and 16 from *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Briand et al. 2021; Darrasse et al. 2013; Gaudin et al. 2023; Xie et al. 2016). From these genomes, we extracted 428 complete TALE-encoding sequences, and compared the phylogenies of the conserved N-ter and C-ter regions of these TALEs to a phylogeny of strains based on whole genome sequences (Fig. 4; Fig. 5). As previously described, four distinct TALE-encoding genes were retrieved in CBB agents, named *XfuTAL1*, *XfuTAL2*, *XfuTAL3* and *XfuTAL4* (Ruh et al. 2017). These four genes clustered into a monophyletic group, together with *tal* genes from *X. citri* pv. *aurantifolii*, *X. citri* pv. *anacardii*, and *X. phaseoli* pv. *manihotis*, confirming that horizontal transfer of *tal* genes occurred between ancestral strains within *X. citri* and *X. phaseoli* species (Ruh et al. 2017). Also, *XfuTAL1* and *XfuTAL2* were found in both *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, indicating horizontal transfer events between these two species, while *XfuTAL3* and *XfuTAL4* were paralogues specific to the GL2 lineage (Ruh et al. 2017).

The recent nature of these events was reinforced by the fact that, except for the *X. citri* pv. *fuscans* strain FH61, the N-ter region was 100% identical within *XfuTAL1* and *XfuTAL2*, even for strain from different species, and that *XfuTAL3* and *XfuTAL4* were indistinguishable from each other among all GL2 strains (Fig. 5a). On the other hand, few mutations occurred within the C-ter region, which successfully differentiated *XfuTAL3* from *XfuTAL4*, indicating that divergence between these paralogs occurred within the GL2 lineage following the duplication event (Fig. 5b). Likewise, differentiation between *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* was observed for the C-ter region of *XfuTAL1*, indicating that separated evolution occurred within each species. On the other hand, *XfuTAL2* exhibited the highest level of conservation, as GL1 and *fuscans* strains could not be dissociated from each other, except for the GL1 Px100 and UnB187 strains.

***XfuTAL2* binding specificity was highly conserved across *fuscans* and GL1 lineages**

To study the diversity of RVD sequences from CBB strains, an analysis was performed using the program FuncTAL (Pérez-Quintero et al. 2015), specifically designed to identify TALE

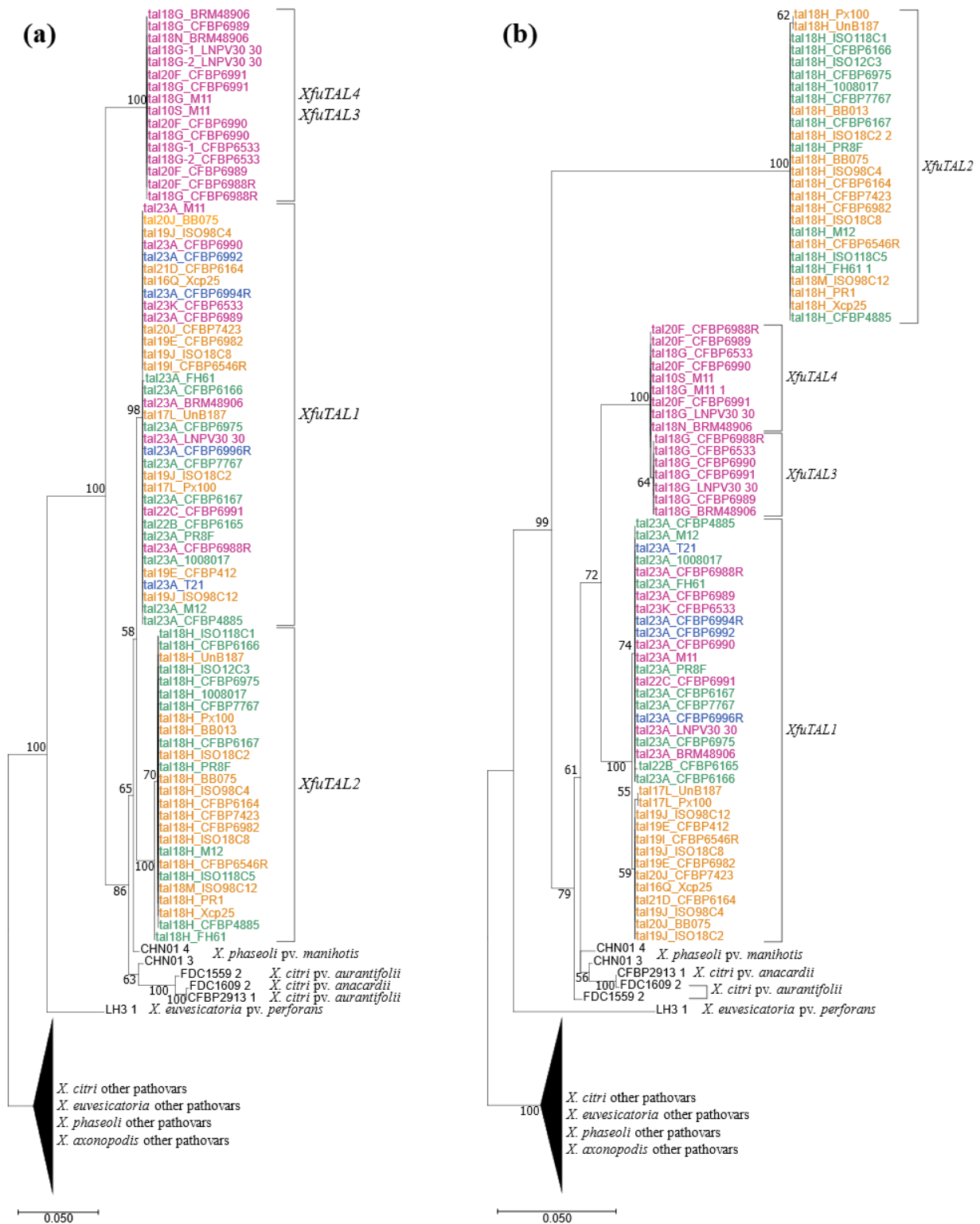


Figure 5. Phylogenetic analysis of TALE-encoding genes. Maximum likelihood trees were constructed on the nucleotide sequences of the N-ter-encoding (a) or C-ter-encoding (b) regions of TALE-encoding genes. TALE-bearing strains are colored according to their genetic lineages using the same colors as in Figure 4. Bootstrap values greater than 50% are shown for 1,000 replicates. Horizontal scale bars represent number of nucleotide substitutions per site.

with similar DNA-binding capabilities (Fig. 6). Each RVD sequence was given a unique name starting with TAL followed by the number of repeats and ending by a letter. As expected, predicted binding affinities clustered according to the gene they were affiliated to. XfuTAL2 was highly conserved, with only two different RVD sequences, TAL18H and TAL18M. TAL18H was present in all sequenced strains except for ISO98C2, which displayed a HY to HD swap at repeat 10 leading to TAL18M (Fig. 6). Conservation of TAL18H was unexpected given the high level of diversity of the strains bearing it. Indeed, it was present in 25 strains including 12 from fuscans lineage and from 13 GL1. This conservation across a large diversity of strains isolated from different continents across five decades supports the view that TAL18H would be crucial for the pathogenicity of both fuscans and GL1 strains.

Duplication led to divergent XfuTAL3 and XfuTAL4 RVD sequences

In the case of XfuTAL3 and XfuTAL4, binding affinities clustered together, which is in accordance with the fact that they were recent paralogs specific to the GL2 lineage (Ruh et al. 2017). XfuTAL3 presented a unique RVD sequence TAL18G, which was conserved across all sequenced strains, suggesting that TAL18G may play an important role in the pathogenicity of GL2 strains. This hypothesis was supported by the fact that every isolated GL2 strain presented an 18-repeat PCR band (Fig. 3b), suggesting that they could all bear TAL18G. On another hand, XfuTAL4 presented four different RVD sequences, among which TAL20F was the most represented. Unexpectedly, strains CFBP6533, LNPV30_30 each carried two copies of TAL18G, one of them being XfuTAL3 while the other was XfuTAL4 according to the C-ter phylogeny (Fig. 5b). This strongly suggests that TAL18G was the original version of XfuTAL4, which later underwent mutations leading to the emergence of TAL18N, TAL20F and TAL10S. This would imply that strains CFBP6533, LNPV30_30, respectively isolated from Tunisia (1986) and China (2006), may have conserved both copies issued from the original duplication event. Then, compared to TAL18G, TAL20F arose through an internal duplication of two HD repeats at the centre of the gene, while TAL18N presented a mutation at the ninth RVD, while TAL10S lost eight repeats (Fig. 6).

Specific diversification of XfuTAL1 occurred in *X. phaseoli* pv. *phaseoli*

Eleven RVD sequences were observed in XfuTAL1, which exhibited higher diversity than XfuTAL2, XfuTAL3 and XfuTAL4. In *X. citri* pv. *fuscans*, TAL23A was a major TALE found in 19/22 strains from every lineage, while TAL22C, TAL22B and TAL23K were found in only one strain each and diverged from TAL23A through deletion of the first or last repeat

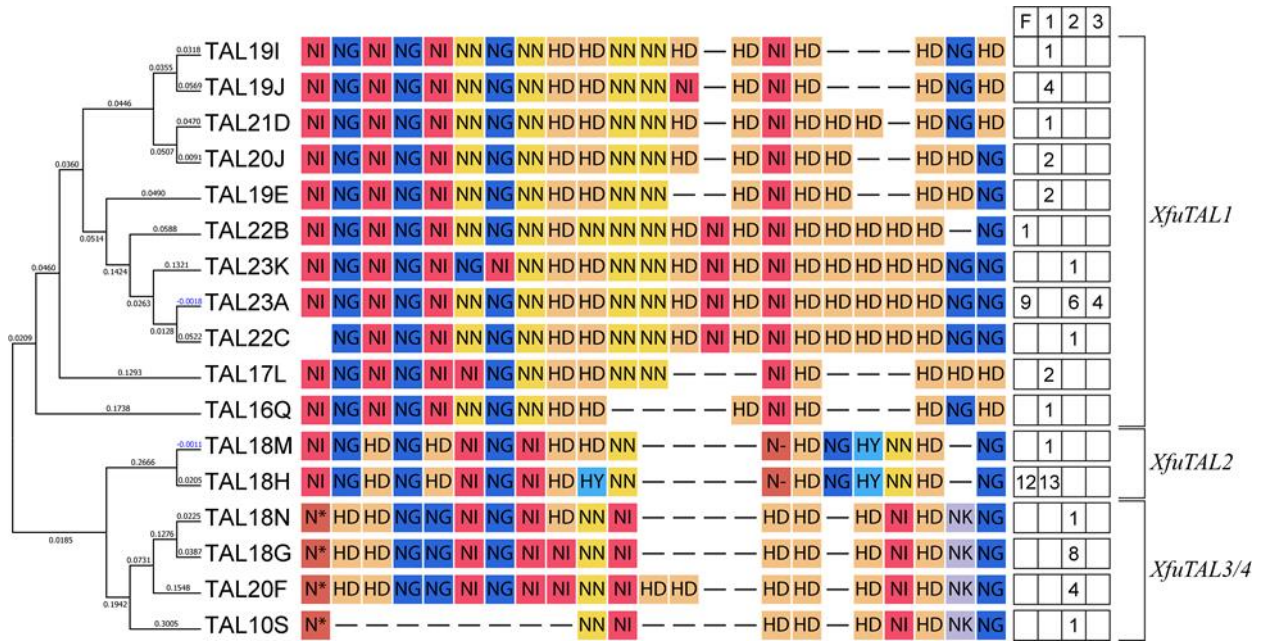


Figure 6. RVD sequence clustering based on predicted TALE DNA-binding affinity. Distances between RVD sequences were estimated based on predicted TALE affinity using FuncTAL (Perez-Quintero et al., 2015). The dendrogram on the left shows the estimated relationship, where numbers represent the distance between the position weight matrices calculated for each TALE. Central alignments depict RVD strings for each TALE variant. Boxes represent TALE repeats and their RVD, with colors corresponding to RVD type. Dotted lines show gaps inserted by the alignment procedure. The table on the right indicates the number of strains in which each TALE variant was retrieved within each lineage (F: fuscans, 1: GL1, 2: GL2, 3: GL3). TALE variants were grouped according to TALE-encoding genes indicated on the far right. The green square shows TAL20F-specific duplication of two repeats, while pink squares indicate putative repeat swaps between TALE variants.

or to repeat swap, respectively (Fig. 6). However, in accordance with PCR results (Fig. 3b), TAL23A was completely absent from *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, in which XfuTAL1 had no RVD sequence common to other lineages (Fig. 6). Moreover, XfuTAL1 presented a high diversity of seven different RVD sequences, TAL21D, TAL19E, TAL19I, TAL19J, TAL17L; TAL20P and TAL16Q, without one of them being obviously more frequent than the others.

This different evolutionary behaviour of XfuTAL1 in *X. citri* pv. *fuscans* versus *X. phaseoli* pv. *phaseoli* was intriguing. This gene was shared between the two pathovars through a horizontal transfer of plasmid A from the *fuscans* pathovar to a *X. phaseoli* pv. *phaseoli* ancestor (Ruh et al. 2017). In *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, XfuTAL1 was located in plasmid A in only four strains, while it was located in the chromosome of 12 strains (Fig. 7a). This difference was due to a single insertion event involving a region of more than 16 kbp comprising 17 genes centred around XfuTAL1, surrounded by insertion sequence IS3 (Fig. 7a). Plasmid A was still present in strains where XfuTAL1 was relocated in the chromosome, but this plasmid could be differentiated from the one in the four strains still having a plasmidic XfuTAL1, based on their proportion of shared *k*-mers (Fig. 7b). Moreover, different TALE variants were specific for plasmidic versus chromosomal XfuTAL1 gene. Indeed, TAL19E and TAL20P were plasmidic, while TAL19I, TAL19J, TAL21D, TAL17L and TAL16Q were only retrieved in the chromosome (Fig. 7a). Following this insertion event, pseudogenisation of XfuTAL1 was observed for US strains BB007a and BB013a, due to the insertion of a gene encoding a hypothetical protein within XfuTAL1 C-ter region.

In *X. citri* pv. *fuscans*, XfuTAL1 was located in plasmid A and no chromosomal XfuTAL1 was observed. Based on shared *k*-mers, the sequence of plasmid A from the *fuscans* lineage was distinct from lineages GL2 and GL3 (Fig. 7b). However, plasmid A from the GL2 and GL3 lineages presented more than 75% shared *k*-mers with each other, suggesting that recent horizontal transfer of plasmid A may have occurred between these two lineages. Unexpectedly, *fuscans* strain CFBP6167 had a GL2/GL3-like version of plasmid A, indicating that plasmid A from a GL2 or GL3 strain was recently transferred horizontally to this strain (Fig. 7b). Strain CFBP6167 was isolated in 1954, which indicates that this horizontal transfer occurred before this year. Moreover, CFBP6167 was the only *fuscans* strain in our collection isolated in the USA, where no GL2 nor GL3 strains were so far reported. Thus, either this strain acquired the plasmid elsewhere and later migrated to the USA, or GL2 or GL3 strains existed in the USA but were not isolated due to prevalence of other lineages in this region.

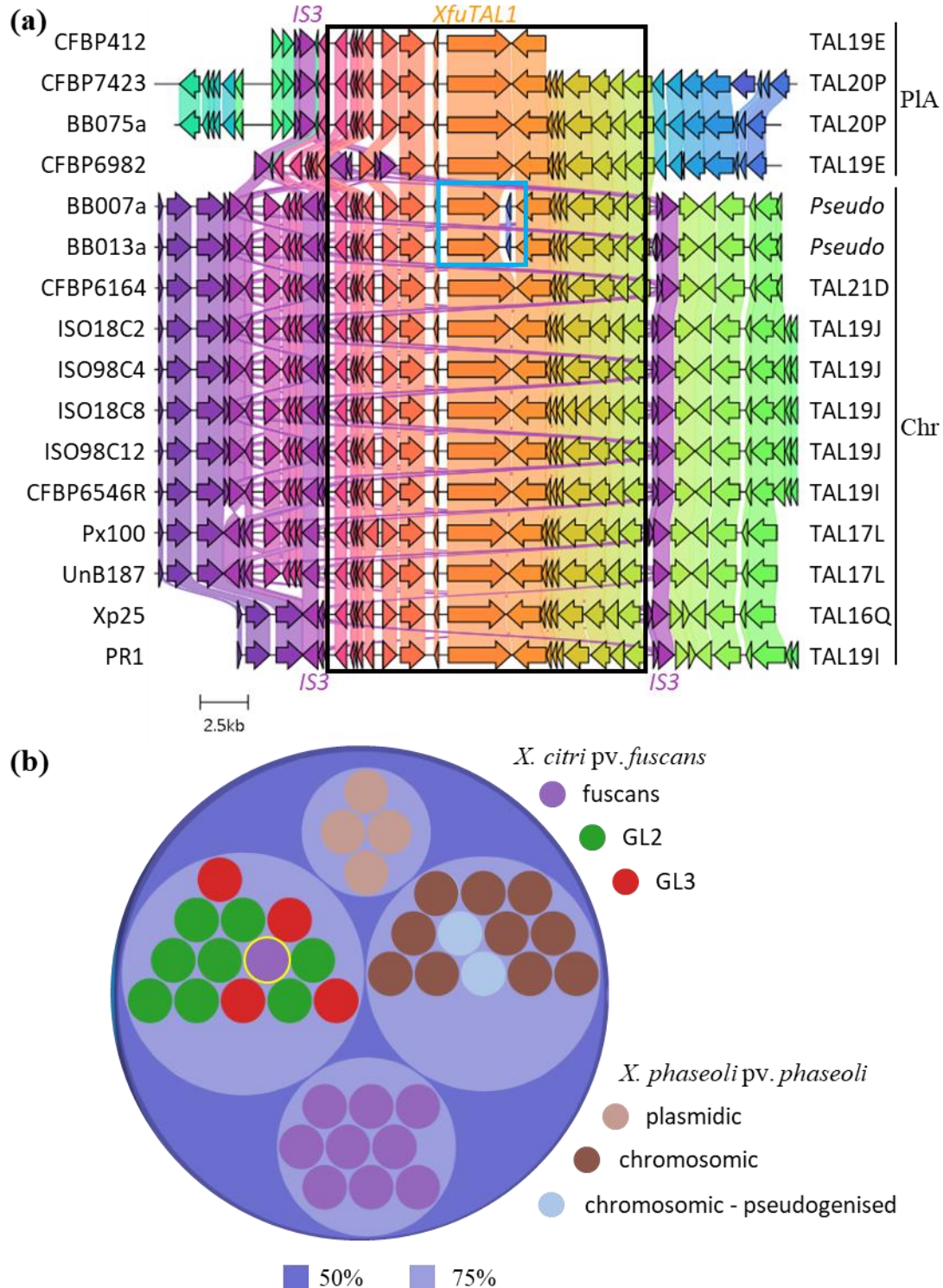


Figure 7. XfuTAL1 relocalization and pseudogenization events in *X. phaseoli* pv. *phaseoli* and evidence for horizontal transfer among genetic lineages. (a) Genomic environnement of XfuTAL1 in *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains represented using Clinker. In the 12 bottom strains, XfuTAL1 was integrated from plasmid A (PIA) into the chromosome (Chr) together with 17 other predicted genes, through a recombination event involving duplication of the insertion sequence IS3. The transferred region is surrounded in black. The blue square represents the insertion of a gene encoding a hypothetical protein leading to XfuTAL1 pseudogenization in strains BB007a and BB013a. (b) Representation of plasmid A conservation in CBB agents. Each dot represents a strain containing plasmid A, colored according to its genetic lineage. In case of *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, strains are colored depending on XfuTAL1 localization and/or pseudogenisation. Strains are grouped according to the percentage of shared k-mers in plasmid A, as indicated below. The yellow circle indicates a strain from the fuscans lineage bearing a GL2/GL3-like plasmid A, indicating horizontal transfer of this plasmid between lineages.

TALE target predictions reveal common putative targets for different RVD sequences

To investigate if the different TALE variants could share common targets in common bean, we used three EBE prediction softwares (Doyle et al. 2012; Erkes et al. 2019; Pérez-Quintero et al. 2013) on the common bean promoterome, consisting of the 5'-UTR plus 500 bp of each annotated gene from the common bean reference genome (Schmutz et al. 2014). Some TALE variants only had predicted targets exclusive to themselves (Fig. 8). This was the case for TAL19E, TAL17L and TAL16Q (*XfuTAL1*) or TAL20F and TAL10S (*XfuTAL4*). These TALE variants could reflect either specialisation towards new targets or degeneration leading to non-functional TALEs. On another hand, some genes were shared by two or more TALE variants, suggesting that these genes could be important targets to be induced for the pathogenicity of CBB agents (Fig. 8 ; Supplemental table 4). For example, *Phvul.010G130200* was a predicted target of all four *XfuTAL1* variants found in *X. citri* pv. *fuscans* (TAL23A, TAL22B, TAL22C and TAL23K) while *Phvul.009G164300* was predicted for three of them (TAL23A, TAL22B and TAL23K). Within *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, RVD sequences from *XfuTAL1* were less conserved than in the *fuscans* lineages, but three genes (*Phvul.002G078600*, *Phvul.006G023100* and *Phvul.009G051800*) were predicted as targets for four TALE variants (TAL19I, TAL19J, TAL21D and TAL20P). For *XfuTAL2*, eight common putative targets were shared by TAL18H and TAL18M, among which *Phvul.006G182800* and *Phvul.007G045600* had the best predictions of all. For *XfuTAL3* and *XfuTAL4*, five potential target genes were shared between TAL18G and TAL18N, among which *Phvul.005G137300* had the top predictions for all software. Overall, EBE predictions suggested that some TALE variations were conservative while others were not, reflecting different evolutionary fates for these TALEs.

Plasmid A presents conserved sequences useful for detection of CBB agents

To search for additional genes potentially involved in bean adaptation, we used a *k*-mer-based approach (Denancé et al. 2019) to identify regions conserved at 100% across all CBB agents but not in any other *Xanthomonas* strain. The searched *k*-mers were 22-bp long and overlapping *k*-mers were concatenated into long-mers of 23 bp or more. A total of 19 unique long-mers were retrieved and mapped on the genome of *fuscans* strain M12 (Supplemental table 5). Some long-mers corresponded to regions repeated up to 12 times within the genome of *fuscans* strain M12, which we used as reference. This led to unveil 46 specific loci among which 16 corresponded to intergenic regions while the other 30 were retrieved in 23 different protein-

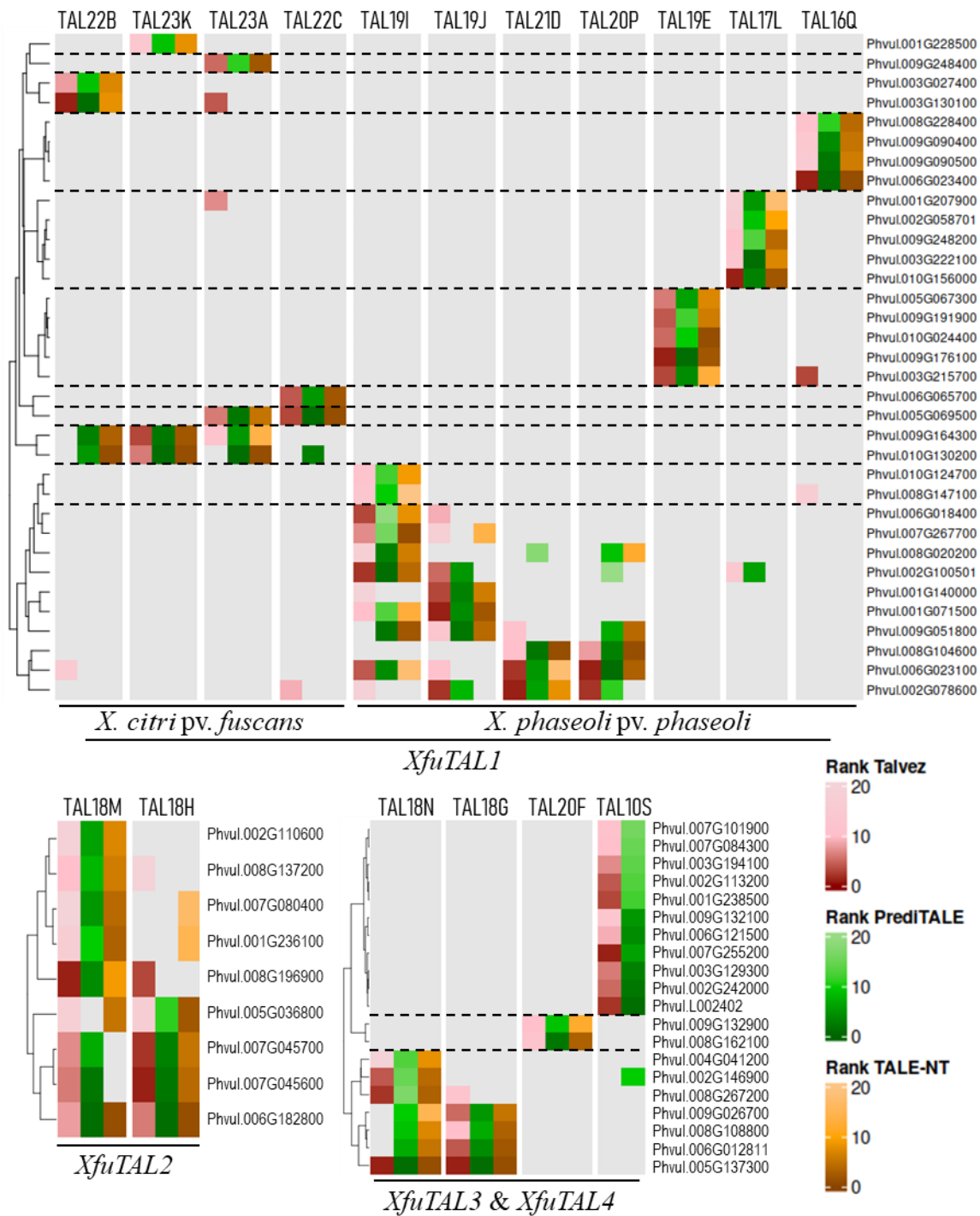


Figure 8. Top 20 genes with predicted EBEs for the TALE variants found in CBB agents. Top labels indicate TALE variants, while bottom labels indicate TALE-encoding genes. The heatmaps show the best candidates and the EBE-prediction quality from each software. Rank indicates the position of the prediction (based on the score) among the set of the top 20 predictions. Only genes predicted in the top 20 by all three software packages together for at least one TALE variant are shown, except for TAL10S as TALE-NT does not allow RVD sequences below 12. Dashed lines delineate clusters of genes with similar prediction profiles.

coding genes. Most loci corresponded to transposable elements, suggesting that they may play a role in *Xanthomonas* adaptation to bean plants.

Significantly, 20 loci were located on plasmids (Supplemental table 5). This corresponded to 43% of the unveiled loci, while plasmids represented only ~0.02% of the *Xanthomonas* genome, indicating that regions specific to CBB agents were overrepresented in plasmids. In particular, a small region of 3.5 kbp located on plasmid A contained nine different long-mers, suggesting that it was more conserved among CBB agents than any other portion of the genome (Figure 9). This region comprised five genes encoding a Tn3 transposon, a resolvase, two proteins forming a potential toxin-antitoxin system, as one is involved in plasmid stabilization or mobilization and the second one constituted a VapC toxin family PIN domain ribonuclease. Moreover, this region encompassed the 812-bp PCR amplicon of primers p7X4c and p7X4e, previously developed for detection of both *X. citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Audy et al. 1994). This test was validated for detection of CBB agents in seed lots according to the International Rules for Seed Testing from the International Seed-Testing Association (ISTA) (Grimault et al. 2014).

DISCUSSION

In this study, we have characterized the diversity of a large worldwide collection of *Xanthomonas* strains responsible for CBB and their TALEs. For this, an MLVA scheme was developed and used on a diversity of 106 strains. The analysis of TALE profiles by PCR was combined to the analysis of 154 genomes including 41 from CBB agents. Together, these results led to better understanding the evolution and worldwide structuration of the genetic lineages of CBB agents.

Distinct geographical distributions suggest different origins for CBB agent lineages.

A worldwide distribution of CBB disease has been described for long (Zaumeyer and Rex Thomas 1957) and the disease is now distributed in over 100 countries (EPPO 2023). Our study gave insight into the origins of the different lineages of CBB agents, which brings us back to the very first descriptions of the disease. Indeed, as far back as 1930, Zaumeyer wrote: “*The disease of beans caused by Bacterium phaseoli is probably of American origin*”. He made this assumption based on the fact that CBB was first described in the USA (New Jersey) in 1892 and 1893 (Beach 1892; Halsted 1893). Few years later, the causal agent was described as the

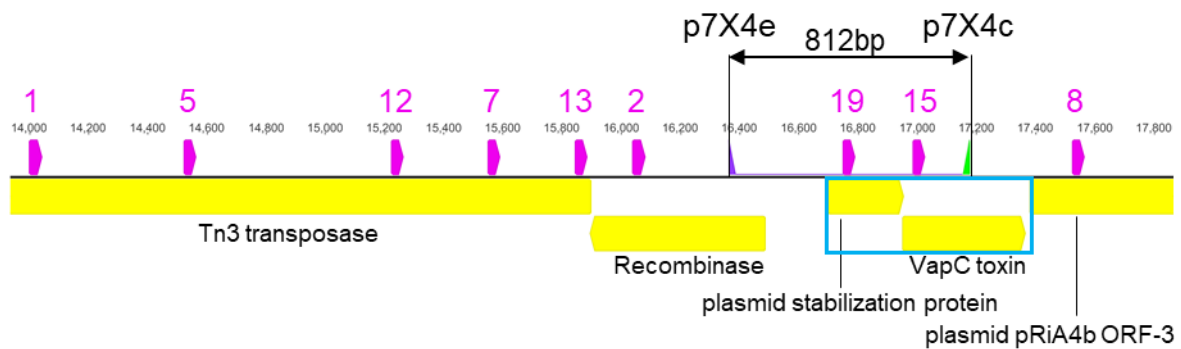


Figure 9. Detailed view of a 3,800bp region from plasmid A presenting specific features conserved across CBB agents. This figure was drawn using Geneious v.8.1.9. Black numbers represent coordinates (bp) in plasmid A from strain M12. Yellow plain arrows represent predicted CDS and their orientation as annotated by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Purple arrowheads represent short sequences of 43 bp each (long-mers), which are specific to CBB agents, numbered as in Supplemental table 4. The double arrow represents a 812-bp fragment amplified with PCR primers p7X4e and p7X4c for CBB agent detection according to the International Rules for Seed Testing (Grimault *et al.*, 2014). The blue square shows the two genes forming a potential toxin-antitoxin system.

bacterium now known as *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Smith 1897). Variant strains causing the same disease but producing a brown pigment on tyrosine-containing medium were described only 31 years later in Europe (Switzerland) and corresponded to the actual fuscans lineage of *X. citri* pv. *fuscans* (Burkholder 1924). In line with these historical discoveries, the worldwide distribution of CBB agent lineages was suggestive of a North-American origin for *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, while *X. citri* pv. *fuscans* was scattered everywhere else, with a core clonal complex mostly composed of European strains for the fuscans lineage. The absence of *X. citri* pv. *fuscans* from recent samplings in North America was significant, as our data set comprised 19 phaseoli strains isolated from 1990 to 2017 in Wisconsin, Colorado and California (Supplemental table 1). This trend was supported by previous sampling campaigns, such as in Wisconsin in 2002 where 20 CBB isolates corresponded all to *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Mkandawire et al. 2004). In 2005 and 2006 CBB surveys on 26 Wisconsin fields allowed isolating six fuscans strains in two fields where they coexisted with GL1 strains (Duncan et al. 2011). However, 287 GL1 strains were isolated during the same campaign, showing that the fuscans strains were in very low proportions (~2%) in these US fields.

Although significant proportions of GL1 strains were found in South American states and in Spain (López, Asensio, and Gilbertson 2006; Mkandawire et al. 2004), fuscans appeared to be the most prevalent lineage in South America, Europe and West Africa (Fig. 1). In East Africa, strains described as phaseoli variants were retrieved (Mkandawire et al. 2004), but they could likely correspond to GL2 or GL3 strains, as assessed by their genetic clustering with fuscans strains (Duncan et al. 2011). In accordance with this, the GL3 lineage was restricted to Tanzania and La Réunion island, suggesting that it was endemic to this region. On another hand, GL2 strains were also retrieved in Brazil, Tunisia and China. To our knowledge, this is the first description of GL2 strains outside from East Africa and La Réunion island. In all, if the origins of the GL1 lineage are quite obvious, those from the different *X. citri* pv. *fuscans* lineages remain blurry. To answer this question, substantial sampling effort would be required, particularly in Asia and Oceania, but also at the Mesoamerican and Andean regions which constitute the centers of diversity of common bean (Bitocchi et al. 2017; Chacón S. et al. 2007).

The common point of CBB agents: one plasmid to rule them all?

The genetic distance between the two CBB pathovars was firstly described by studying plasmid DNAs, for which *phaseoli* and *fuscans* strains presented different restriction digestion

profiles but shared a 2.3-kb fragment revealed by DNA-DNA hybridization (Lazo and Gabriel 1987). The authors hypothesized that this 2.3-kb homologous region, which appeared to be specific to CBB agents, may encode host range specificity regions. Plasmid DNA was later used by the same group to design specific PCR primers for detection of CBB agents within a 3.4-kb plasmid fragment containing a repetitive sequence shared by *phaseoli* and *fuscans* strains (Audy et al. 1994), and even later to develop a LAMP-PCR assay (de Paiva et al. 2020). Using a *k*-mer approach on whole genome sequence data, we pointed out the same region, which appeared to be the most conserved region shared by the four lineages of CBB agents. This region encompasses two tandem genes respectively encoding a plasmid stabilization protein and a VapC toxin, which may form a type II toxin-antitoxin (TA) system (Fig. 9). Within the *Xanthomonas* genus, this TA system appeared to be specific to the *X. citri* species (Martins et al. 2016). The main described role of plasmidic TA systems is to ensure the maintenance of plasmids over generations by causing cell death or growth arrest in cells that lose it, but roles in virulence of human and few plant pathogens has also been assessed, usually by participating in the maintenance of virulence plasmids (Kamruzzaman, Wu, and Iredell 2021; Shidore and Triplett 2017). In the case of CBB agents, this could explain why all strains possess plasmid A, but not why they all bear this particular version of this TA system. Further analyses on the role of this TA system in the pathogenicity and host specificity of CBB agents would be needed to answer these questions.

The prominent role of plasmid A was further confirmed by its conservation among all CBB strains sequenced so far. (Fig. 7), thanks to a horizontal transfer between *phaseoli* and *fuscans* ancestors (Ruh et al. 2017). This plasmid seems to still be active in terms of horizontal transfers, as exemplified by the recent transfer of a GL2/GL3-like plasmid A to a *fuscans* strains. Apart from this event, lineage-specific versions of the plasmid were distinguishable, indicating that plasmid A diverged within each lineage. Importantly, plasmid A was carrying *XfuTAL1*, which was the only TALE-encoding gene shared by all four CBB lineages. In GL1, *XfuTAL1* was integrated into the chromosome of most strains, but plasmid A without *XfuTAL1* was still present. This suggests that other genes on plasmid A may also be important for CBB agents.

CBB lineages bear different TALE repertoires.

Different TALE profiles were found according to CBB lineages, and the different TALEs led to different predicted target genes in the common bean genome. This would suggest that despite their convergence towards bean, CBB agents from different lineages may employ slightly distinct strategies to infect common bean plants. However, two exceptions were observed. First, *XfuTAL2* encoded TAL18H or TAL18M, which presented highly similar prediction profiles, was common to the fuscans and GL1 lineages and most strains from both lineages presented a TALE profile comprising a 18-repeat band. Moreover, *XfuTAL2* sequence was highly conserved in both lineages. Thus, one could argue that *XfuTAL2* was a major factor of convergence between GL1 and fuscans lineages. Another TALE-encoding gene conserved across lineages was *XfuTAL1*. Despite presenting many RVD sequence variants, this TALE was very conserved in *X. citri* pv. *fuscans*, with a vast majority of strains carrying TAL23A, or a 23-repeat band in the three lineages from pathovar fuscans. Thus, *XfuTAL1* appeared as a core TALE for *X. citri* pv. *fuscans* lineage. However, this TALE was completely different in phaseoli strains, where *XfuTAL1* presented diverse variants different from those found in lineages from *X. citri* pv. *fuscans*. These observations suggest that opposite selection pressures were exerted on this TALE in the two pathovars. This could either come from different genomic environment, or from the different common bean accession grown in different countries, where different selective traits were selected by breeding. For example, the use of resistant VAX lines in North American Countries (Singh and Schwartz 2010) could have put more pressure for diversification of *XfuTAL1*.

GL2 strains developed specific, chromosomic TALE-encoding genes *XfuTAL3* and *XfuTAL4*, indicating that strains from this lineage employed an enhanced TALE arsenal compared to other CBB agents. In this respect, it would be interesting to test if *XfuTAL3* or *XfuTAL4* could contribute to the aggressiveness of fuscans, GL1 or GL3 strains. *XfuTAL3* and *XfuTAL4* being recent paralogues, evolutive constraints may be alleviated for these genes. Indeed, duplication authorizes modifications that could not be made in the ancestral gene without disrupting its original function, and which were therefore counter-selected before duplication (Zhang 2003). This could lead to either conservation of the two copies, elimination by pseudogenization or neofunctionalization. These three outcomes appeared to be occurring in GL2 strains, some of which conserved both ancestral TAL18G copies while others conserved only one TAL18G and let the other copy evolve into TAL18N, TAL20F or TAL10S. TAL18N was almost identical to TAL18G and its predicted binding specificity was only slightly

modified, while TAL20F had completely different predicted targets, and TAL10S may correspond to a pseudogene. Studying the impact of these variants for their role in pathogenicity would help understanding this ongoing evolution.

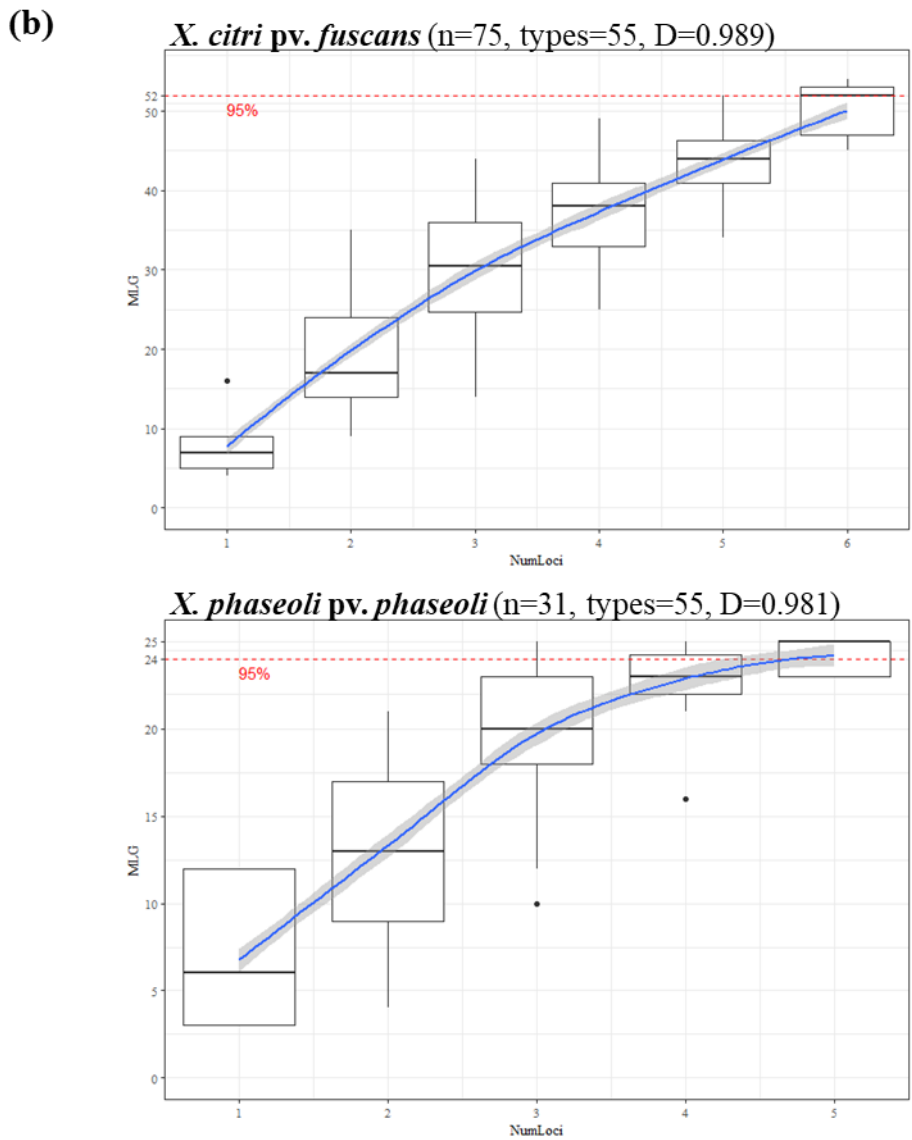
Finally, the conservation of TALEs in phylogenetically different strains may reflect their crucial role in the pathogenesis of CBB agents. Yet, absence of TALEs in certain strains suggests the opposite. This may reflect the existence of cheaters among CBB agents populations (Barrett, Bell, and Bergelson 2011; Friesen 2020). However, all strains from our data set were tested for their ability to individually produce symptoms on common bean plants (not shown), indicating that TALEs were not key to the virulence of the bacteria, but maybe provide an evolutionary advantage by enhancing the aggressiveness of the strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

Bacterial strains were handled at the CIRM-CFBP (CIRM-CFBP 2021). We thank the Limagrain group for funding CGi and providing strains isolated on bean seeds in the USA and France. CGa was funded for her PhD by the French Pays de Loire Region, the French National Research Institute for Agriculture and Environment, Plant Health and Environment division (INRAE-SPE) and L'Institut Agro Rennes-Angers. ES was funded for his PhD by a grant from the Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation from Burkina Faso (2021-2022) and by a mobility grant to France from the TSARA initiative through INRAE-SPE division.

(a)

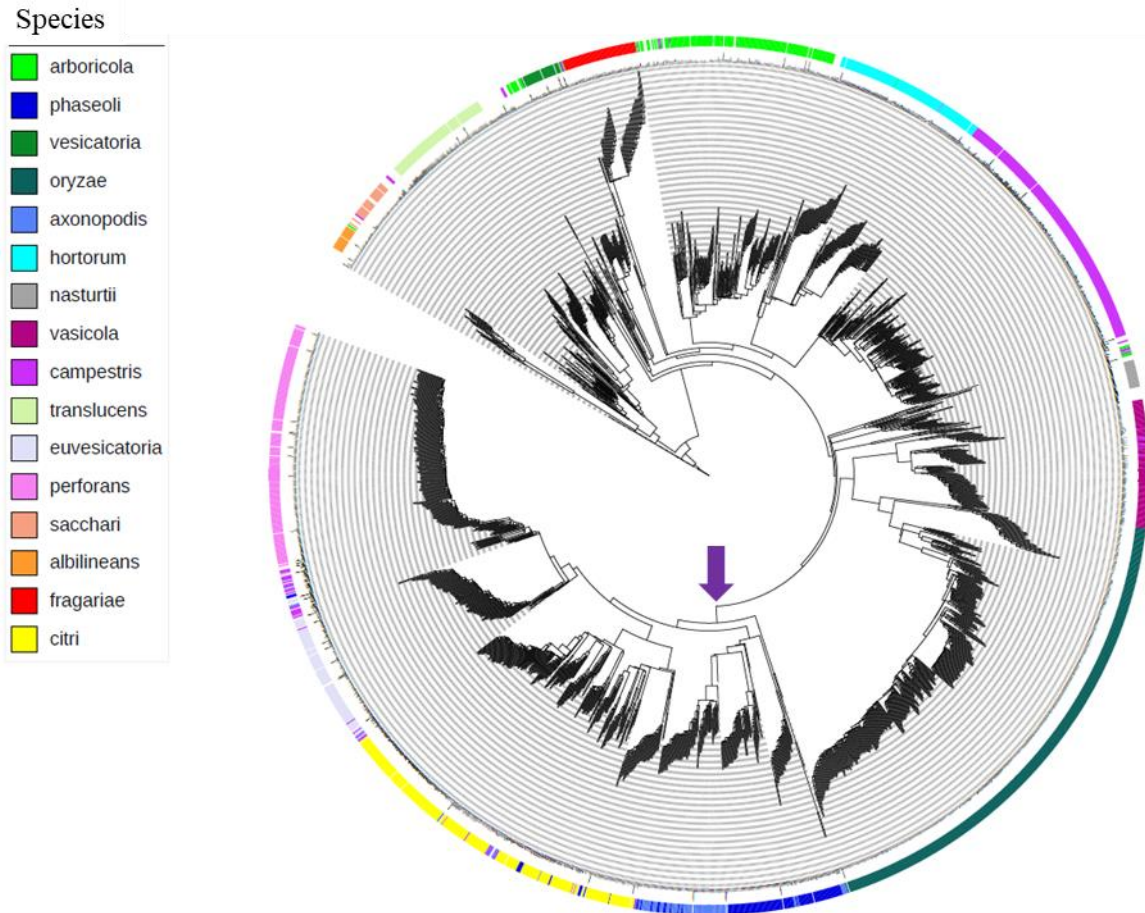
	<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> (n=75)		<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> (n=31)	
VNTR	Alleles	D	Alleles	D
7764V13	5	0.53	3	0.41
XaG1_72	7	0.64	3	0.54
7764V18	5	0.33	4	0.63
XaG1_12	16	0.90	8	0.85
XaG1_73	8	0.75	12	0.91
XaG2_52	4	0.35	6	0.77
Karine_vntr4	9	0.76	1	0



Supplemental figure 1. Information on (a) VNTRs and (b) MLVA scheme. Discriminatory power (D) was calculated using the Hunter-Gaston index. Separate rarefaction curves were done for *X. citri* pv. *fuscans* (top) and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (bottom) using HP-RARE (Kalinowski, 2004).

MLG: Multi locus genotype (*i.e.* unique combinations of alleles accross two or more loci).

NumLoci: numbers of VNTR loci considered.



Supplemental figure 2. Phylogeny of *Xanthomonas*. This tree was constructed using AutoMLST (Alanjary, et al., 2019) on 2,326 *Xanthomonas* genomes downloaded from the NCBI database as of march 28th, 2023. Species are indicated according to corresponding metadata from the NCBI. The purple arrow at the center indicates the subtree from which we selected the 154 complete genome sequences used in this study.

Supplemental table 1. Information on the strains used in this study and their VNTR profile.²

² Ce tableau est trop volumineux et n'a donc pas été inclus. Les données seront disponibles une fois l'article publié.

Supplemental table 2. Primers used in this study.

Target gene/VNTR	Primer ID	Sequence	Tm	Amplicon size/Tandem repeat	Fluorescent dye	Reference
<i>gyrB</i>	X-gyrB1F	ACGAGTACAACCCGGACAA	58°C	904 bp	NA	Young <i>et al.</i> , 2008
	X-gyrB1R	CCCATCARGGTGCTGAAGAT	64°C			
XaG1_12	XaG1_12-F	GCATCAGGCCGACGCTT	63°C	TCCCGAA	FAM	Arrieta-Ortiz <i>et al.</i> , 2013
	XaG1_12-R	GATGTGCGCGATGCGGTG				
XaG1_72	XaG1_72-F	CGAAGCGATCGGCTACCG	63°C	GGTGCC	ATTO565	Arrieta-Ortiz <i>et al.</i> , 2013
	XaG1_72-R	CAGGCCTCTGCACAATGGAG				
XaG1_73	XaG1_73-F	CACGCCCAAGCCCATCCA	63°C	ATGGTC	ATTO550	Arrieta-Ortiz <i>et al.</i> , 2013
	XaG1_73-R	CACCGAGGTCGCGGCATC				
XaG2_52	XaG2_52-F	GTCGTTCAATCCGGGCGA	63°C	CAACGCACCACTGCCA	FAM	Arrieta-Ortiz <i>et al.</i> , 2013
	XaG2_52-R	GGCGATTTCGGGCTGAGG				
7767v13	7767v13-F	AGGTCATCGTGCCGTCTTC	59°C	CCCGATT	ATTO550	Ferreira <i>et al.</i> , 2019
	7767v13-R	GTAACCCCATCGCCTACAAG				
7767v18	7767v18-F	TTGTCATCGTGGAAGTTTCG	57°C	CCCGATT	ATTO565	Ferreira <i>et al.</i> , 2019
	7767v18-R	CGGAGAGACGTTGGGTAAGA				
Karine_vntr4	Karine_vntr4-F	ATGAAGGAATAAGCTCTTAC	52°C	CGAATCC	FAM	This study
	Karine_vntr4-R	TTTTGCCGGATAACGTCATG				
TALE genes from <i>Xcf-Xpp</i>	tal-859-F	CCGTTACAGTTGGACAC	65°C	variable	NA	This study
	Xfuta1-3204-R	ATCAGGGCGAGATAACTGGG				

NA: not applicable

Supplemental table 3. Whole genome sequence of the *Xanthomonas* genus data set. The sequences were retrieved from the NCBI database (as of march 28th 2023).²

Supplemental table 4. Predicted target genes common to different TALE variants.

Gene ID	Predicted for	TALE variants	Annotation (Phytozome)
Phvul.010G130200	XfuTAL1	TAL23A, TAL23K, TAL22B, TAL22C	PTHR32467:SF5 - AP2-LIKE ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR AIL1
Phvul.009G164300	XfuTAL1	TAL23A, TAL23K, TAL22B	PTHR12565:SF90 - TRANSCRIPTION FACTOR BHLH137
Phvul.003G130100	XfuTAL1	TAL23A, TAL22B	PTHR31087:SF3 - PROTEIN LURP-ONE-RELATED 16-RELATED
Phvul.005G069500	XfuTAL1	TAL23A, TAL22C	PTHR33785:SF1 - GENOMIC DNA, CHROMOSOME 3, BAC CLONE:F4B12
Phvul.006G023100	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J, TAL21D, TAL20P, TAL22B	PTHR31719:SF5 - NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 6-RELATED
Phvul.002G078600	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J, TAL21D, TAL20P, TAL22C	PTHR12374:SF26 - F25A4.19 PROTEIN
Phvul.009G051800	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J, TAL21D, TAL20P	PTHR21596:SF19 - EMB
Phvul.002G100501	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J, TAL20P, TA17L	PTHR31301:SF15 - LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 4
Phvul.008G020200	XfuTAL1	TAL19I, TAL21D, TAL20P	K10525 - allene oxide cyclase (AOC)
Phvul.001G071500	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J	PTHR22950:SF205 - AMINO ACID PERMEASE 3-RELATED
Phvul.001G140000	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J	PTHR27000:SF136 - POLYGALACTURONASE INHIBITOR 1-RELATED
Phvul.007G267700	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J	PTHR22849:SF38 - E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE PUB22-RELATED
Phvul.006G018400	XfuTAL1	TAL19I, TAL19J	IPR005135 - Endonuclease/exonuclease/phosphatase
Phvul.008G104600	XfuTAL1	TAL21D, TAL20P	PTHR24089:SF190 - THYLAKOID ADP
Phvul.003G215700	XfuTAL1	TA17L, TAL16Q	PTHR12290:SF18 - PROTEIN CORNICHON HOMOLOG 3-RELATED
Phvul.001G207900	XfuTAL1	TA17L, TAL23A	PTHR33509:SF5 - LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 3 (LEA3) FAMILY PROTEIN
Phvul.006G182800	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	PTHR33544 - FAMILY NOT NAMED
Phvul.007G045600	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	K07955 - ADP-ribosylation factor-like protein 8 (ARL8)
Phvul.007G045700	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	2.3.1.181 - Lipoyl(octanoyl) transferase / Octanoyl-[acyl-carrier-protein]-protein N-octanoyltransferase
Phvul.005G036800	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	K13096 - splicing factor 4 (SF4)
Phvul.008G196900	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	K17839 - polyamine oxidase (PAO4)
Phvul.001G236100	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	PTHR12271:SF40 - POLY(A) RNA POLYMERASE GLD2
Phvul.007G080400	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	PF02496 - ABA/WDS induced protein (ABA_WDS)
Phvul.008G137200	XfuTAL2	TAL18H, TAL18M	PTHR33699 - FAMILY NOT NAMED
Phvul.005G137300	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL18N	PTHR31301:SF14 - LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1-RELATED
Phvul.006G012811	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL18N	PTHR22911:SF6 - SOLUTE CARRIER FAMILY 35 MEMBER G1
Phvul.008G108800	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL18N	K15685 - E3 ubiquitin-protein ligase Hakai [EC:6.3.2.19] (CBLL1)
Phvul.009G026700	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL18N	6.3.2.5 - Phosphopantothenate--cysteine ligase / Phosphopantothenoylcysteine synthetase
Phvul.008G267200	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL18N	PTHR31071:SF2 - F11F12.2 PROTEIN
Phvul.002G146900	XfuTAL3-4	TAL18G, TAL10S	PTHR31631:SF0 - KINASE INTERACTING (KIP1-LIKE) FAMILY PROTEIN

Supplemental table 5. List of longmers specific to CBB agents²

REFERENCES

- Alanjary, Mohammad, Katharina Steinke, and Nadine Ziemert. 2019. "AutoMLST: An Automated Web Server for Generating Multi-Locus Species Trees Highlighting Natural Product Potential." *Nucleic Acids Research* 47(W1):W276–82. doi: 10.1093/nar/gkz282.
- Alavi, Seyed Mehdi, Saeideh Sanjari, Fabien Durand, Chrystelle Brin, Charles Manceau, and Stéphane Poussier. 2008. "Assessment of the Genetic Diversity of *Xanthomonas Axonopodis* Pv. Phaseoli and *Xanthomonas Fuscans* Subsp. *Fuscans* as a Basis to Identify Putative Pathogenicity Genes and a Type III Secretion System of the SPI-1 Family by Multiple Suppression Subtractive H." *Applied and Environmental Microbiology* 74(10):3295–3301. doi: 10.1128/AEM.02507-07.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215(3):403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Arrieta-Ortiz, Mario L., Luis M. Rodríguez-R, Álvaro L. Pérez-Quintero, Lucie Poulin, Ana C. Díaz, Nathalia Arias Rojas, Cesar Trujillo, Mariana Restrepo Benavides, Rebecca Bart, Jens Boch, Tristan Boureau, Armelle Darrasse, Perrine David, Thomas Dugé De Bernonville, Paula Fontanilla, Lionel Gagnevin, Fabien Guérin, Marie Agnès Jacques, Emmanuelle Lauber, Pierre Lefeuvre, Cesar Medina, Edgar Medina, Nathaly Montenegro, Alejandra Muñoz Bodnar, Laurent D. Noël, Juan F. Ortiz Quiñones, Daniela Osorio, Carolina Pardo, Prabhu B. Patil, Stéphane Poussier, Olivier Pruvost, Isabelle Robène-Soustrade, Robert P. Ryan, Javier Tabima, Oscar G. Urrego Morales, Christian Vernière, Sébastien Carrere, Valérie Verdier, Boris Szurek, Silvia Restrepo, Camilo López, Ralf Koebnik, and Adriana Bernal. 2013. "Genomic Survey of Pathogenicity Determinants and VNTR Markers in the Cassava Bacterial Pathogen *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Manihotis* Strain CIO151." *PLoS ONE* 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0079704.
- Audy, P., A. Laroche, G. Saindon, H. C. Huang, and R. L. Gilbertson. 1994. "Detection of the Bean Common Blight Bacteria, *Xanthomonas Campestris* Pv. Phaseoli and X.c.Phaseoli Var. *Fuscans*, Using the Polymerase Chain Reaction." *Phytopathology* 84(10):1185–92. doi: 10.1094/phyto-84-1185.
- Barrett, Luke, Thomas Bell, and Joy Bergelson. 2011. "Cheating, Trade-Offs and the Evolution of Aggressiveness in a Natural Pathogen Population." *PMC* 14(11):1149–57. doi:

10.1111/j.1461-0248.2011.01687.x.Cheating.

- Beach, S. A. 1892. *SOME BEAN DISEASES*. N. Y. State Agr. Expt. Sta. Bul. (n. s.) 48, p. [308]-333, illus.
- Benson, Gary. 1999. "Tandem Repeats Finder: A Program to Analyze DNA Sequences." *Nucleic Acids Research* 27(2):573–80. doi: 10.1093/nar/27.2.573.
- Bitocchi, Elena, Domenico Rau, Elisa Bellucci, Monica Rodriguez, Maria L. Murgia, Tania Gioia, Debora Santo, Laura Nanni, Giovanna Attene, and Roberto Papa. 2017. "Beans (*Phaseolus Ssp.*) as a Model for Understanding Crop Evolution." *Frontiers in Plant Science* 8(May):1–21. doi: 10.3389/fpls.2017.00722.
- Boch, Jens, Ulla Bonas, and Thomas Lahaye. 2014. "TAL Effectors - Pathogen Strategies and Plant Resistance Engineering." *New Phytologist* 204(4):823–32. doi: 10.1111/nph.13015.
- Boch, Jens, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaya, Nickstadt Anja, and Ulla Bonas. 2009. "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors." *Science* 326(December):1509–12. doi: 10.1126/science.1178811.
- Briand, Martial, Mylène Ruh, Armelle Darrasse, Marie-Agnès Jacques, and Nicolas W. G. Chen. 2021. "Complete and Circularized Genome Sequences of 17 *Xanthomonas* Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean." *Microbiology Resource Announcements* 10(31):17–20. doi: 10.1128/mra.00371-21.
- Broughton, W. J., Hern, aacute, G. Ndez, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. "Beans (*Phaseolus Spp.*) - Model Food Legumes." *Plant and Soil* 252(1):55–128.
- Bui Thi Ngoc, Lan, Christian Vernière, Philippe Jarne, Sylvain Brisse, Fabien Guérin, Sébastien Boutry, Lionel Gagnevin, and Olivier Pruvost. 2009. "From Local Surveys to Global Surveillance: Three High-Throughput Genotyping Methods for Epidemiological Monitoring of *Xanthomonas Citri* Pv. *Citri* Pathotypes." *Applied and Environmental Microbiology* 75(4):1173–84. doi: 10.1128/AEM.02245-08.
- Burkholder, W. H. 1924. "Varietal Susceptibility Among Beans, to the Bacterial Blight." *Phytopathology* 14.
- Büttner, Daniela, and Ulla Bonas. 2010. "Regulation and Secretion of *Xanthomonas* Virulence Factors." *FEMS Microbiology Reviews* 34(2):107–33. doi: 10.1111/j.1574-

6976.2009.00192.x.

- Chacón S., M. I., B. Pickersgill, D. G. Debouck, and J. Salvador Arias. 2007. “Phylogeographic Analysis of the Chloroplast DNA Variation in Wild Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) in the Americas.” *Plant Systematics and Evolution* 266(3–4):175–95. doi: 10.1007/s00606-007-0536-z.
- Chen, Nicolas W. G., Mylène Ruh, Armelle Darrasse, Justine Foucher, Martial Briand, Joana Costa, David J. Studholme, and Marie Agnès Jacques. 2021. “Common Bacterial Blight of Bean: A Model of Seed Transmission and Pathological Convergence.” *Molecular Plant Pathology* 22(12):1464–80. doi: 10.1111/mpp.13067.
- Chen, Nicolas W. G., Laurana Serres-Giardi, Mylène Ruh, Martial Briand, Sophie Bonneau, Armelle Darrasse, Valérie Barbe, Lionel Gagnevin, Ralf Koebnik, and Marie Agnès Jacques. 2018. “Horizontal Gene Transfer Plays a Major Role in the Pathological Convergence of *Xanthomonas* Lineages on Common Bean.” *BMC Genomics* 19(1):1–20. doi: 10.1186/s12864-018-4975-4.
- Ciarroni, Serena, Lorenzo Gallipoli, Maria C. Taratufolo, Margi I. Butler, Russell T. M. Poulter, Christine Pourcel, Gilles Vergnaud, Giorgio M. Balestra, and Angelo Mazzaglia. 2015. “Development of a Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) to Unravel the Intra-Pathovar Structure of *Pseudomonas Syringae* Pv. *Actinidiae* Populations Worldwide.” *PLoS ONE* 10(8):1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0135310.
- CIRM-CFBP. 2021. “International Centre of Microbial Resource (CIRM) - French Collection for Plant-Associated Bacteria. INRAE.”
- Constantin, E. C., I. Cleenwerck, M. Maes, S. Baeyen, C. Van Malderghem, P. De Vos, and B. Cottyn. 2016. “Genetic Characterization of Strains Named as *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Dieffenbachiae* Leads to a Taxonomic Revision of the *X. Axonopodis* Species Complex.” *Plant Pathology* 65(5):792–806. doi: 10.1111/ppa.12461.
- Darrasse, Armelle, Sébastien Carrère, Valérie Barbe, Tristan Boureau, Mario L. Arrieta-Ortiz, Sophie Bonneau, Martial Briand, Chrystelle Brin, Stéphane Cociancich, Karine Durand, Stéphanie Fouteau, Lionel Gagnevin, Fabien Guérin, Endrick Guy, Arnaud Indiana, Ralf Koebnik, Emmanuelle Lauber, Alejandra Munoz, Laurent D. Noël, Isabelle Pieretti, Stéphane Poussier, Olivier Pruvost, Isabelle Robène-Soustrade, Philippe Rott, Monique Royer, Laurana Serres-Giardi, Boris Szurek, Marie Anne van Sluys, Valérie Verdier,

- Christian Vernière, Matthieu Arlat, Charles Manceau, and Marie Agnès Jacques. 2013. “Genome Sequence of *Xanthomonas Fuscans* Subsp. *Fuscans* Strain 4834-R Reveals That Flagellar Motility Is Not a General Feature of *Xanthomonads*.” *BMC Genomics* 14(1). doi: 10.1186/1471-2164-14-761.
- Denancé, Nicolas, Martial Briand, Romain Gaborieau, Sylvain Gaillard, and Marie Agnès Jacques. 2019. “Identification of Genetic Relationships and Subspecies Signatures in *Xylella Fastidiosa*.” *BMC Genomics* 20(1):1–21. doi: 10.1186/s12864-019-5565-9.
- Deng, Dong, Chuangye Yan, Xiaojing Pan, Magdy Mahfouz, Jiawei Wang, Jian-Kang Zhu, Yigong Shi, and Nieng Yan. 2012. “Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors.” *Science* 335(6069):720–23. doi: 10.1126/science.1215670.Structural.
- Didelot, Xavier, and Daniel J. Wilson. 2015. “ClonalFrameML: Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes.” *PLoS Computational Biology* 11(2):1–18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004041.
- Doyle, Erin L., Nicholas J. Booher, Daniel S. Standage, Daniel F. Voytas, Volker P. Brendel, John K. Vandyk, and Adam J. Bogdanove. 2012. “TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL Effector Design and Target Prediction.” *Nucleic Acids Research* 40(W1):117–22. doi: 10.1093/nar/gks608.
- Duncan, Robert W., Shree P. Singh, and Robert L. Gilbertson. 2011. “Interaction of Common Bacterial Blight Bacteria with Disease Resistance Quantitative Trait Loci in Common Bean.” *Phytopathology* 101(4):425–35. doi: 10.1094/PHYTO-03-10-0095.
- EPPO. 2023. “*Xanthomonas Phaseoli* Pv. *Phaseoli*. EPPO Datasheets on Pests Recommended for Regulation. Available Online.” Retrieved (<https://gd.eppo.int/taxon/XANTPH>).
- Erkes, Annett, Stefanie Mücke, Maik Reschke, Jens Boch, and Jan Grau. 2019. *PrediTALE: A Novel Model Learned from Quantitative Data Allows for New Perspectives on TALE Targeting*. Vol. 15.
- Ferreira, Marisa A. S. V., Sophie Bonneau, Martial Briand, Sophie Cesbron, Perrine Portier, Armelle Darrasse, Marco A. S. Gama, Maria Angélica G. Barbosa, Rosa de L. R. Mariano, Elineide B. Souza, and Marie Agnès Jacques. 2019. “*Xanthomonas Citri* Pv. *Viticola* Affecting Grapevine in Brazil: Emergence of a Successful Monomorphic Pathogen.” *Frontiers in Plant Science* 10(April):1–18. doi: 10.3389/fpls.2019.00489.

- Francisco, Alexandre P., Cátia Vaz, Pedro T. Monteiro, José Melo-Cristino, Mário Ramirez, and João A. Carriço. 2012. “PHYLOViZ: Phylogenetic Inference and Data Visualization for Sequence Based Typing Methods.” *BMC Bioinformatics* 13(1). doi: 10.1186/1471-2105-13-87.
- Friesen, Maren L. 2020. “Social Evolution and Cheating in Plant Pathogens.” *Annual Review of Phytopathology* 58:55–75. doi: 10.1146/annurev-phyto-010820-012740.
- Gaudin, Charlotte, Christopher Gihaut, Martial Briand, Abi S. A. Marques, Marisa A. S. V Ferreira, Marie-agnès Jacques, and Nicolas W. G. Chen. 2023. “Whole Genome Sequences of Nine Xanthomonas Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean.” *Microbiology Resource Announcements* 1(7):9–11.
- Grau, Jan, Annett Wolf, Maik Reschke, Ulla Bonas, Stefan Posch, and Jens Boch. 2013. “Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites.” *PLoS Computational Biology* 9(3). doi: 10.1371/journal.pcbi.1002962.
- Grimault, V., V. Olivier, M. Rolland, A. Darrasse, and A. Jacques M. 2014. “Detection of Xanthomonas Axonopodis Pv. Phaseoli and Xanthomonas Axonopodis Pv. Phaseoli Var. Fuscans in Phaseolus Vulgaris (Bean).” *ISTA International Rules for Seed Testing Chapter 7(International rules for seed testing):345.*
- Guindon, Stéphane, Jean Francois Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. “New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.” *Systematic Biology* 59(3):307–21. doi: 10.1093/sysbio/syq010.
- Halsted, B. D. 1893. *A BACTERIUM OF PHASEOLUS*. N. J. Agr. Expt. Sta. Ann. Rpt.
- Hunter, P. R. 1990. “Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 28(9):1903–5. doi: 10.1128/jcm.28.9.1903-1905.1990.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. “Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: An Application of Simpson’s Index of Diversity.” *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465–66. doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
- Kalinowski, Steven T. 2005. “HP-RARE 1.0: A Computer Program for Performing Rarefaction on Measures of Allelic Richness.” *Molecular Ecology Notes* 5(1):187–89. doi:

10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x.

- Kamruzzaman, Muhammad, Alma Y. Wu, and Jonathan R. Iredell. 2021. “Biological Functions of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria.” *Microorganisms* 9(6). doi: 10.3390/microorganisms9061276.
- Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei Ichi Kuma, and Takashi Miyata. 2002. “MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform.” *Nucleic Acids Research* 30(14):3059–66. doi: 10.1093/nar/gkf436.
- Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. 2013. “MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.” *Molecular Biology and Evolution* 30(4):772–80. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Lazo, Gerard R., and Dean W. Gabriel. 1987. “Conservation of Plasmid DNA Sequences and Pathovar Identification of Strains of *Xanthomonas Campestris*.” *Phytopathology* 77(3):448.
- López, Ruth, Carmen Asensio, and Robert L. Gilbertson. 2006. “Phenotypic and Genetic Diversity in Strains of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas Campestris* Pv. *Phaseoli* and *X. Campestris* Pv. *Phaseoli* Var. *Fuscans*) in a Secondary Center of Diversity of the Common Bean Host Suggests Multiple Introduction Events.” *Phytopathology* 96(11):1204–13. doi: 10.1094/PHYTO-96-1204.
- Mahuku, G. S., C. Jara, M. A. Henriquez, G. Castellanos, and J. Cuasquer. 2006. “Genotypic Characterization of the Common Bean Bacterial Blight Pathogens, *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Phaseoli* and *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Phaseoli* Var. *Fuscans* by Rep-PCR and PCR-RFLP of the Ribosomal Genes.” *Journal of Phytopathology* 154(1):35–44. doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.01057.x.
- Martins, Paula M. M., Marcos A. Machado, Nicholas V. Silva, Marco A. Takita, and Alessandra A. De Souza. 2016. “Type II Toxin-Antitoxin Distribution and Adaptive Aspects on *Xanthomonas* Genomes: Focus on *Xanthomonas Citri*.” *Frontiers in Microbiology* 7(MAY):1–13. doi: 10.3389/fmicb.2016.00652.
- Mkandawire, Alexander B. C., Robert B. Mabagala, Pablo Guzmán, Paul Gepts, and Robert L. Gilbertson. 2004. “Genetic Diversity and Pathogenic Variation of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas Campestris* Pv. *Phaseoli* and *X. Campestris* Pv. *Phaseoli* Var. *Fuscans*) Suggests Pathogen Coevolution with the Common Bean.” *Phytopathology*

94(6):593–603. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.593.

Moscou, Matthew J., and Adam J. Bogdanove. 2009. “A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors.” *Science* 326(December):1501.

Nga-Sze Mak, Amanda, Philip Bradley, Raul A. Cernadas, Adam J. Bogdanove, and Barry L. Stoddard. 2012. “The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target.” *Science* 335(6069):716–19. doi: 10.1126/science.1216211.

de Paiva, Bruna Alicia Rafael, Adriane Wendland, Nara Cristina Teixeira, and Marisa A. S. V. Ferreira. 2020. “Rapid Detection of *Xanthomonas Citri* Pv. *Fuscans* and *Xanthomonas Phaseoli* Pv. *Phaseoli* in Common Bean by Loop-Mediated Isothermal Amplification.” *Plant Disease* 104(1):198–203. doi: 10.1094/PDIS-02-19-0325-RE.

Parks, Donovan H., Michael Imelfort, Connor T. Skennerton, Philip Hugenholtz, and Gene W. Tyson. 2015. “CheckM : Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates , Single Cells , and Metagenomes.” 1043–55. doi: 10.1101/gr.186072.114.Freely.

Pérez-Quintero, Alvaro L., Léo Lamy, Jonathan L.Gordon, Aline Escalon, Sébastien Cunnac, Boris Szurek, and Lionel Gagnevin. 2015. “QueTAL: A Suite of Tools to Classify and Compare TAL Effectors Functionally and Phylogenetically.” *Frontiers in Plant Science* 6(AUG):1–16. doi: 10.3389/fpls.2015.00545.

Pérez-Quintero, Alvaro L., Luis M. Rodriguez-R, Alexis Dereeper, Camilo López, Ralf Koebnik, Boris Szurek, and Sebastien Cunnac. 2013. “An Improved Method for TAL Effectors DNA-Binding Sites Prediction Reveals Functional Convergence in TAL Repertoires of *Xanthomonas Oryzae* Strains.” *PLoS ONE* 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0068464.

Perez-Quintero, Alvaro L., and Boris Szurek. 2019. “A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research.” *Annual Review of Phytopathology* 57(1):459–81. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100026.

Petry, Nicolai, Erick Boy, James P. Wirth, and Richard F. Hurrell. 2015. “Review: The Potential of the Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*) as a Vehicle for Iron Biofortification.” *Nutrients* 7(2):1144–73. doi: 10.3390/nu7021144.

Ruh, Mylène, Martial Briand, Sophie Bonneau, Marie Agnès Jacques, and Nicolas W. G. Chen. 2017. “*Xanthomonas* Adaptation to Common Bean Is Associated with Horizontal

- Transfers of Genes Encoding TAL Effectors.” *BMC Genomics* 18(1):1–18. doi: 10.1186/s12864-017-4087-6.
- Schmutz, Jeremy, Phillip E. McClean, Sujan Mamidi, G. Albert Wu, Steven B. Cannon, Jane Grimwood, Jerry Jenkins, Shengqiang Shu, Qijian Song, Carolina Chavarro, Mirayda Torres-Torres, Valerie Geffroy, Samira Mafi Moghaddam, Dongying Gao, Brian Abernathy, Kerrie Barry, Matthew Blair, Mark A. Brick, Mansi Chovatia, Paul Gepts, David M. Goodstein, Michael Gonzales, Uffe Hellsten, David L. Hyten, Gaofeng Jia, James D. Kelly, Dave Kudrna, Rian Lee, Manon M. S. Richard, Phillip N. Miklas, Juan M. Osorno, Josiane Rodrigues, Vincent Thareau, Carlos A. Urrea, Mei Wang, Yeisoo Yu, Ming Zhang, Rod A. Wing, Perry B. Cregan, Daniel S. Rokhsar, and Scott A. Jackson. 2014. “A Reference Genome for Common Bean and Genome-Wide Analysis of Dual Domestications.” *Nature Genetics* 46(7):707–13. doi: 10.1038/ng.3008.
- Schouls, Leo M., Han G. J. Van Der Heide, Luc Vauterin, Paul Vauterin, and Frits R. Mooi. 2004. “Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Dutch Bordetella Pertussis Strains Reveals Rapid Genetic Changes with Clonal Expansion during the Late 1990s.” *Journal of Bacteriology* 186(16):5496–5505. doi: 10.1128/JB.186.16.5496-5505.2004.
- Shidore, T., and L. R. Triplett. 2017. “Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Plant Disease.” *Annual Review of Phytopathology* 55:161–79. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035559.
- Singh, Shree P., and Howard F. Schwartz. 2010. “Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review.” *Crop Science* 50(6):2199–2223. doi: 10.2135/cropsci2009.03.0163.
- Smith, E. F. 1897. “Description of Bacillus Phaseoli.” *Botanical Gazette* (24):192.
- Stamatakis, Alexandros. 2014. “RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies.” *Bioinformatics* 30(9):1312–13. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Timilsina, Sujan, Neha Potnis, Eric A. Newberry, Prabha Liyanapathirana, Fernanda Iruegas-Bocardo, Frank F. White, Erica M. Goss, and Jeffrey B. Jones. 2020. “Xanthomonas Diversity, Virulence and Plant–Pathogen Interactions.” *Nature Reviews Microbiology* 18(8):415–27. doi: 10.1038/s41579-020-0361-8.
- Wernersson, Rasmus, and Anders Gorm Pedersen. 2003. “RevTrans: Multiple Alignment of

Coding DNA from Aligned Amino Acid Sequences.” *Nucleic Acids Research* 31(13):3537–39. doi: 10.1093/nar/gkg609.

Xie, W., T. Smith, G. Perry, and P. K. Pauls. 2016. “Towards an Understanding of Interactions between Bacterial Virulence Factors and Genes in Bean Resistance QTL for Breeding Beans with Durable Common Bacterial Blight Resistance.” *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 59:13–14.

Zaumeyer, W. J., and H. Rex Thomas. 1957. *A Monographic Study of Bean Diseases and Methods for Their Control*.

Zhang, Jianzhi. 2003. “Evolution by Gene Duplication: An Update.” *Trends in Ecology and Evolution* 18(6):292–98. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00033-8.

Chapitre 2 : Etude de gènes candidats pour la résistance du haricot à la graisse commune

I. Préambule

Une analyse préliminaire a été réalisée afin d'évaluer la résistance de différents génotypes de haricots à une souche de *Xpp* (6546R) et de *Xcf* (7767R) (Figure 1). Un gradient de résistance à la graise commune a été montré, avec une tolérance des génotypes parfois différente en fonction de la souche inoculée. Ces résultats permettent de sélectionner des génotypes adaptés à diverses futures études. Le génotype JaloEEP558 s'avère être le plus sensible aux deux souches, c'est pourquoi l'ensemble des analyses présentées dans ce chapitre a été effectué sur ce génotype andin. Linex, Contender, Flavert et Facila montrent des niveaux de sensibilité variables en fonction de la souche inoculée et ont également été utilisés dans le cadre de notre étude.

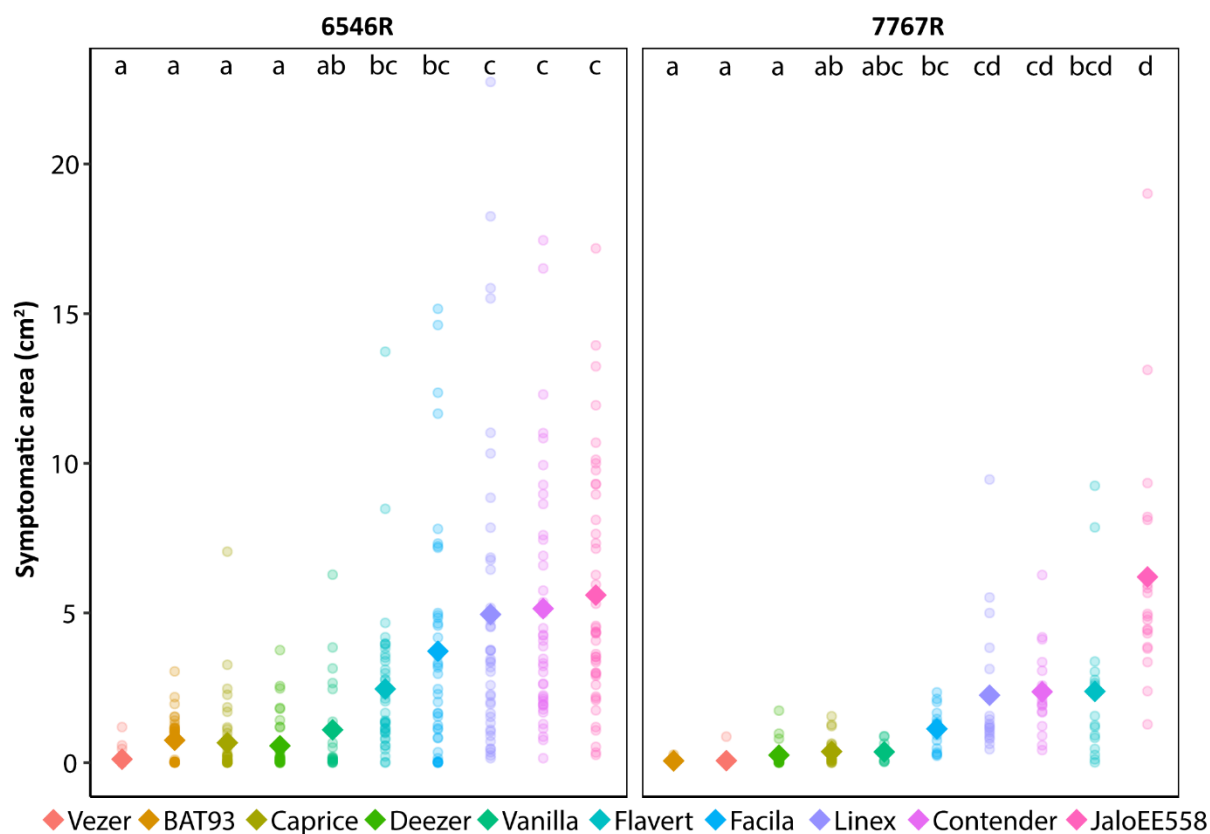


Figure 1. Gradient de résistance à la CBB chez dix génotypes de haricot commun. Surface symptomatique moyenne quantifiée dix jours après l'inoculation des souches individuelles (protocole dans le chapitre 2.2, Gaudin et al., in prep.). Deux expériences indépendantes ont été conduites pour la souche 6546R (n = 20-44 plantes par traitement) et une seule pour la souche 7767R (n = 10-20 plantes par traitement). Le test de Kruskal Wallis a indiqué un effet significatif ($p < 0,05$) des traitements. Les lettres renvoient à des valeurs significativement différentes après le test de Dunn.

Lors de précédents travaux effectués pendant la thèse de Justine Foucher, une étude comparative a été menée par RNAseq sur les génotypes de haricot commun sensible JaloEEP558 et résistant BAT93 à la CBB (Foucher *et al.*, 2020). Les deux génotypes ont été inoculés avec une souche de *Xpp* (CFBP6546R), permettant ainsi de mettre en évidence une

liste de gènes dont l'induction serait potentiellement impliquée dans la résistance du haricot à la graisse commune.

En continuité de cette recherche, la première partie de ce chapitre comprend des travaux effectués lors de mon stage M2 et poursuivis pendant ma thèse, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les défenses du haricot. Cette étude présente l'évaluation de 14 gènes dans la réduction des symptômes, ainsi que la validation du gène *PvOFP7* dans la résistance du haricot à la graisse commune et son impact sur le transcriptome de la plante. Les résultats de cette analyse sont rédigés sous forme d'un article actuellement soumis pour publication, dont je suis première auteure. J'ai produit et analysé l'ensemble des résultats, conçu les figures et rédigé le premier draft de l'article.

Dans une deuxième partie, des analyses complémentaires à cet article sont présentées. Ces analyses ont été effectuées dans le but de caractériser les conséquences moléculaires liées à l'induction du gène *PvOFP7*. Elles ont consisté à mesurer différents paramètres généralement liés aux réponses de défense des plantes, tels que le dépôt de callose, la production de phytohormones (auxine, acide abscissique, acide salicylique et acide jasmonique) ainsi que d'éventuelles modifications pariétales induites par *PvOFP7* analysées par différentes méthodes. Ces analyses ont combiné des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB), un dosage biochimique des oses constitutifs des polysaccharides de la paroi et une évaluation de la mobilité de l'eau à l'intérieur des tissus par Time Domain Résonance Magnétique Nucléaire (TD- RMN). Par ailleurs, un test de pouvoir pathogène a été réalisé sur gousses afin d'estimer si la résistance médiée par *PvOFP7* pouvait être efficace sur cet organe. Ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article précédent, principalement en raison d'une incapacité à avoir pu tenter de les reproduire de manière indépendante. J'ai participé à la production du matériel végétal et à l'ensemble des analyses (test de callose, RMN, MEB, dosages biochimiques et hormonales, test sur gousse et gradient de résistance).

II. The transcription repressor *PvOFP7* is a key regulator of common bean defense against common bacterial blight

Charlotte GAUDIN¹, Anne PREVEAUX¹, Nathan AUBINEAU¹, Damien LE GOFF¹, Marie-Agnès JACQUES¹, Nicolas W.G. CHEN^{1*}.

¹Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

*Corresponding author: nicolas.chen@agrocampus-ouest.fr

Key words: Common bacterial blight, *Phaseolus vulgaris*, disease, resistance, *Xanthomonas*, Heat shock proteins, cell wall.

ABSTRACT

- Common bacterial blight of bean (CBB) is a devastating seed-transmitted disease caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The genes responsible for CBB resistance are largely unknown. moreover, the lack of reproducible and universal transformation protocol limits the study and improvement of genetic traits in common bean.
- We produced *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains expressing designer Transcription-Activator Like Effectors (dTALEs) to target 14 candidate genes and performed *in planta* assays in a susceptible common bean to analyse if the transcriptional induction of these genes genotype could confer resistance to CBB.
- Induction of *PvOFP7*, *PvAP2-ERF71* and *PvExpansinA17* resulted in CBB symptom reduction. In particular, *PvOFP7* induction led to strong symptom reduction, linked to reduced bacterial growth *in planta* at the early stage of the colonisation. RNA-Seq analysis revealed up-regulation of cell wall formation and primary metabolism, and major down-regulation of Heat Shock Proteins.
- Our results demonstrate that *PvOFP7* is a major contributor to CBB resistance, and underline the usefulness of dTALEs for highlighting genes of quantitative activity.

INTRODUCTION

Plants possess an immune system to defend themselves against a large array of pathogens (Jones & Dangl, 2006). The first layer of this immune system corresponds either to the extracellular perception of microbial- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs or PAMPs) through pattern-recognition receptors (PRRs) present at the surface of the plant cell,

or to the intercellular perception of microbial effectors through proteins belonging to the nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NLR) family (Dodds & Rathjen, 2010; Ngou *et al.*, 2022). Following perception, both PAMP-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) initiate complex signalling pathways usually involving a burst of reactive oxygen species (ROS), calcium influx and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, leading to the activation of multiple transcription factors (TF) and to the expression of defense-related genes (Tsuda & Katagiri, 2010; Peng *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2021). These pathways are associated to the biosynthesis of defense-related phytohormones such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) or ethylene (ET) and ultimately lead to mechanisms aiming at limiting pathogen propagation (Pieterse *et al.*, 2012; Checker *et al.*, 2018). These mechanisms may include strengthening of the plant cell wall through callose deposition and/or production of antimicrobial compounds. The ETI response is often more intense than PTI and usually results in a hypersensitive response (HR) associated to localized cell death to halt pathogen progression (Balint-Kurti, 2019; Yuan *et al.*, 2021).

Legumes constitute a major food group presenting both high nutritional properties and low negative environmental impact (Foyer *et al.*, 2016; Willett *et al.*, 2019). As such, legumes contribute both to healthy people and a healthy planet (Uebersax *et al.*, 2022). Among legumes, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important crop for direct human consumption that is used worldwide for its edible pods and seeds (Bitocchi *et al.*, 2017). In addition to having recognized human health benefits and nutritional composition (Didinger & Thompson, 2022), common bean is considered an affordable species for sustainable agriculture (Uebersax *et al.*, 2022).

Common bacterial blight of bean (CBB) is a devastating seed-transmitted disease caused by two phylogenetically distant bacterial species, *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* that induce identical symptoms on common bean (Chen *et al.*, 2021). This disease represents an important economic and agricultural threat to both edible bean production and bean seed industry worldwide. Therefore, it is essential to better understand the determinants of resistance to CBB in order to achieve durable common bean production. Resistance to CBB has been extensively studied (Singh & Schwartz, 2010; Singh & Miklas, 2015) and appears to be a complex process involving numerous quantitative trait loci (QTLs), but the genes responsible for this trait remain largely unknown.

More generally, a limiting aspect to the study and improvement of genetic traits in common bean is the lack of reproducible and universal transformation protocol. Indeed, although successful transformation has been achieved in few cases (Aragão *et al.*, 1998; Bonfim

et al., 2007; Collado *et al.*, 2015), protocols remain largely genotype-dependent and both transformation and regeneration rates are still extremely low (Veltcheva *et al.*, 2005; Hnatuszko-konka *et al.*, 2014, 2019). Thus, except for hairy-root systems (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Voß *et al.*, 2022), gene editing methods such as CRISPR/Cas9 have yet to be democratized for common bean (Toili, 2022). Transient expression via *Agrobacterium* (Richard *et al.*, 2021) and virus-induced gene silencing (VIGS) methods have been developed using the bean pod mottle virus (Zhang *et al.*, 2013; Pflieger *et al.*, 2014). However, for VIGS to work, the tested genotypes must be susceptible to the virus, and the target gene expression or silencing takes days, which is often incompatible with disease phenotyping assays.

Bacteria from the *Xanthomonas* genus possess the ability of directly manipulating their host transcriptome by using type III effectors named Transcription-Activator Like Effectors (TALEs) able to bind to specific DNA sequences in the promoter region of target genes and recruit the host cell's transcriptional machinery to induce gene expression (Boch & Bonas, 2010; Perez-Quintero & Szurek, 2019). The central part of the TALE protein is composed of a variable number of repeats of 34 amino acids each, resulting in a helical structure that allows the TALE to wrap around the DNA double helix (Deng *et al.*, 2012; Nga-Sze Mak *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2013). Within each repeat, the doublet of amino acids at positions 12 and 13, called repeat variable diresidue (RVD), determines the binding specificity to a given nucleotide (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). This TALE code linking RVDs to nucleotides, together with individual cloning of repeats allows the *in vitro* construction of designer TALEs (dTALEs) of any chosen RVD order, which can be used to induce any desired gene within an eukaryotic genome (Geißler *et al.*, 2011).

Here, we used dTALEs as tools to study 14 candidate genes presenting different expression patterns during CBB infection in resistant versus susceptible common bean genotypes (Foucher *et al.*, 2020). We produced *X. phaseoli* pv. *phaseoli* strains expressing dTALEs targeting the promoter region of each candidate gene and performed *in planta* assays to analyse if the transcriptional induction of these genes in a susceptible common bean genotype could confer resistance to CBB.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growing conditions

Bacterial strains used in this study are wild-type and dTALE-complemented versions of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* strain 6546R (Briand *et al.*, 2021), a spontaneous

rifamycin-resistant derivative of strain CFBP 6546. All strains were grown for 48h at 28°C on Trypticase Soy Agar (TSA) medium (17.0 g.l⁻¹ pancreatic digest of casein, 3.0 g.l⁻¹ enzymatic digest of soya bean, 5.0 g.l⁻¹ NaCl, 2.5 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 2.5 g.l⁻¹ glucose, 15 g.l⁻¹ agar, pH 7.3 at 25°C), then for 24h at 28°C on a 1/10 dilution of TSA medium (except for agar kept at 15 g.l⁻¹) to obtain fresh bacterial cultures for pathogenicity assays. When necessary, antibiotics were added to the medium at the following final concentrations: rifamycin, 50 µg.ml⁻¹ and gentamycin, 20 µg.ml⁻¹.

Construction of dTALEs

Candidate genes potentially involved in common bean resistance to CBB were retrieved from Foucher *et al.* (2020). The promoter sequence of each candidate gene was analysed with TAL Effector Targeter, a bioinformatic tool that can predict optimal dTALE binding sites (Cermak *et al.*, 2011; Doyle *et al.*, 2012). The specificity of target sequences was verified with BLASTn (Evalue < 1) on both the genome of common bean genotype JaloEEP558 (Altschul *et al.*, 1990; Foucher *et al.*, 2020) and the common bean reference genome (v2.1, DOE-JGI and USDA-NIFA, <http://phytozome.jgi.doe.gov/> ; Schmutz *et al.* 2014). The dTALEs were built using the Golden TAL technology (Geißler *et al.*, 2011) and expressed in the Golden Gate-compatible vector pSKX1 (Streubel *et al.*, 2013). The dTALE constructions, or the empty vector (EV) used as control, were introduced into strain 6546R by electroporation. Rifamycin- and gentamycin-resistant clones were selected upon plating on 1/10 TSA medium supplemented with appropriate antibiotics. For each dTALE, *in vitro* growth assays were performed on three different clones, in order to choose the clone that had the closest growth profile compared to the strain carrying an empty vector (data not shown).

Pathogenicity assays

Plants from the CBB-susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes JaloEEP558, Contender, Facila, Flavert and Linex were cultivated in a growth chamber at 23/20 °C (day/night) with 80% relative humidity and a photoperiod of 16 h. Plants were watered every two days, with water for the first 10 days, then with a nutrient solution of N-P-K (15–10–30) until the end of the assay. One day before inoculation, temperature and humidity were increased to 28/25°C and 95% relative humidity to optimize infection. Inoculation was performed by rubbing the first leaves of 8-day-old plants using bacterial suspensions at 1 × 10⁸ cfu.ml⁻¹ for symptom quantification, or 1 × 10⁶ cfu.ml⁻¹ for bacterial population measurements, as described in Foucher *et al.* (2021), except that inoculates were rubbed using a dauber bottle (Vaessen

creative, ref: SKU:7005-009) instead of gloved finger. Water-inoculated plants were used as controls. Two days after inoculation, relative humidity was decreased back to 80%, but temperature was maintained at 28/25°C. *In planta* bacterial populations were evaluated at 0, 4, 7, and 11 days post inoculation (dpi). Each sample corresponded to twelve 1.2cm-diameter disks collected from the two first leaves of each plant (6 disks per leaf). Samples were put in leak-proof plastic bags, ground with a rolling pin and resuspended in 2ml of sterile water. Suspensions of appropriate dilutions were plated on 1/10 TSA medium supplemented with appropriate antibiotics, then kept at 28°C for 72h before counting. Symptoms were quantified 10 dpi by machine learning-based imaging using Ilastik v.1.3.3 (Berg *et al.*, 2019) as previously described (Foucher *et al.*, 2021).

RNA isolation and RT-qPCR assays

To obtain homogeneously inoculated plant tissues, leaflets from the first trifoliate leaves (stage V1) were detached from the plant and vacuum-infiltrated for 1 min into bacterial suspensions at 1×10^8 cfu.ml⁻¹ or pure sterile distilled water as control. Infiltrated leaflets were maintained in Petri dishes by dipping the petiole in water agar (0.7%) and incubated at 28°C/25°C (day/ night) with a photoperiod of 16 h. Sampling was performed 48 hours after inoculation. Each sample corresponded to six 1.2 cm-diameter leaf disks collected from three leaflets (two disks per leaflet) and immediately frozen in liquid nitrogen, then conserved at -80°C. Samples were ground in fine powder using a ball mill for 2x30s at 30Hz. Total RNA was isolated using the NucleoSpin RNA Plus Mini kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer's recommendations.

Reverse transcription, qPCR primers design and qPCR assays were performed as described in Foucher *et al.* (2020). Relative expression levels were calculated using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method (Vandesompele *et al.*, 2002), and normalized to reference genes *EF1-α* (Phvul.004G060000), *Act11* (Phvul.008G011000) and *IDE* (Phvul.001G133200). Each experiment was performed using three biological samples as replicates, with two technical replicates per sample.

RNA-Seq experiments

RNA extraction was performed following the same procedure as described for RT-qPCR assays, using three independent biological samples per modality. RNA-Seq was performed at the Beijing Genomics Institute (BGI), Hong Kong, China. RNA-Seq libraries were prepared using the DNBSEQ Transcriptome protocol. Quality control was done using Agilent

2100 chips. Paired-end RNA sequencing (2 x 100 bp) was performed on a DNBSEQ-G400 sequencer. After filtering and quality control using Phred+33, this led to around 24 million clean paired-end reads per sample, with Q20% above 98%. Total reads were mapped to the common bean reference genome (Schmutz *et al.*, 2014) and counted using Salmon v1.5.1 (Patro *et al.*, 2017).

Analysis of differentially-expressed genes

Analysis of RNA-Seq data was performed using the R pipeline Askor v0.1 (Carvalho *et al.*, 2021) on the GeneOuest bioinformatics Galaxy platform (Galaxy GenOuest, <https://www.genouest.org>). Askor performs a suite of statistical analyses including filtering and normalization of raw counts into count per million (CPM) mapped reads, Principal Component Analysis (PCA), differential gene expression analysis using EdgeR v3.32.1 with default parameters (Robinson *et al.*, 2009), as well as different graphical outputs such as volcano plots and heatmaps (Supplemental figure 1). Differentially-expressed genes (DEG) were retrieved using the EV strain as control, with false discovery rate (FDR) threshold of 0.05 and $|\text{Log}_2(\text{FC})| > 1$. Lists of common bean genes corresponding to transcription factors, transcription regulators and kinases (including receptor-like kinases) were retrieved from the iTAK database (<http://itak.feilab.net>) (Zheng *et al.*, 2016). The complete set of genes encoding nucleotide-binding leucine-rich repeat (NL) proteins was retrieved according to Richard *et al.* (2017). Enrichment of functional categories were performed using the Wilcoxon rank sum test and PageMan functions available in MapMan v3.6.0RC1 (Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005), which was also used for visualisation of DEGs in different functional pathways.

Phylogenetic analysis

Amino acid sequences of 19 OVATE Family Protein (OFP) genes from *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2014) and 20 from common bean (Schmutz *et al.* 2014) were retrieved and aligned using MAFFT v.1.3.6 in Geneious v.9.1.8 (<https://www.geneious.com>). Phylogenetic analysis was made on the conserved OVATE domain (Liu *et al.*, 2014). A maximum likelihood phylogenetic tree was generated using PhyML v.2.2.3 in Geneious v.9.1.8 (<https://www.geneious.com>) and 100 bootstrap iterations. The tree was visualised and edited with MEGA v.3.6.0 (Kumar *et al.*, 2008).

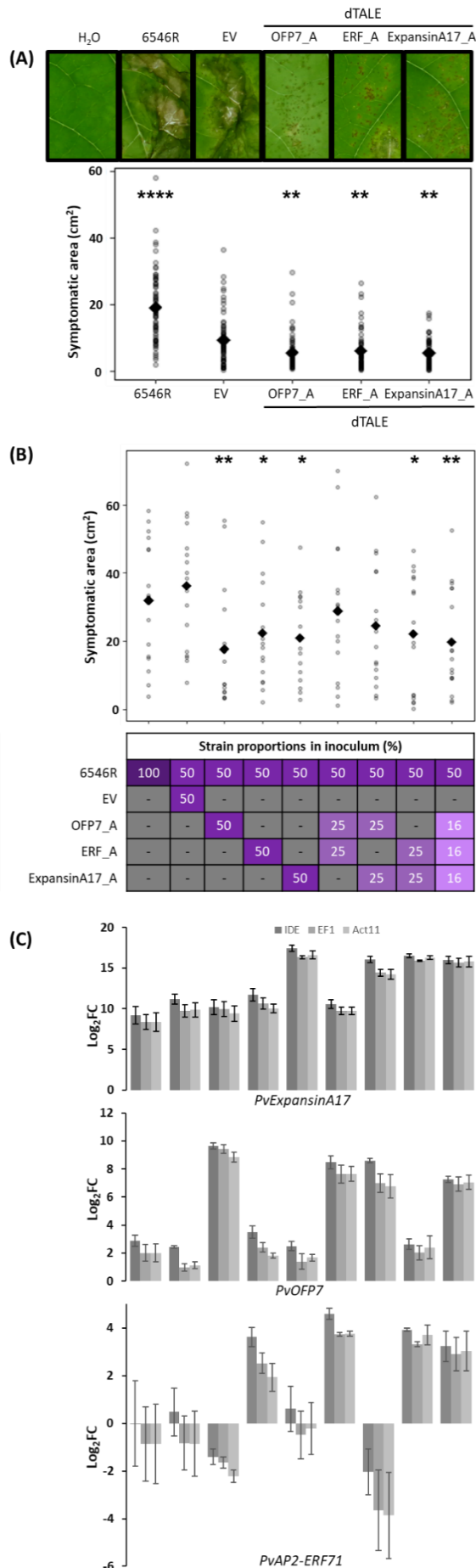


Fig. 1. CBB symptom reduction observed after induction of three candidate genes. A) Average symptomatic area quantified 10 days after inoculation of individual strains. Results presented here combined four independent experiments (n = 67 plants per treatment). B) Average symptomatic area quantified 10 days after co-inoculation of strain mixtures described in the table below. Mixtures were made at 1:1 by the 6546R strain and dTALE-bearing strains at equal concentrations. Results cumulated data from two independent experiments (n = 17 plants per treatment). C) Expression levels of *PvExpansinA17*, *PvOFP7* and *PvAP2-ERF71* measured by qRT-PCR at 2 days after vacuum infiltration of strain mixtures presented in the table above. Log₂(FC) were calculated using the 2^(-ΔΔCT) method (n = 3 samples per treatment). For all experiments, inoculum concentration was 1 x 10⁸ cfu.ml⁻¹. For A and B, each dot represents one sample, while squares correspond to the mean of each treatment. Kruskal Wallis test indicated significant effect for both A and B (P<0.05). The number of stars refers to significantly different values compared to the EV (A) or the 6546R+EV (B) after Dunn's test (*, P< 0.05; **, P< 0.01; ***, P< 0.001; ****, P< 0.0001).

RESULTS

Candidate gene screening identified three genes linked to CBB symptom reduction

To search for genes involved in common bean resistance to CBB, we used *X. phaseoli* pv. *phaseoli* 6546R strains complemented with dTALEs to induce the expression of 14 candidate genes in the susceptible bean genotype JaloEEP558 (Supplemental table 1). These genes were chosen based on their significantly higher expression in resistant vs susceptible bean genotypes 48h after inoculation (Foucher *et al.*, 2020). Of the 14 dTALE-complemented strains, 13 led to successful induction of corresponding target gene (Supplemental figure 2). Among those, pathogenicity assays highlighted three genes (Phvul.004G157600, Phvul.007G207600 and Phvul.009G057100) whose induction was related to significant symptom reduction compared to the EV strain (Fig. 1; Supplemental figure 3). These genes were respectively induced by dTALEs ERF_A, ExpansinA17_A and OFP7_A (Supplemental table 1). Phvul.004G157600 encoded the APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) protein PvAP2-ERF71 (Kavas *et al.*, 2015), while Phvul.007G207600 and Phvul.009G057100 encoded the expansin PvExpansinA17 and the OVATE family protein (OFP) PvOFP7, respectively, based on homology with *Arabidopsis*.

For these three genes, significant symptom reduction was still observed for dTALE-carrying strains co-inoculated at equal concentrations with strain 6546R, compared to the 6546R + EV co-inoculation (Fig. 1B). This strongly suggested that the observed reduction of symptoms was indeed due to effective resistance. Intriguingly, symptom reduction was lost when co-inoculating strain 6546R with strains bearing OFP7_A together with either ExpansinA17_A or ERF_A, but was restored when co-inoculating the four strains together (Fig. 1B). This suggested negative regulatory relationships between the three genes. In accordance with this, co-induction of *PvOFP7* and *PvExpansinA17* resulted in down-regulation of *PvAP2-ERF71* (Fig. 1C). Together, these results unveiled potential regulators of common bean resistance to CBB, acting through complex and non-complementary regulatory interactions.

Induction of *PvOFP7* promotes partial resistance to CBB

In the rest of this paper, we focused on *PvOFP7* because it was previously highlighted as being the most differentially-expressed gene between resistant and susceptible plants (Foucher *et al.*, 2020), and was located in a QTL of resistance to CBB (Nodari *et al.* 1993), which was not the case for the other two candidates. *PvOFP7* belonged to the OFP family of transcription factors, comprising 20 and 19 members in *P. vulgaris* and *Arabidopsis thaliana*,

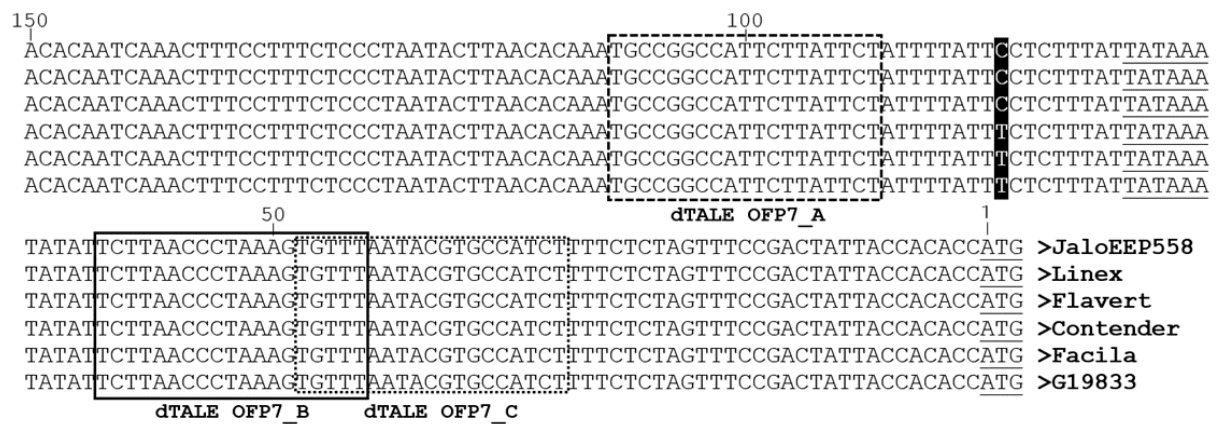


Fig. 2. Alignment of *PvOPF7* promoter region in different common bean genotypes. The TATA box and start codon are underlined. Target sequences are framed using dashed lines for dTALE-OPF7_A, solid lines for dTALE-OPF7_B and dotted lines for dTALE-OPF7_C. One polymorphic nucleotide is indicated in black while other nucleotides are identical across all sequences.

respectively (Supplemental figure 4). To validate that the observed decrease of CBB symptoms was indeed due to the induction of *PvOFP7* and not of an off-target in JaloEEP558 genome, we constructed two additional dTALEs (OFP7_B and OFP7_C) targeting different regions of the *PvOFP7* promoter (Fig. 2). For each dTALE, induction of *PvOFP7* was linked to more than 60% symptoms reduction compared to the EV strain (Fig. 3A-C). In addition, *in planta* bacterial populations were significantly reduced at 4 dpi (Fig. 3D). This observed *PvOFP7*-mediated resistance appeared partial and transitory as bacterial populations caught up with strain 6546R at 7 dpi.

Overall, the three dTALEs led to different levels of *PvOFP7* induction, symptoms and bacterial populations, with OFP7_B being the dTALE leading to the most significant differences compared to the EV. Remarkably, we observed a strong negative correlation ($r = 0.996$) between symptoms and *PvOFP7* induction levels (Fig. 3C). Such correlation was still observed for dTALE-carrying strains co-inoculated at a 1:1 ratio with strain 6546R (Fig. 3E-G), again indicating that *PvOFP7* induction was able to attenuate symptoms conferred by a wild-type strain. Altogether, these results indicated that the overexpression of *PvOFP7* contributed to dose-dependent reduction of CBB symptoms by impacting bacterial populations at the early stage of colonisation.

Moreover, the promoter region of *PvOFP7* was highly conserved across different common bean genotypes (Fig. 2). Using OFP7_B, *PvOFP7* induction led to decreased symptoms in four more or less susceptible genotypes, although not significant for Facila (Fig. 4 ; Supplemental figure 5) suggesting that *PvOFP7*-mediated resistance to CBB was ubiquitous in common bean.

Impact of *PvOFP7* induction on the common bean transcriptome

To study the metabolic pathways associated to *PvOFP7* induction in common bean, we performed an RNA-Seq analysis 48h after leaf inoculation of JaloEEP558. Principal Component Analysis showed that plants inoculated with the EV or 6546R strains formed a distinct group compared to plants inoculated with the strains carrying the dTALEs (Supplemental figure 6). In accordance with this, only four DEGs were found in plants inoculated with strain 6546R compared to EV strains indicating that the plasmid used for dTALE expression had almost no impact on the plant transcriptome (Supplemental table 2). For the strains carrying dTALEs, 2008 to 5648 DEGs were found (Supplemental figure 7), among which 952 were common to the three dTALEs (Fig. 5).

Chapitre 2 : Etude de gènes candidats pour la résistance du haricot à la gousse commune

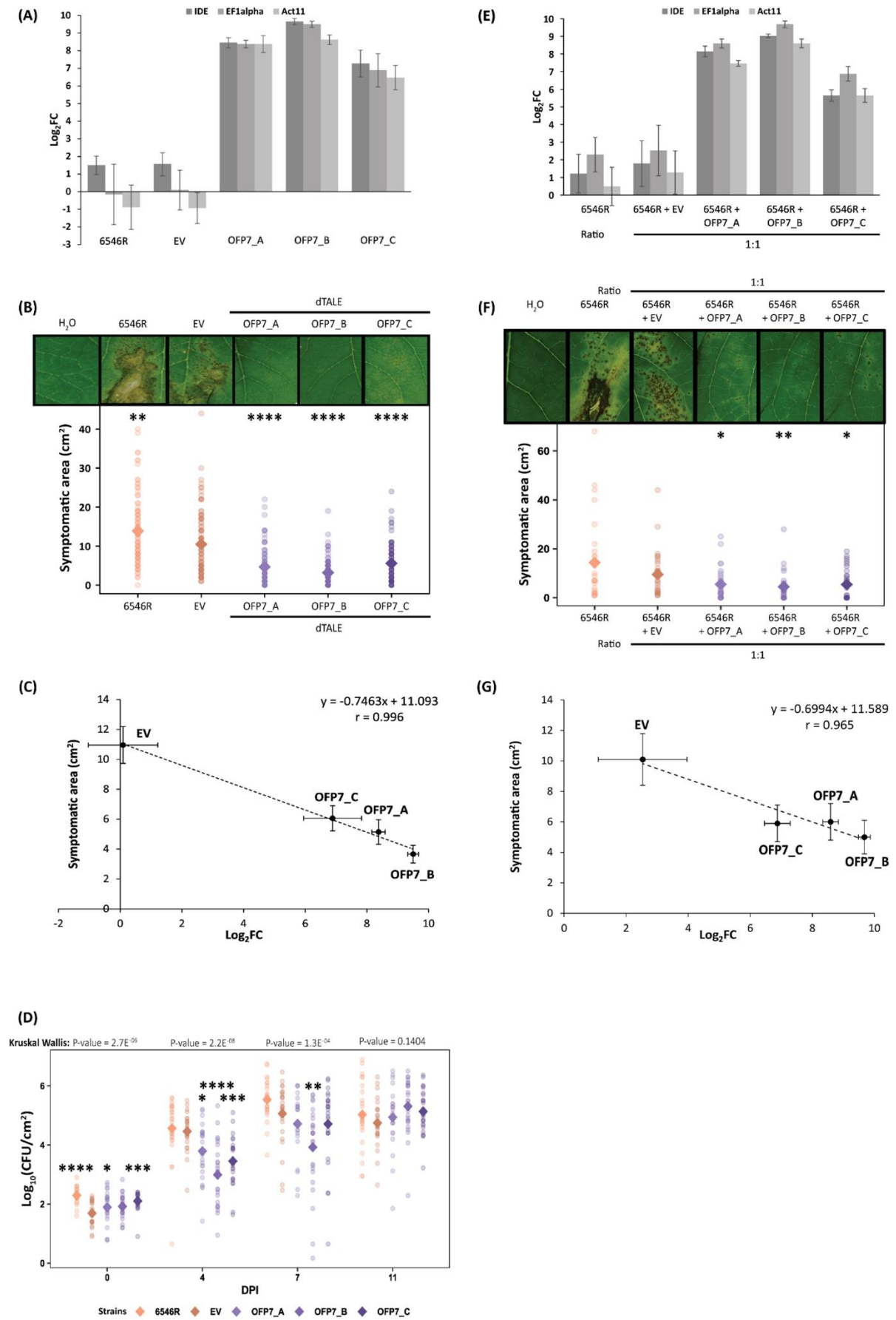


Fig. 3. Induction of *PvOFP7* correlates with decreased susceptibility to common bacterial blight. The inoculum concentrations were adjusted at 1×10^8 cfu.ml⁻¹. Kruskal Wallis test indicated significant effect ($p < 0.05$) of the treatments. The number of stars refers to significantly different values compared to the EV after Dunn's test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$). A) and E) *PvOFP7* expression levels measured by qRT-PCR two days after vacuum-infiltration. Log₂(FC) were calculated using the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. These results come from two independent experiments, each comprising three samples per treatment ($n=6$). B) and F) Average symptomatic area 10 days after inoculation of individual strains (B, $n=100$ plants per treatment) or mixtures of strains co-inoculated at a 1:1 ratio (F, $n=30$ plants per treatment). Each dot corresponds to one plant, while coloured squares correspond to the mean of each treatment. C) and G) Linear regressions between *in planta* *PvOFP7* expression levels and average symptomatic areas. C was done using the data presented in A and B while G used the data from E and F. Correlation coefficient was of -0.996 for C and -0.965 for G, which is significant ($P < 0.01$) for $n=4$ observations. *PvOFP7* expression levels presented here used EF1- α as internal control. Similar results were obtained with IDE and Act11 (data not shown). D) Bacterial population sizes over time. Dunn's test was performed separately at each sampling time. These results come from three independent experiments with 24 or 25 plants per condition.

Therefore, we considered that these 952 DEG were related to pathways impacted by the transcriptional induction of *PvOFP7*. Among these 952 DEG, 549 were down-regulated while 403 were up-regulated. This included *PvOFP7*, for which RNA-Seq expression levels correlated well with qRT-PCR results, (Supplemental figure 8).

Functional analysis of differentially-expressed genes

To search for over-represented functional categories upon *PvOFP7* induction, we performed Wilcoxon statistical testing and PageMan over-representation analysis using MapMan (Fig. 6, Supplemental table 3A). Moreover, we specifically analysed important gene families (Supplemental table 4, Supplemental figure 9) including transcription factors, transcription regulators and kinases available in the iTAK database (<http://itak.feilab.net>) (Zheng et al. 2016), as well as *R* genes from the NLR family (Richard et al. 2017). Remarkably, *PvOFP7* was the only OFP family member to be differentially expressed, indicating that its induction did not impact other OFP genes (Supplemental figure 9).

Down-regulation of heat shock proteins

The most significantly enriched MapMan category was related to stress (Supplemental table 3A). This category comprised a large majority of heat shock protein (HSP) genes, among which 48 out of 49 were highly repressed. In addition to HSPs, the heat shock transcription factor (HSF) family was the most impacted among all transcription factor families, with seven DEG, all down-regulated (Supplemental table 3B) indicating that repression of HSP proteins was related to *PvOFP7* induction and common bean resistance to CBB.

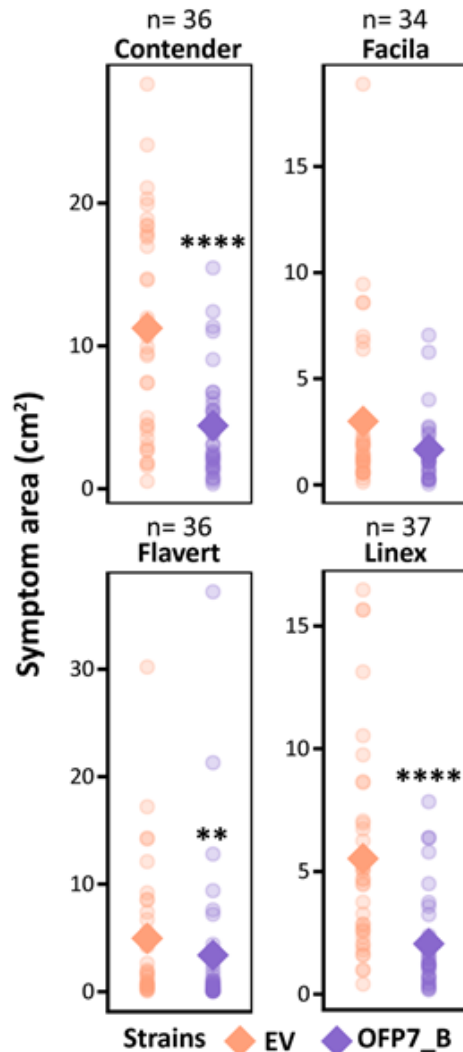


Fig. 4. *PvOFP7* induction confers partial resistance to CBB in four additional common bean accessions. Average symptomatic area at 10 dpi. Inoculum concentrations were adjusted at 1×10^8 cfu.ml⁻¹. Results presented here come from two independent experiments with a total of 34 to 37 plants per condition. Kruskal Wallis test indicated significant effect ($P < 0.05$) of the treatments, except for Facila. The number of stars refers to significantly different values compared to the EV after Dunn's test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

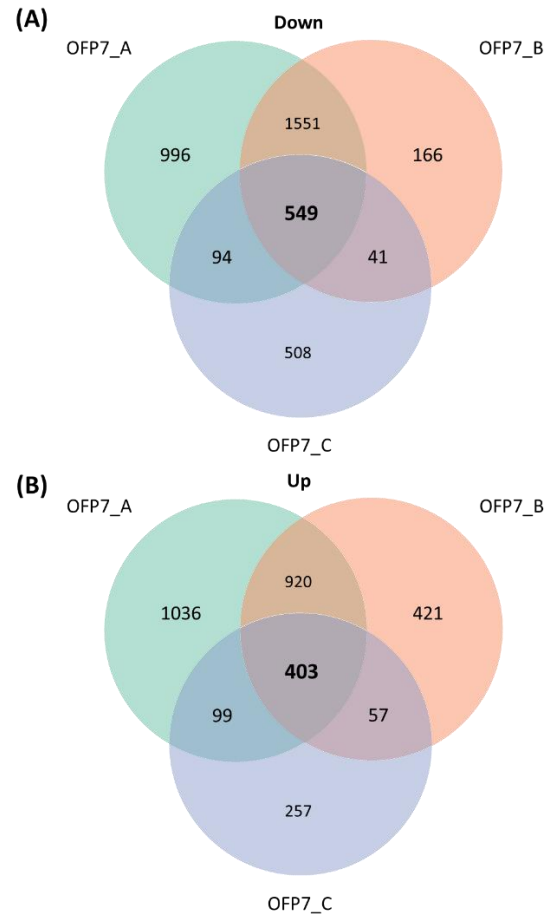


Fig. 5 Venn diagrams showing the numbers of repressed (A) or induced (B) DEG after inoculation with dTALEs-carrying strains compared to the EV.

Up-regulation of cell wall formation

The second most significantly enriched category encompassed genes linked to cell wall organisation, a majority of which being induced (Supplemental table 3A). This category comprised genes involved in both cell wall synthesis and cell wall modification/degradation, suggesting that cell wall remodelling occurred following *PvOFP7* induction (Supplemental table 3C). Significantly, DEGs involved in cell wall precursors and cellulose, hemicellulose and pectin synthesis, were almost all (12/14) up-regulated. In particular, we observed an up-regulation of genes involved in the production of UDP-glucose, which is a major building block of cell wall polymers (Supplemental figure 10A). Moreover, the whole pathway from Glucose-6-phosphate to UDP-xylose was induced, suggesting that biosynthesis of xylan and xyloglucan was up-regulated (Zhong *et al.*, 2017). Globally, these results suggested that cell wall reinforcement occurred after *PvOFP7* induction.

Up-regulation of primary metabolism.

DEGs involved in primary functions including DNA repair, protein biosynthesis and glycolysis were mostly overexpressed, while secondary metabolism and protein degradation were down-regulated (Fig. 6). For example, ubiquitin-dependent proteolysis was down-regulated (Supplemental Figure 10B). In addition, glycolysis enzymes involved in the production of acetyl-CoA were induced, while genes involved in fermentation were repressed (Supplemental figure 10C). This suggested that the plant metabolism was oriented towards respiration via the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Together, these observations suggested that *PvOFP7* induction impacted the plant metabolism towards primary metabolism, probably leading to production of energy and protection of important molecules such as DNA and proteins against degradation.

Impact on plant development

Important transcription factors, regulators and kinases families such as RLKs, MYB, bHLH or bZIP were moderately impacted following *PvOFP7* induction, although with no clear pattern of induction vs. repression (Supplemental table 4). However, we observed a clear repression of genes belonging to the type B Arabidopsis Response Regulators (ARR-B) family. In *Arabidopsis*, *arr* mutants are impaired in cell division and exhibit altered photosynthesis and anthocyanin production (Argyros *et al.*, 2008). In accordance with this, genes involved in the photosystem II and production of anthocyanins were down-regulated.

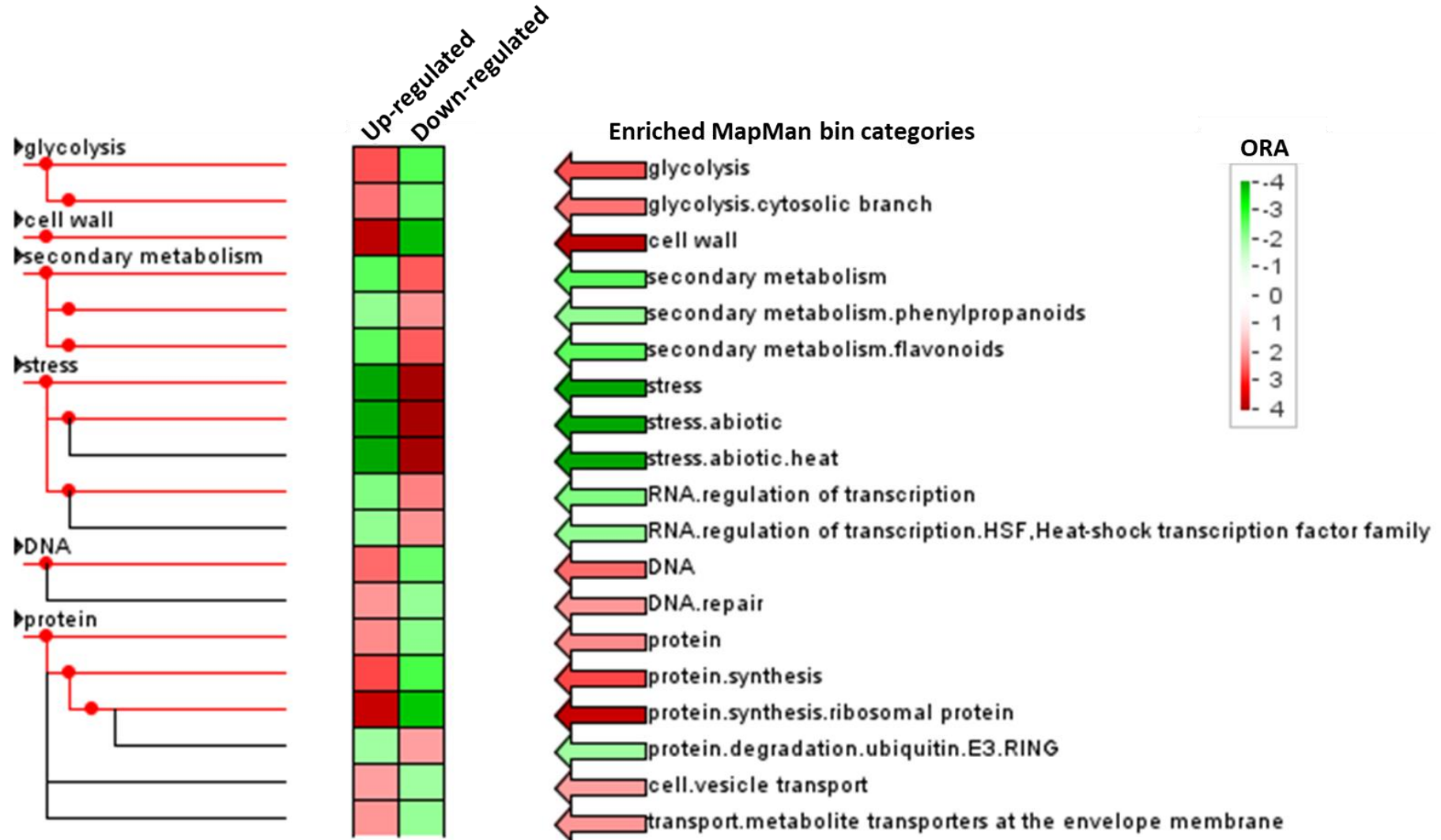


Fig. 6. Enriched functional categories after induction of *PvOFP7*. Analysis was performed using the PageMan workflow from MapMan, on the 952 DEGs common to the three strains carrying dTALEs targeting *PvOFP7*. The colour gradient corresponds to the Over-Representation Analysis (ORA) value for up-regulated (left column) or down-regulated genes (right column). ORA values over 0 (red) correspond to over-representation while values below 0 (green) correspond to under-representation of the category.

Impact on plant defense transduction

A large majority of *R* genes from the NLR family had very low expression levels and were thus removed at the filtering step of the analysis. Following *PvOFP7* induction, only five NLR genes were differentially expressed, including a cluster of four genes of the CC-NBS-LRR subfamily that were all repressed. A gene of the TIR-NBS-LRR subfamily from the *B4* cluster was the only one that was induced (Supplemental table 4). Production of secondary metabolites such as phenylpropanoids and flavonoids was down-regulated (Supplemental figure 10D). This was quite unexpected as these metabolites are known for being key components of the plant defense (Ramaroson *et al.*, 2022). Similarly, genes from the NAC family, described as key regulators of plant defenses were also repressed (Yuan *et al.*, 2019). Genes from the ERF subgroup from the AP2/ERF family were down-regulated, which was consistent with the observation that they were up-regulated in a susceptible vs resistant background after CBB inoculation (Foucher *et al.*, 2020). In all, *PvOFP7* did not appear to trigger a complete immune response, but rather be a key regulator of plant defense pathways downstream of primary signalling.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that *PvOFP7* induction leads to strong CBB symptom reduction, in link with reduced *in planta* bacterial growth at the early stage of the colonisation. *PvOFP7* belongs to OFPs, a class of plant-specific transcriptional repressors (Wang *et al.*, 2011). The first OFP to be described was OVATE, identified in tomato for its ability to cause pear-shaped fruits (Liu *et al.*, 2002). OFPs were later shown to be widely distributed in the plant kingdom and to regulate multiple aspects of plant growth and development (Liu *et al.*, 2002, 2014; Tsaballa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). However, very little is known about the role of OFPs in plant immunity. In line with our results, two OFP genes were up-regulated in a Chinese pear genotype resistant to *Venturia nashicola* (Ding *et al.*, 2020). Conversely, in cotton, GhOFP3-D13 acts as a negative regulator of plant defenses against *Verticillium dahliae* (Ma *et al.*, 2020). This raises the question of how induction of an OFP gene could participate to common bean resistance to CBB.

Here, *PvOFP7* induction led to transcriptomic modifications that overlapped only partially with pathways previously described as linked to CBB resistance (Foucher *et al.*, 2020). For example, we did not observe any up-regulation of the SA or down-regulation of photosynthesis and sugar metabolism, which were identified as potential markers of resistance

(Foucher *et al.*, 2020). Instead, we identified suppression of traits linked to susceptibility. For example, the AP2/ERF superfamily was repressed in our study while it was previously shown as being up-regulated in susceptible bean plants (Foucher *et al.*, 2020). This would suggest that *PvOFP7* induction contributed to resistance by countering pathways leading to susceptibility rather than triggering a genuine defense response. In accordance with this, *PvOFP7* induction did not trigger clear up-regulation of genes involved in resistance signalling but instead led to suppression of secondary metabolites (Supplemental figure 10D), which are important defense-related phytochemicals (Piasecka *et al.*, 2015).

Strikingly, *PvOFP7* induction was linked to strong repression of genes from the HSP family. This is in line with the work from Foucher *et al.* (2020), where HSP genes were strongly repressed in resistant and strongly induced in susceptible genotypes (Supplemental table 5), suggesting that suppression of HSPs is a key step towards resistance to CBB. HSPs are commonly described for their role in stress tolerance and plant immunity (Sun *et al.*, 2002; Park & Seo, 2015; Ul Haq *et al.*, 2019), and overexpression of HSPs is usually observed upon stress induced by pests and pathogens (Fang *et al.*, 2015). Few HSPs were shown to contribute to enhanced resistance to *Xanthomonas* in pepper and rice (Kim & Hwang, 2015; Yang *et al.*, 2020). In pepper, HSP70 and HSP90 were overexpressed during nonhost resistance to *X. citri* pv. *citri* (Garavaglia *et al.*, 2009). However, similar to what we observed in common bean, HSPs were much more accumulated in both pepper and orange during compatible than incompatible interaction with *Xanthomonas* (Garofalo *et al.*, 2009). Therefore, enhanced accumulation of HSPs could be viewed as a marker of plant susceptibility to *Xanthomonas*. Following this hypothesis, infection by the bacteria would lead to higher stress level in susceptible than resistant plant cells. In accordance with this, primary metabolism and protection against degradation were enhanced after *PvOFP7* induction, suggesting that plant cells were in a less stressed state than when confronted with the control strain.

Xanthomonas bacteria have developed several tactics to attack plant cells, among which targeting the integrity of the plant cell wall, which is a critical component of plant immunity (Bartetzko *et al.*, 2009; Bacete *et al.*, 2018). For instance, *X. oryzae* pv. *oryzae* secretes the virulence factor LipA, leading to cell wall degradation in rice (Aparna *et al.*, 2009). In tomato, TALE effector AvrHah1 from *X. gardneri* triggers water-soaked lesions by indirectly up-regulating a pectate lyase (Schwartz *et al.*, 2017). On the other hand, strengthening the cell wall could be critical for plant resistance to *Xanthomonas*. A perfect example of this strategy is the major resistance gene *Xa4* in rice, which encodes a cell wall-associated kinase and strengthens

the cell wall by promoting cellulose synthesis and suppressing cell wall loosening (Hu *et al.*, 2017). Among different functions, OFPs can be involved in secondary cell wall formation, vascular development or fruit ripening (Wang *et al.*, 2016). Here, *PvOFP7* induction resulted in up-regulation of many genes involved in cell wall modification, including genes involved in the synthesis of major components of the plant cell wall such as celluloses and hemicelluloses, including xyloglucans (O'Neill & York, 2003; Eckardt, 2008; Nakano *et al.*, 2015). In particular, xyloglucan cleavage, uptake and depolymerization appear as important steps for *Xanthomonas* pathogenesis (Vieira *et al.*, 2021). Therefore, reinforcing the cell wall could slow down bacterial progression at the early stage of infection, resulting in reduced CBB symptoms.

Resistance to CBB is known for being complex and accumulation of multiple resistance QTLs is needed to acquire strong resistance to this disease (Chen *et al.*, 2021). This is the case for the resistant cv. BAT93, that cumulated four resistance QTLs to CBB (Nodari *et al.*, 1993) and from which we unveiled *PvOFP7* as a candidate for resistance (Foucher *et al.*, 2020). *PvOFP7* is located in a resistance QTL on chromosome 9, which explains 13% of the phenotypic variation (Nodari *et al.*, 1993). Therefore, *PvOFP7* is only a partial component of common bean defense to CBB, and other genes might contribute to CBB resistance. Significantly, none of the other 13 candidate genes tested in this study were differentially expressed following *PvOFP7* induction, this included *PvAP2-ERF71* and *PvExpansinA17*, whose induction also led to symptom reduction. This would suggest that these genes operate in other pathways independent from *PvOFP7*. However, joint induction of *PvOFP7* and *PvExpansinA17* led to negative regulation of *PvAP2-ERF71*, reflecting complex relationships between these three genes.

Partial resistance was achieved by specifically inducing *PvOFP7* in susceptible genotypes. However, *PvOFP7* transcription levels after dTALEs induction in JaloEEP558 were somewhat extreme compared to what was previously observed in BAT93 inoculated with the 6546R strain (Foucher *et al.*, 2020). Moreover, *PvOFP7*-mediated resistance was dose-dependent. Thus, we believe that the symptom reduction of more than 60% observed here is an overestimation of what may happen during natural infection, where one would expect more subtle changes in *PvOFP7* transcriptional regulation. Indeed, *PvOFP7* promoter region was not 100% identical between JaloEEP558 and BAT93 (pairwise percentage identity of 98.7% over 1,000 bp) (Supplemental figure 11), suggesting that differences in *PvOFP7* regulation may exist that could explain resistance vs susceptibility. In this regard, it would be interesting to

investigate whether genetic and/or epigenetic polymorphism could differentiate resistant from susceptible common bean accessions.

Our study highlighted *PvOFP7* as a major contributor to CBB resistance. This is, to our knowledge, the first functional description of a gene involved in CBB resistance. Remarkably, we pointed out a correlation between *PvOFP7* induction and symptom reduction, which makes sense with resistance to CBB being quantitative, but also shows the remarkable ability of the dTALE approach to unveil phenotypes that would be impossible to detect by knock-out mutagenesis. Although more in-depth validation is needed for *PvAP2-ERF71* and *PvExpansinA17*, these findings provide valuable insights into three genes that may be useful for CBB bean resistance breeding.

ACKNOWLEDGEMENT

We deeply thank Dr Jérôme Verdier (IRHS, France) for his help in RNA-Seq analyses. We thank Pierre Santagostini and Angelina El Ghaziri for the useful discussions about statistics. Bacterial strains were handled at the CIRM-CFBP (CIRM-CFBP, 2021). This study was supported by the French National Research Agency project SUCSEED (ANR-20-PCPA-0009). CG was funded for her PhD by the French Pays de Loire Region, the French National Research Institute for Agriculture and Environment, Plant Health and Environment division (INRAE-SPE) and L'Institut Agro Rennes-Angers.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Charlotte GAUDIN : Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Visualization, Writing - Original Draft. **Anne PREVEAUX** : Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization. **Nathan AUBINEAU** : Investigation. **Damien LE GOFF** : Investigation. **Marie-Agnès JACQUES** : Conceptualization, Supervision, Writing - Review & Editing. **Nicolas W.G. CHEN** : Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing.

DATA AVAILABILITY

Raw RNA-seq data were deposited at the NCBI SRA database under BioProject ID [PRJNA1000747](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1000747). Bacterial strains are available upon request to Nicolas W.G. Chen.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Aparna G, Chatterjee A, Sonti R V., Sankaranarayanan R. 2009.** A cell wall-degrading esterase of *Xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. *Plant Cell* **21**: 1860–1873.
- Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros LMG, Brasileiro ACM, Maxwell DR, Rech EL, Faria JC. 1998.** Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* **4**: 491–499.
- Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE. 2008.** Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell* **20**: 2102–2116.
- Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. 2018.** Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* **93**: 614–636.
- Balint-Kurti P. 2019.** The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1163–1178.
- Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Börnke F. 2009.** The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **22**: 655–664.
- Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, et al. 2019.** Ilastik: Interactive Machine Learning for (Bio)Image Analysis. *Nature Methods* **16**: 1226–1232.
- Bitocchi E, Rau D, Bellucci E, Rodriguez M, Murgia ML, Gioia T, Santo D, Nanni L, Attene G, Papa R. 2017.** Beans (*Phaseolus* spp .) as a Model for Understanding Crop Evolution. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–21.
- Boch J, Bonas U. 2010.** *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 419–436.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaya T, Anja N, Bonas U. 2009.** Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes ÉA, Araújo FJL. 2007.** RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 717–726.
- Briand M, Ruh M, Darrasse A, Jacques M-A, Chen NWG. 2021.** Complete and Circularized Genome Sequences of 17 *Xanthomonas* Strains Responsible for Common Bacterial Blight of

Bean. *Microbiology Resource Announcements* **10**: 17–20.

Carvalho SA, Gazengel K, Bretaudeau A, Robin S, Daval S, Legeai F. 2021. Askor, a R Package for Easy RNA-Seq Data Analysis. : 0–8.

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia N V., Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* **39**: 7879.

Checker VG, Kushwaha HR, Kumari P, Yadav S. 2018. Role of Phytohormones in Plant Defense: Signaling and Cross Talk. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*: 159–184.

Chen NWG, Ruh M, Darrasse A, Foucher J, Briand M, Costa J, Studholme DJ, Jacques MA. 2021. Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology* **22**: 1464–1480.

CIRM-CFBP. 2021. International Centre of Microbial Resource (CIRM) - French Collection for Plant-associated Bacteria. INRAE.

Collado R, Bermúdez-Caraballoso I, García LR, Veitía N, Torres D, Romero C, Martirena-Ramírez A, Angenon G. 2015. Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. *Scientia Horticulturae* **195**: 89–100.

Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N. 2012. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* **335**: 720–723.

Didinger C, Thompson HJ. 2022. The role of pulses in improving human health: A review. *Legume Science* **4**: 1–14.

Ding B, Hu C, Feng X, Cui T, Liu Y, Li L. 2020. Systematic analysis of the OFP genes in six Rosaceae genomes and their roles in stress response in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*). *Physiology and Molecular Biology of Plants* **26**: 2085–2094.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.

Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, Vandyk JK, Bogdanove AJ. 2012. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Research* **40**: 117–122.

Eckardt NA. 2008. Oxylin signaling in plant stress responses. *Plant Cell* **20**: 495–497.

Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F. 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols* **2**: 1819–1824.

Fang X, Chen J, Dai L, Ma H, Zhang H, Yang J, Wang F, Yan C. 2015. Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics* **15**: 1525–1543.

Foucher J, Ruh M, Briand M, Prévieux A, Barbazange F, Boureau T, Jacques M-A, Chen N. 2021. Improving common bacterial blight phenotyping by using rub-inoculation and machine learning: cheaper, better, faster, stronger. *Phytopathology*® **0**: 1–9.

Foucher J, Ruh M, Prévieux A, Carrère S, Pelletier S, Briand M, Serre RF, Jacques MA, Chen NWG. 2020. Common bean resistance to *Xanthomonas* is associated with upregulation

of the salicylic acid pathway and downregulation of photosynthesis (BMC Genomics (2020) 21 (566) DOI: 10.1186/s12864-020-06972-6). *BMC Genomics* **21**: 1–18.

Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, Cowling W, Bramley H, Mori TA, Hodgson JM, et al. 2016. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants* **2**: 1–10.

Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J. 2009. Hsp70 and Hsp90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *European Journal of Plant Pathology* **123**: 91–97.

Garofalo CG, Garavaglia BS, Dunger G, Gottig N, Orellano EG, Ottado J. 2009. Expression analysis of small heat shock proteins during compatible and incompatible plant–pathogen interactions. *Advanced Studies in Biology* **1**: 197–205.

Geißler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens SE, Boch J. 2011. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS ONE* **6**: 1–7.

Hnatuszko-konka K, Kowalczyk T, Gerszberg A. 2014. Phaseolus vulgaris — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances* **32**: 1205–1215.

Hnatuszko-konka K, Kowalczyk T, Gerszberg A, Glińska S. 2019. Regeneration of Phaseolus vulgaris from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. : 1–12.

Hu K, Cao J, Zhang J, Xia F, Ke Y, Zhang H, Xie W, Liu H, Cui Y, Cao Y, et al. 2017. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nature Plants* **3**.

Huang Z, Van Houten J, Gonzalez G, Xiao H, van der Knaap E. 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. *Molecular Genetics and Genomics* **288**: 111–129.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

Kavas M, Kurt Kızıldoğan A, Gökdemir G, Baloğlu MC. 2015. Genome-wide investigation and expression analysis of AP2-ERF gene family in salt tolerant common bean. *EXCLI Journal* **14**: 1187–1206.

Kim NH, Hwang BK. 2015. Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant Physiology* **167**: 307–322.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 299–306.

Liu J, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD. 2002. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13302–13306.

Liu D, Sun W, Yuan Y, Zhang N, Hayward A, Liu Y, Wang Y. 2014. Phylogenetic analyses provide the first insights into the evolution of OVATE family proteins in land plants. *Annals of Botany* **113**: 1219–1233.

Ma Q, Wang N, Ma L, Lu J, Wang H, Wang C, Yu S, Wei H. 2020. The Cotton BEL1-Like Transcription Factor GhBLH7-D06 Negatively Regulates the Defense Response against Verticillium dahliae. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 7126.

- Mak AN-S, Bradley P, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2013.** TAL effectors : function, structure, engineering and applications. *46*: 220–231.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009.** A simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* **326**: 1501.
- Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, Ohtani M. 2015.** NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–18.
- Nga-Sze Mak A, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012.** The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target. *Science* **335**: 716–719.
- Ngou BPM, Ding P, Jones JDG. 2022.** Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* **34**: 1447–1478.
- Nodari RO, Tsai SM, Guzman P, Gilbertson RL, Gepts P. 1993.** Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* **134**: 341–350.
- O'Neill MA, York WS. 2003.** *The Composition and Structure of Plant Primary Cell Walls*.
- Park CJ, Seo YS. 2015.** Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathology Journal* **31**: 323–333.
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. 2017.** Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* **14**: 417–419.
- Peng Y, Van Wersch R, Zhang Y. 2018.** Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 403–409.
- Perez-Quintero AL, Szurek B. 2019.** A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 459–481.
- Pflieger S, Blanchet S, Meziadi C, Richard MMS, Thareau V, Mary F, Mazoyer C, Geffroy V. 2014.** The ‘one-step’ Bean pod mottle virus (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* **14**: 1–16.
- Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. 2015.** Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**: 948–964.
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.
- Ramaroson ML, Koutouan C, Helesbeux JJ, Le Clerc V, Hamama L, Geoffriau E, Briard M. 2022.** Role of Phenylpropanoids and Flavonoids in Plant Resistance to Pests and Diseases. *Molecules* **27**.
- Richard MMS, Gratias A, Thareau V, Kim K Do, Balzergue S, Joets J, Jackson SA, Geffroy V. 2017.** Genomic and epigenomic immunity in common bean: The unusual features of NB-LRR gene family. *DNA Research* **25**: 161–172.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009.** edgeR: A Bioconductor package for

differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.

Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Song Q, Chavarro C, et al. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* **46**: 707–713.

Schwartz AR, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2017. TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: E897–E903.

Singh SP, Miklas PN. 2015. Breeding common bean for resistance to common blight: A review. *Crop Science* **55**: 971–984.

Singh SP, Schwartz HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. *Crop Science* **50**: 2199–2223.

Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **200**: 808–819.

Sun W, Montagu M Van, Verbruggen N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **1577**: 1–9.

Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M. 2004. MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* **37**: 914–939.

Toili MEM. 2022. Insights into the molecular mechanism of the hard-to-cook defect towards genetic improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) through crispr-cas9 gene editing optimization.

Tsaballa A, Pasentsis K, Darzentas N, Tsiftaris AS. 2011. Multiple evidence for the role of an Ovate-like gene in determining fruit shape in pepper. *BMC Plant Biology* **11**: 46.

Tsuda K, Katagiri F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 459–465.

Uebersax MA, Cichy KA, Gomez FE, Porch TG, Heitholt J, Osorno JM, Kamfwa K, Snapp SS, Bales S. 2022. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security—A review. *Legume Science*: 1–13.

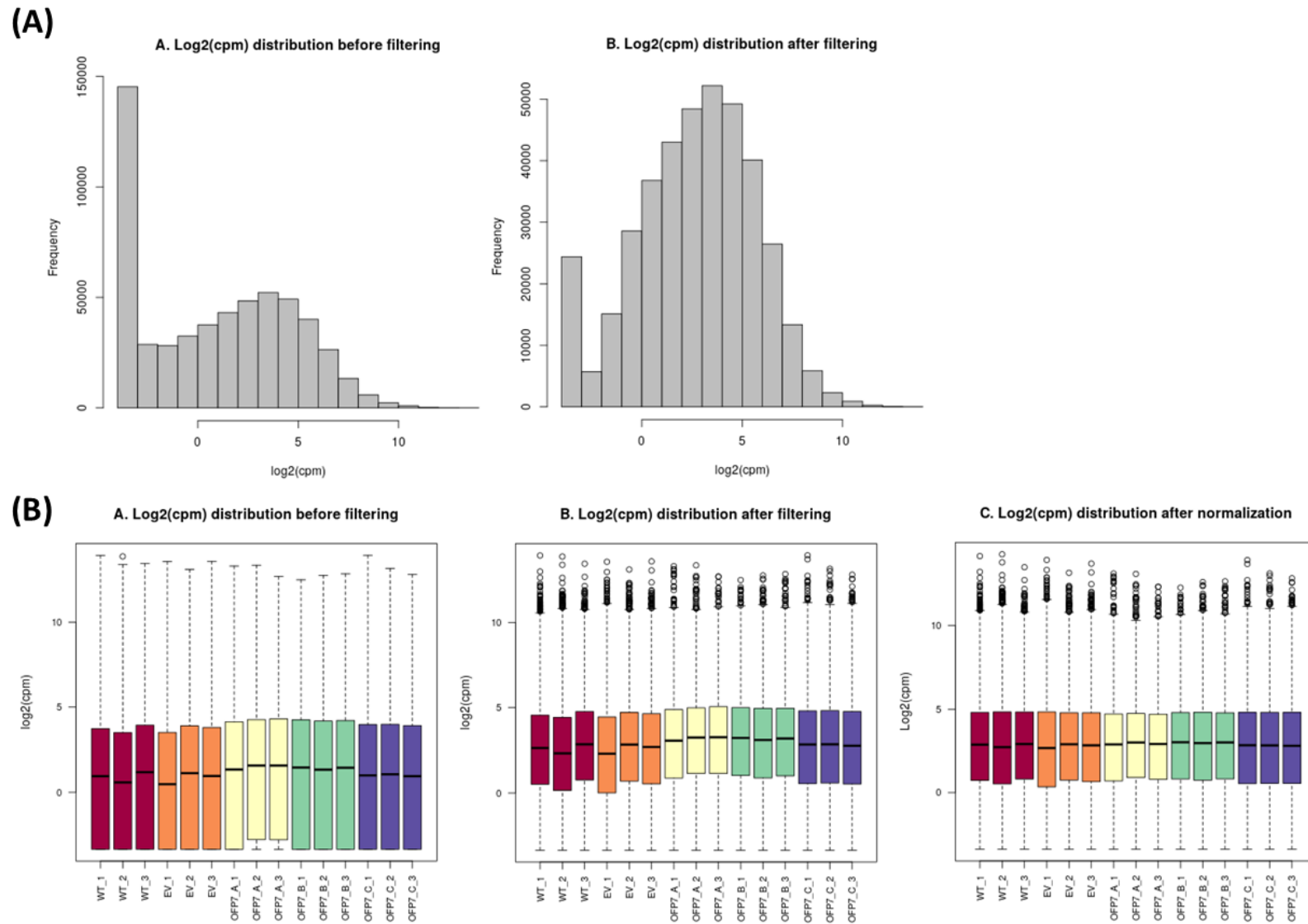
Ul Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai WX, Zhang HX, Wei AM, Gong ZH. 2019. Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 1–31.

Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, et al. 2005. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology* **138**: 1195–1204.

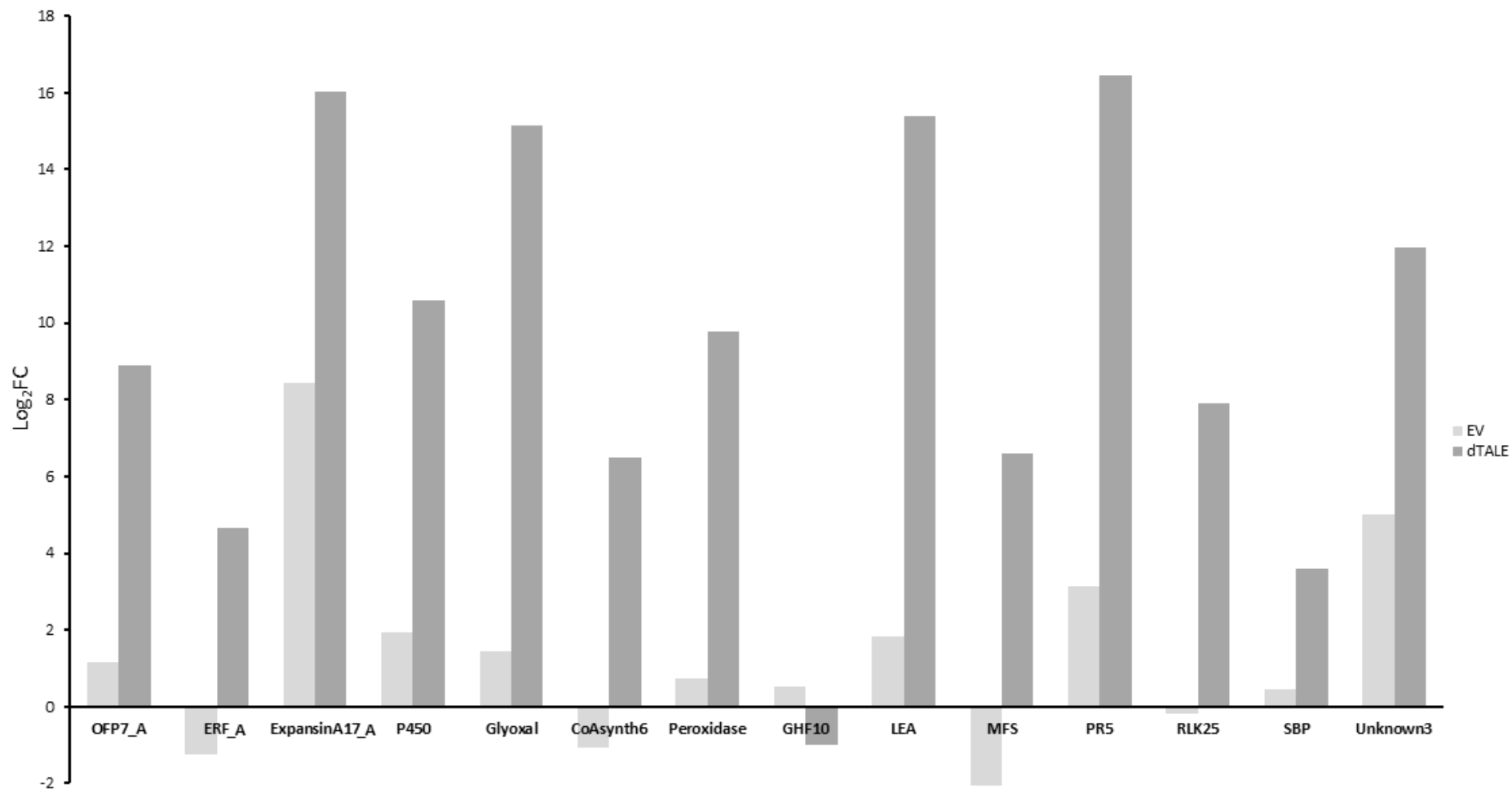
Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*.

Veltcheva M, Svetleva D, Petkova S, Perl A. 2005. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. **107**: 2–10.

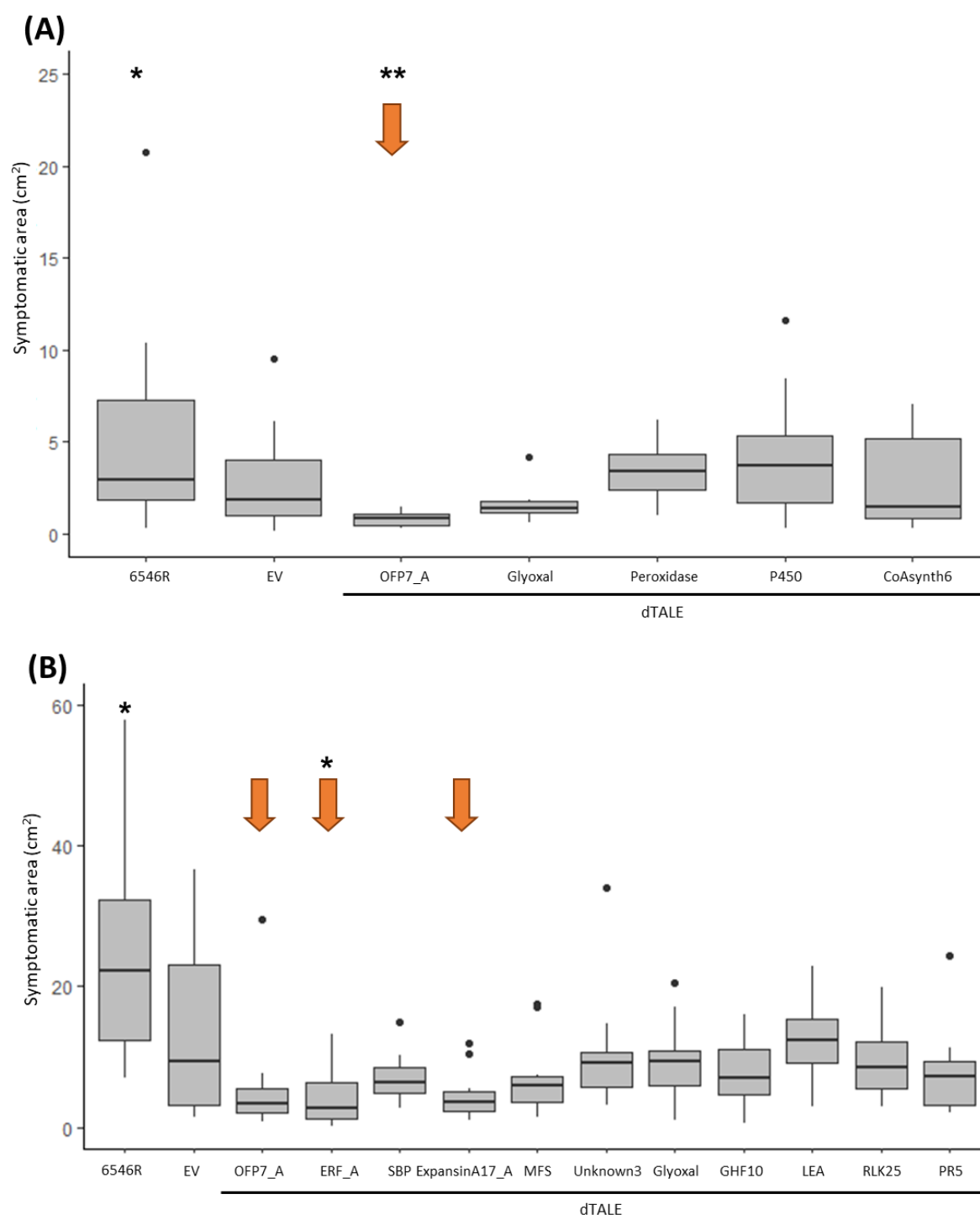
- Vieira PS, Bonfim IM, Araujo EA, Melo RR, Lima AR, Fessel MR, Paixão DAA, Persinoti GF, Rocco SA, Lima TB, et al. 2021.** Xyloglucan processing machinery in *Xanthomonas* pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors. *Nature Communications* **12**: 1–15.
- Voß L, Heinemann KJ, Herde M, Medina-Escobar N, Witte CP. 2022.** Enzymes and cellular interplay required for flux of fixed nitrogen to ureides in bean nodules. *Nature Communications* **13**: 1–13.
- Wang S, Chang Y, Ellis B. 2016.** Overview of OVATE FAMILY PROTEINS, a novel class of plant-specific growth regulators. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–8.
- Wang S, Chang Y, Guo J, Zeng Q, Ellis BE, Chen JG. 2011.** Arabidopsis Ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. *PLoS ONE* **6**.
- Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, Garnett T, Tilman D, DeClerck F, Wood A, et al. 2019.** Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet* **393**: 447–492.
- Yang W, Ju Y, Zuo L, Shang L, Li X, Li X, Feng S, Ding X, Chu Z. 2020.** OsHsfB4d Binds the Promoter and Regulates the Expression of OsHsp18.0-CI to Resistant Against *Xanthomonas Oryzae*. *Rice* **13**.
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin XF. 2021.** PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102030.
- Yuan X, Wang H, Cai J, Li D, Song F. 2019.** NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathology Research* **1**: 1–13.
- Zhang C, Whitham SA, Hill JH. 2013.** Virus-induced gene silencing in soybean and common bean. *Methods in Molecular Biology* **975**: 149–156.
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin GB, Giovannoni JJ, et al. 2016.** iTAK: A Program for Genome-wide Prediction and Classification of Plant Transcription Factors, Transcriptional Regulators, and Protein Kinases. *Molecular Plant* **9**: 1667–1670.
- Zhong R, Teng Q, Haghighat M, Yuan Y, Furey ST, Dasher RL, Ye ZH. 2017.** Cytosol-localized UDP-xylose synthases provide the major source of UDP-xylose for the biosynthesis of Xylan and xyloglucan. *Plant and Cell Physiology* **58**: 156–174.



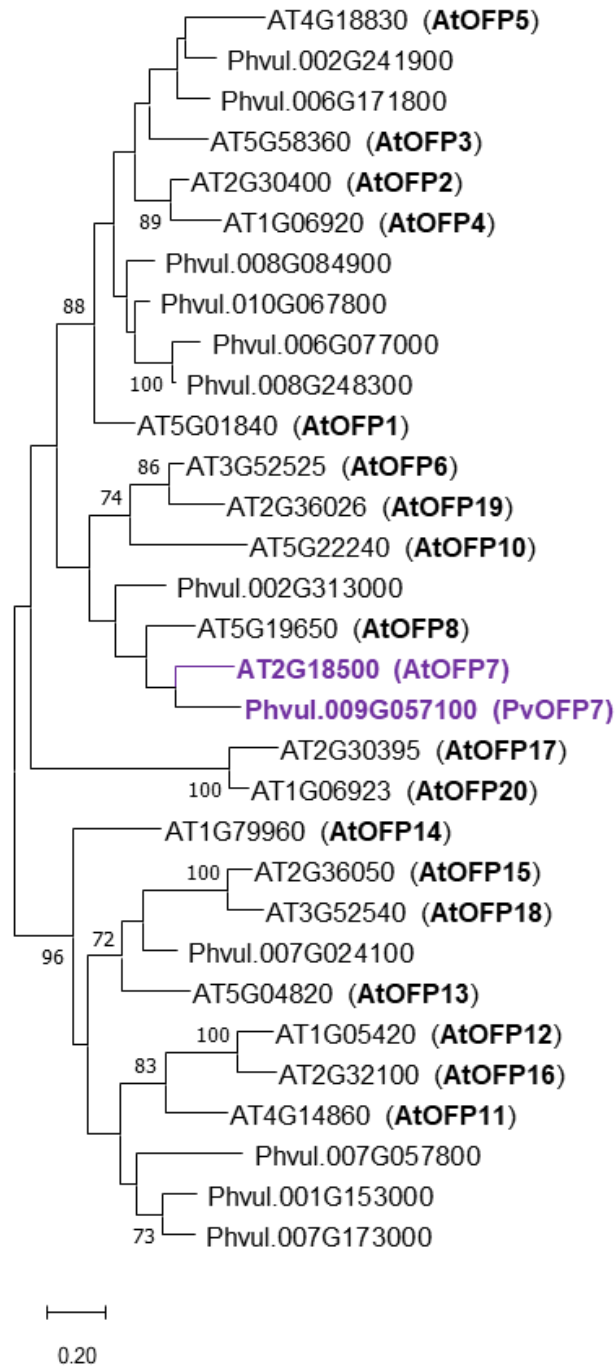
Supplemental figure 1. Statistics showing the effect of filtering and normalization for RNA-Seq data. A) Frequency distribution of Log₂(CPM) before (left) and after (right) filtering. B) Log₂(CPM) values before (left), after (middle) filtering and after normalization (right).



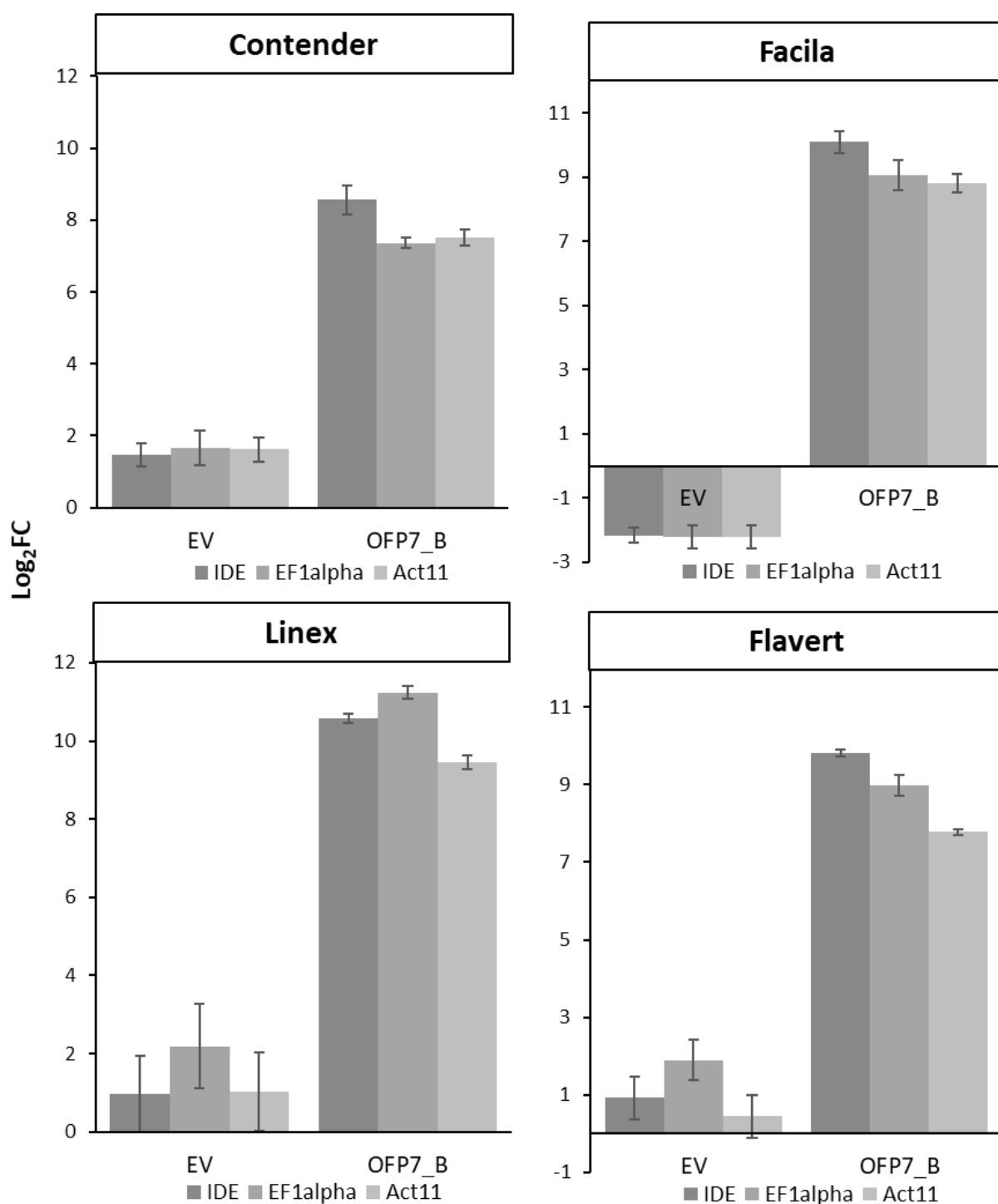
Supplemental figure 2. *In planta* induction of 14 candidate genes using dTALEs. Trifoliolate leaves were vacuum-infiltrated at 1×10^8 cfu.ml⁻¹ and harvested 48 hours post-inoculation to run qRT-PCRs. Log₂(FC) was calculated using the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method on the plants inoculated by the EV strain as controls and the IDE gene as internal control. Means were calculated on data from three individuals per treatment. Equivalences between dTALE names and gene IDs are found in Supplemental table 1.



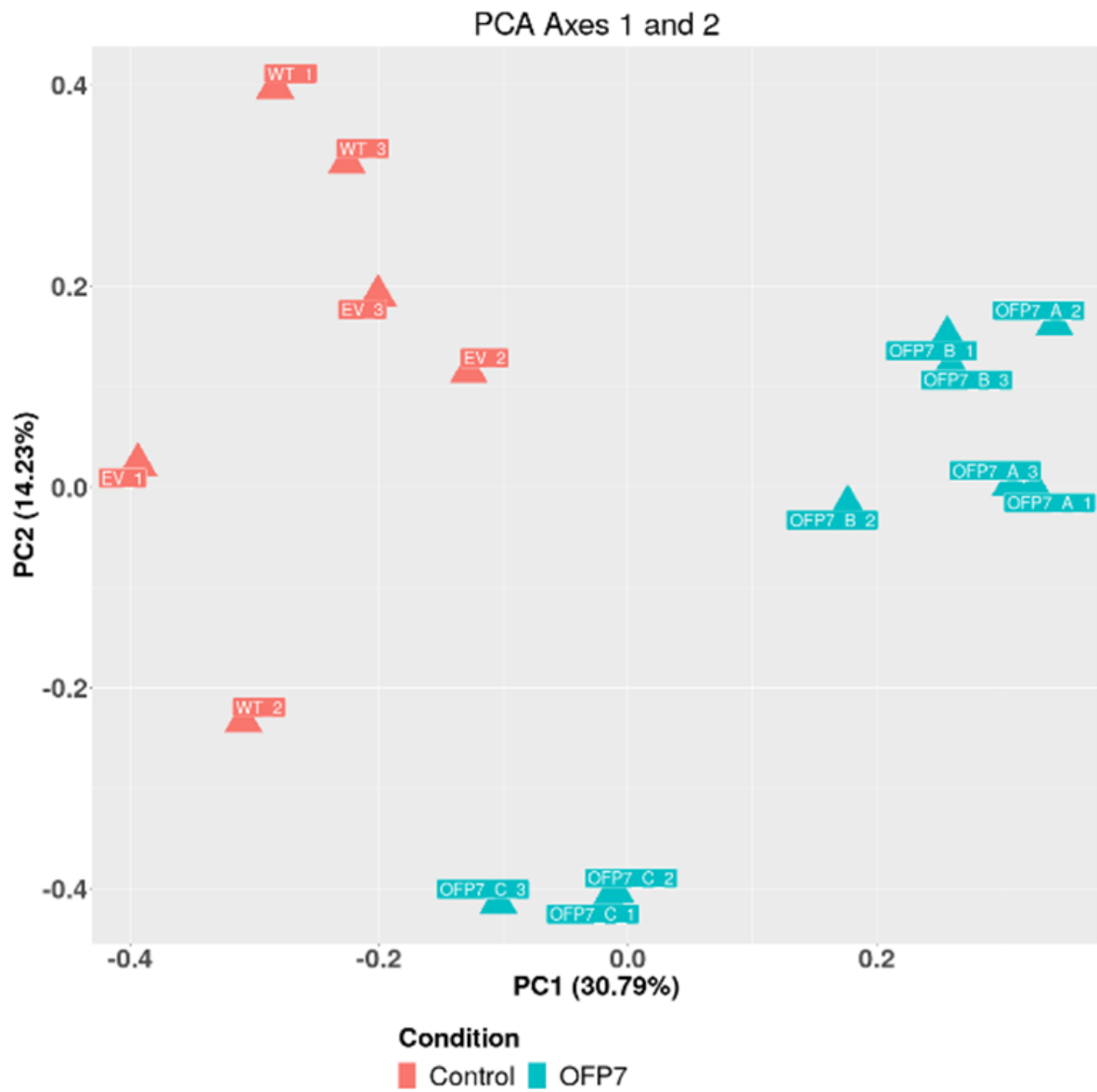
Supplemental figure 3. Screening of 14 candidate genes for CBB symptom reduction. First leaves of JaloEEP558 were rub-inoculated with bacterial suspensions calibrated at 1×10^8 cfu.ml⁻¹. A and B correspond to two independent experiments. Average symptomatic areas were assessed at 9 (A) and 10 dpi (B). Ten plants were used per treatment. Kruskal Wallis test indicated significant effect ($P < 0.05$) of treatments. The number of stars refers to significantly different values compared to the EV after Dunn's test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). Arrows show the three most interesting candidate genes used in Figure 1. Equivalences between dTALEs name and genes ID are found in Supplemental table 1.



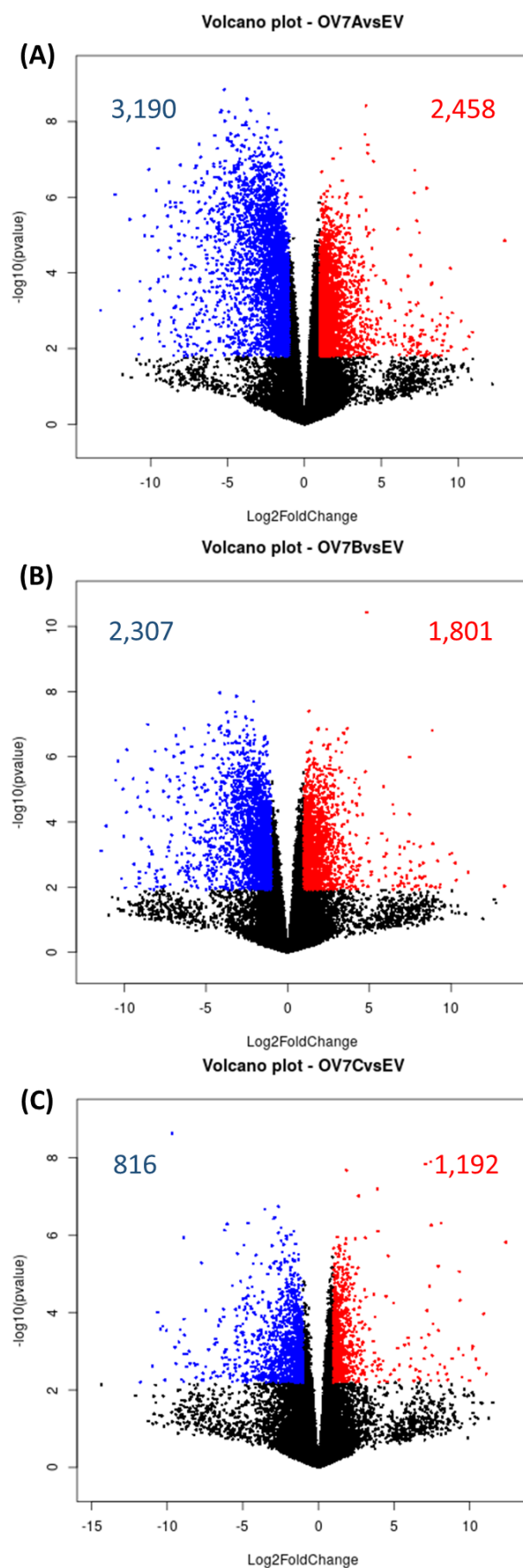
Supplemental figure 4. Phylogeny of OFPs from *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. *PvOFP7* and *AtOFP7* are shown in purple. This maximum Likelihood tree was done using amino acid sequences of OVATE domains of all *A. thaliana* and *P. vulgaris* genes. Number at nodes represent bootstrap values for 100 iterations, with a threshold of 70, and the horizontal scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.



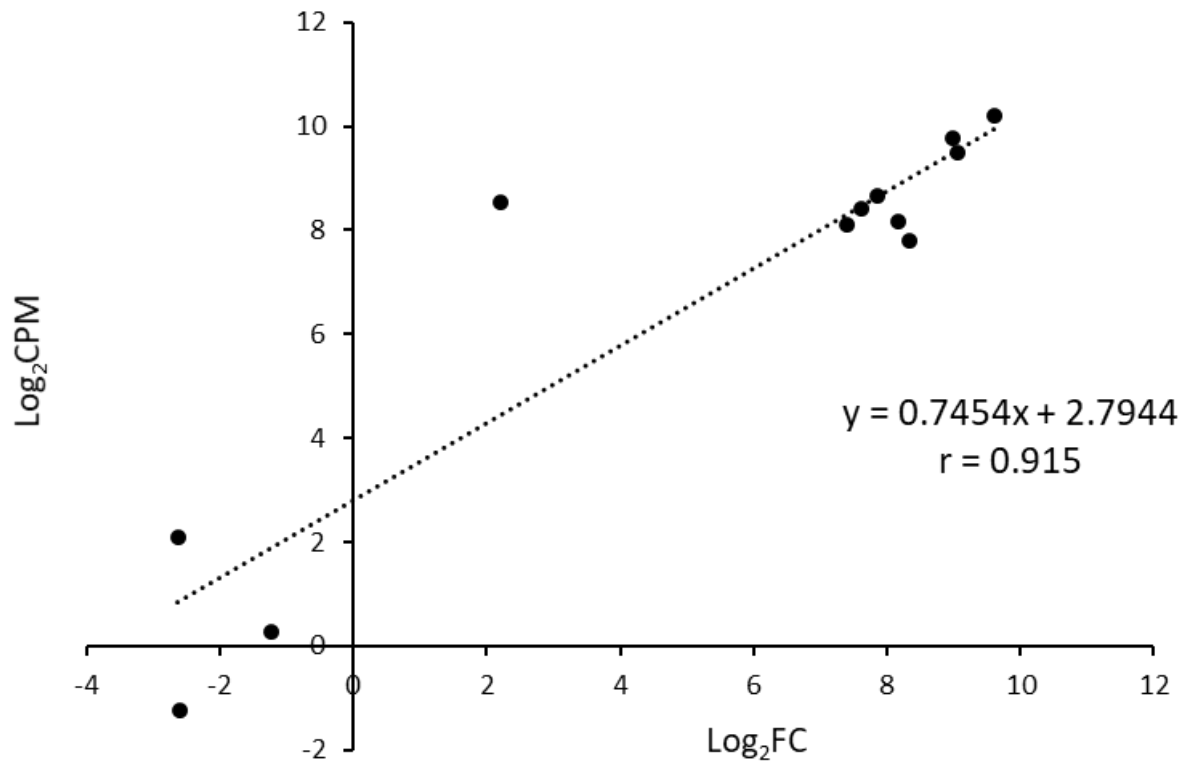
Supplemental figure 5. *PvOFP7* expression levels measured by qRT-PCR at 2 dpi in four additional common bean accessions. Trifoliolate leaves were vacuum-infiltrated at 1×10^8 cfu.ml⁻¹. Log₂(FC) were calculated using the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method control. These results come from two independent experiments, each comprising three samples per treatment (n=6).



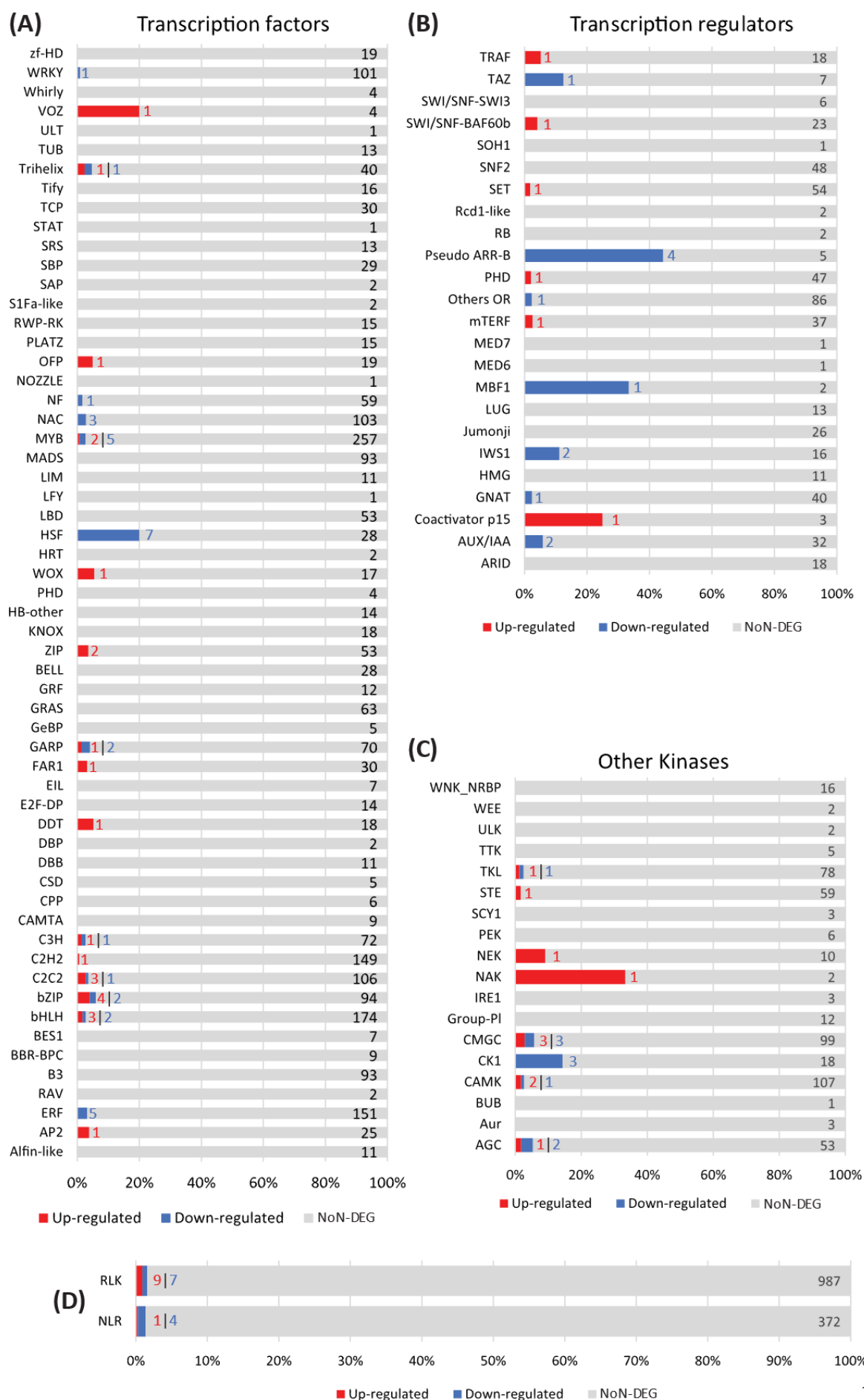
Supplemental figure 6. Principal Component Analysis (PCA) plot showing the variance of mapped reads between common bean leaves inoculated with the control strains and the strains carrying dTALEs. This analysis was made with Askor with the first two principal axes explaining 30.79% and 14.23% of the variance. Orange triangles represent the controls inoculated with strains 6546R or EV. Blue triangles represent the conditions corresponding to strains expressing dTALEs OFP7_A, OFP7_B and OFP7_C, targeting different regions of the *PvOFP7* promoter.



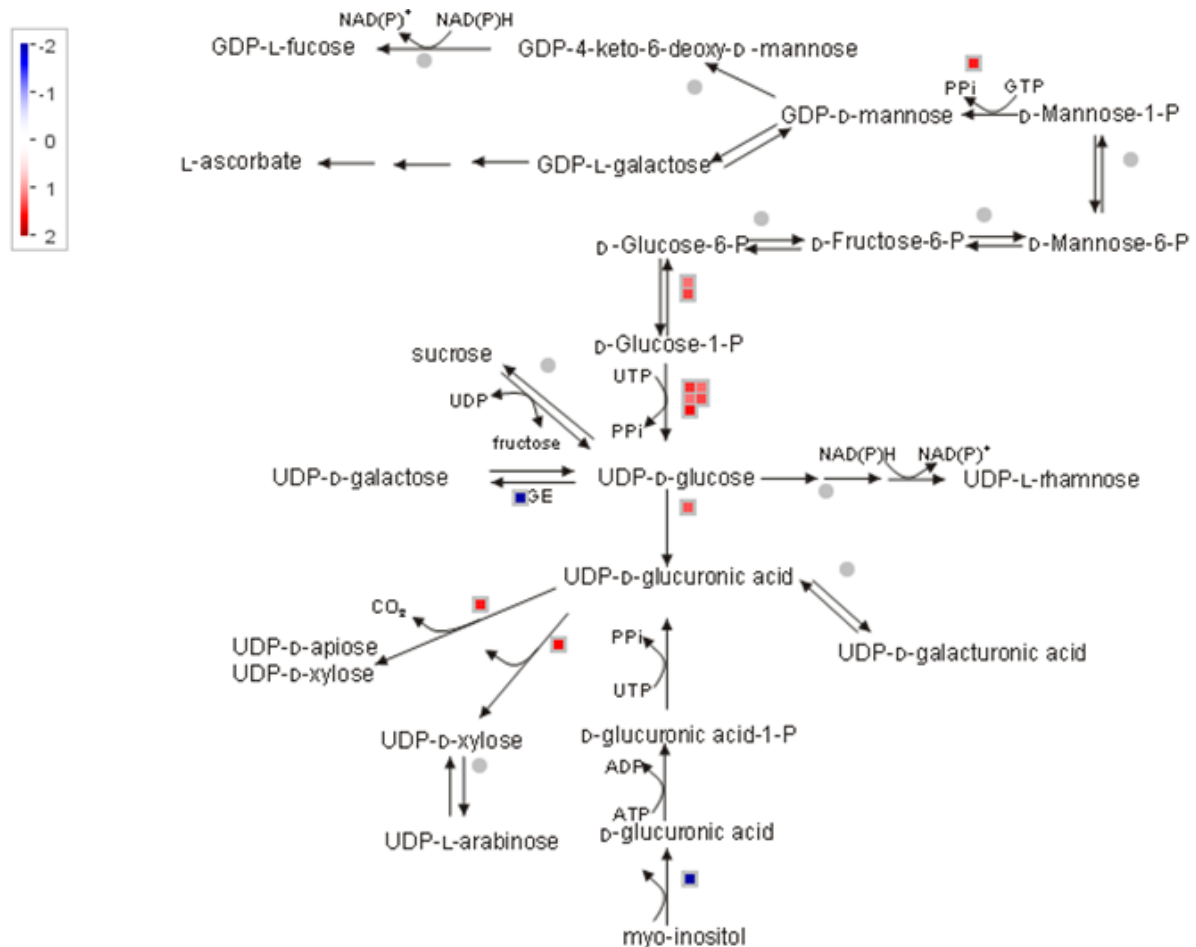
Supplemental figure 7. Global impact of *PvOFP7* induction on the common bean transcriptome. Volcano plots represent the distribution of DEGs in common bean plants inoculated with strains carrying dTALEs OFP7_A (A), OFP7_B (B) or OFP7_C (C) using the EV strain as control. Blue dots indicate down-regulated genes while red dots correspond to up-regulated genes.



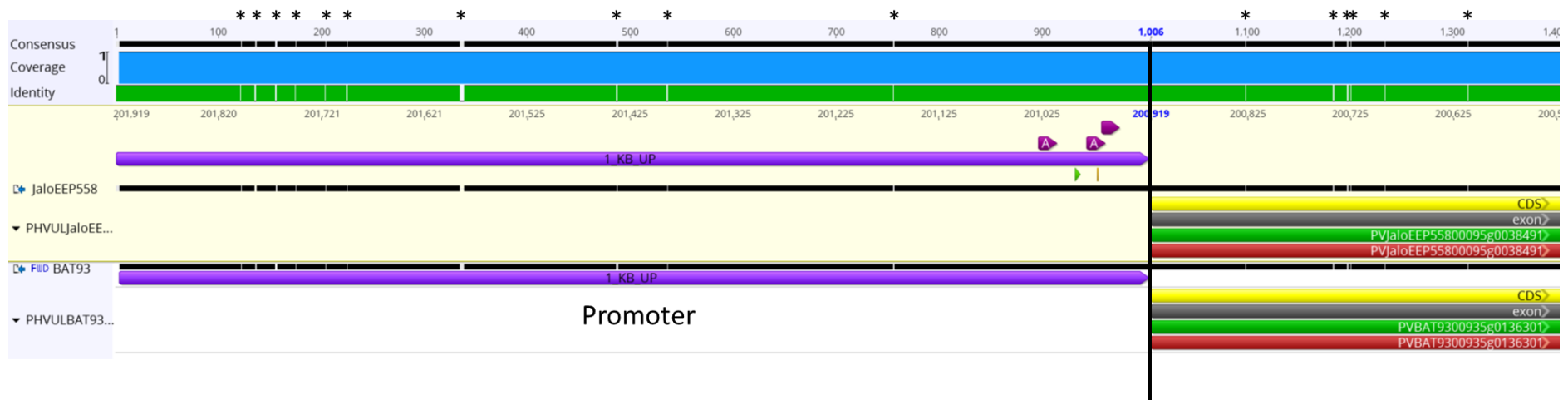
Supplemental figure 8. Linear regression between qRT-PCR and RNA-Seq results for in planta *PvOFP7* expression levels. Each dot corresponds to one sample for which *PvOFP7* expression levels were measured using both qRT-PCR and RNA-Seq, in common bean plants cv. JaloEEP558 inoculated with EV and dTALEs-complemented strains. Correlation coefficient of +0.91 was significant ($P < 0.001$) for $n = 12$ observations. The control gene used for qRT-PCR internal control was EF1- α . Similar correlation coefficients were obtained with IDE, Act11 as control genes (data not shown).



Supplemental figure 9. Proportions of differentially expressed genes coding transcription factors (A), transcription regulators (B), other kinases (C), RLK and NLR (D). Up-regulated genes are indicated in red and down-regulated genes in blue. Genes that are either not represented in our data or with an FDR > 0.05 are represented in grey. The number of genes in each category is indicated on the bar chart.



Supplemental figure 10. MapMan representations of DEGs within pathways related to cell wall precursors (A), the proteasome (B), glycolysis (C) or secondary metabolites (D). The colour gradient indicates Log₂(FC) level of expression.



Supplemental figure 11. Comparison of *PvOFP7* promoter regions of BAT93 and JaloEEP558 visualized using Geneious. Asterisks indicate polymorphic sites.

Supplemental table 1. Description of dTALEs used in this study. All dTALEs contain 18.5 repeats, thus targeting 19 nucleotides (RVD at position 0 targets a thymine).

dTALE name	G19833 ID	Distance to ATG	RVD sequence	Target sequence	Annotation
OFP7_A OFP7_B OFP7_C	Phvul.009G057100	-90 bp -43 bp -29 bp	NN HD HD NN NN HD HD NI NG NG HD NG NG NI NG NG HD NG HD NG NG NI NI HD HD HD NG NI NI NI NN NG NN NG NG NG NN NG NG NG NI NI NG NI HD NN NG NN HD HD NI NG HD NG	T GCCGGCCATTCTTATTCT T CTTAACCCCTAAAGTGTTT T GTTTAATACGTGCCATCT	ovate_family_protein_7
ExpansinA17_A	Phvul.007G207600	-28 bp	HD NN NG NI NI NN NI NN NG NG NG NN NG HD NI NG HD NG	T CGTAAGAGTTTGTTCATCT	expansin_A17
Glyoxal	Phvul.009G171700	-83 bp	NN HD NI HD HD NI NG NG NG HD NI NI NN NG NN HD NI NG	T GCACCATTTCAGTGCAT	glyoxal_oxidase-related_protein
LEA	Phvul.007G225200	-113 bp	HD NG HD NI NG NG HD HD NN NG NG HD NI HD NG HD NI NG	T CTCATTCCGTTCACTCAT	late_embryogenesis_abundant_protein,_putative_ /_LEA_protein,_putative
P450	Phvul.011G016700	-179 bp	NI NN NG NN NG NN NI NI HD NI NI NI NI HD NG HD NG NG	T AGTGTGAACAAAACCTCTT	cytochrome_P450,_family_87,_subfamily_A,_polyp eptide_6
Peroxidase	Phvul.011G105900	-104 bp	NN HD HD HD NI NI HD NI NI NI HD NG NI NI NG NG NI NG	T GCCCAACAACTAATTAT	Peroxidase_superfamily_protein
PR5	Phvul.006G197400	-20 bp	NI NG NG HD NI NG HD NI NI NG NI HD HD NG HD HD HD NG	T ATTCATCAATACCTCCCT	CAP_(Cysteine- rich_secretory_proteins,_Antigen_5,_and_Pathoge nesis-related_1_protein)_superfamily_protein
RLK25	Phvul.011G194600	-19 bp	NN HD NI NI NI NG NG NN NI HD NG NG NN NG NI NI NG	T GCAAATTGACTTGTAAT	cysteine-rich_RLK_(RECEPTOR- like_protein_kinase)_25
CoAsynth6	Phvul.003G031300	-160 bp	NI NG NN HD NI NG NG NG HD NG NI NN HD HD NI HD NI NG	T ATGCATTCTAGCCACAT	3-ketoacyl-CoA_synthase_6
SBP	Phvul.009G119200	-13 bp	HD NG HD NG NG HD NG HD NG HD NI HD NI NI HD NG NI NG	T CTCTTCTCTCACAACATAT	SBP_(S- ribonuclease_binding_protein)_family_protein
GHF10	Phvul.009G120500	-308 bp	NN HD NG NG HD NI NN NI NI NI NI HD NI HD NI NG NG NG	T GCTTCAGAAAACACATTT	Glycosyl_hydrolase_family_10_protein
MFS	Phvul.008G188500	-78 bp	HD HD HD NG NN NI HD NI NN NI NG NI NG HD HD NI NG NG	T CCCTGACAGATATCCATT	Major_facilitator_superfamily_protein
ERF_A	Phvul.004G157600	-153 bp	NN NN HD NG NG HD NG NI NG NG HD NG HD NI NI NI NI NG	T GGCTTCTATTCTCAAAAT	AP2/ERF domain
Unknown3	Phvul.006G118800	-136 bp	HD NN NI NI NG NG HD NG HD HD NI HD HD NG NG NG NI NG	T CGAATTCTCCACCTTTAT	Unknown function

Supplemental table 2. RNAseq data after mapping and differential expression analysis.³

Supplemental table 3. Enriched functional categories upon *PvOFP7* induction, according to MapMan Wilcoxon test. **(A)** Analysis was done using the 952 DEGs common to the three strains carrying dTALEs targeting *PvOFP7*. Wilcoxon p-values were adjusted using Benjamini Hochberg correction. Bin categories were considered significant with a threshold of $p < 0.06$. Genes belonging to enriched categories corresponding to stress **(B)**, cell wall **(C)** and signalling **(D)** are listed in separate sheets.³

Supplemental table 4. Lists of DEGs coding NLR, RLK, Transcription factors, Transcription regulators, and other kinases.

3

³ Ce tableau inclus plusieurs milliers de gènes et n'a donc pas été inclus. Les données seront disponibles une fois l'article publié.

Supplemental table 5. Genes with similar transcriptional behaviour than in the study by Foucher *et al.* 2017. This list comprises genes with similar transcriptional regulation (up or down) after *PvOFP7* induction in JaloEEP558 (this study) and after inoculation of the resistant genotype BAT93 (Foucher *et al.*, 2017).

Gene ID	Function according to <i>Arabidopsis thaliana</i>	This study	Foucher <i>et al.</i> , 2020	
		JaloEEP558 + <i>PvOFP7</i> induction	BAT93 (Resistant)	JaloEEP558 (Susceptible)
Phvul.001G039700	17.6 kDa class II heat shock protein	down	down	non-DEG
Phvul.001G039800	17.6 kDa class II heat shock protein	down	down	up
Phvul.001G258200	heat shock protein 21	down	down	up
Phvul.002G121200	ATP-binding cassette 14	down	down	up
Phvul.002G231500	HSP20-like chaperones superfamily protein	down	down	up
Phvul.003G154800	heat shock protein 70B	down	down	up
Phvul.004G107700	heat shock protein 90.1	down	down	up
Phvul.007G111300	Protein of unknown function (DUF668)	down	down	up
Phvul.008G016500	BCL-2-associated athanogene 5	down	down	up
Phvul.008G115800	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	down	down	up
Phvul.008G228000	HSP20-like chaperones superfamily protein	down	down	up
Phvul.009G080200	17.6 kDa class II heat shock protein	down	down	up
Phvul.009G121000	nitrate reductase 1	down	down	up
Phvul.011G016100	mitochondrion-localized small heat shock protein 23.6	down	down	up
Phvul.011G065300	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	down	down	up
Phvul.011G155700	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	down	down	up
Phvul.009G057100	ovate family protein 7	up	up	down
Phvul.001G207400	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	up	up	non-DEG
Phvul.001G239900	cellulase 2	up	up	non-DEG
Phvul.002G273700	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	up	up	non-DEG
Phvul.003G078200	unknown	up	up	non-DEG
Phvul.004G051600	Cobalamin-independent synthase family protein	up	up	non-DEG
Phvul.004G077100	Dynein light chain type 1 family protein	up	up	non-DEG
Phvul.006G141100	Ribosome associated membrane protein RAMP4	up	up	non-DEG
Phvul.007G096900	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	up	up	non-DEG
Phvul.008G123000	Pectin lyase-like superfamily protein	up	up	non-DEG
Phvul.008G133600	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	up	up	non-DEG
Phvul.008G157600	GATA transcription factor 9	up	up	non-DEG
Phvul.008G255300	O-fucosyltransferase family protein	up	up	non-DEG
Phvul.008G258700	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	up	up	non-DEG
Phvul.010G095800	K ⁺ efflux antiporter 2	up	up	non-DEG
Phvul.010G122000	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	up	up	non-DEG
Phvul.011G038200	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	up	up	non-DEG
Phvul.011G042800	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	up	up	non-DEG

III. Résultats complémentaires

1. Matériels & Méthodes

Préparation des traitements et du matériel végétal :

Les différentes conditions utilisées dans ces essais comprennent des feuilles non traitées, des feuilles inoculées à l'eau et des feuilles inoculées avec des souches bactériennes. Les souches bactériennes utilisées dans ces différents inocula correspondent à la souche CFBP6546R de *Xpp* (Briand *et al.*, 2021) de type sauvage et complémentée par des dTALE. Leurs conditions de croissance ainsi que le protocole d'obtention des souches complémentées se trouvent dans le matériels et méthodes du chapitre 2.2.

Pour l'ensemble des essais, des disques foliaires ont été prélevés, sur feuilles de haricot du génotype JaloEEP558 sélectionnées aléatoirement 48 heures après infiltration sous vide d'un inoculum concentré à 1×10^8 cfu.ml⁻¹, de la même manière que pour les analyses décrites dans le paragraphe précédent (Gaudin *et al.*, soumis).

Evaluation des dépôts de callose :

Neuf échantillons de feuilles de haricot ont été inoculées par traitement. Pour chaque échantillon, un disque de 6 mm de diamètre a été prélevé puis immergé dans des bains successifs d'alcool à 70° à 4°C jusqu'à décoloration, puis coloré au bleu d'aniline à 0,05% pendant 10 min. Les lames ont été observées au grossissement 100X sous microscope optique (Axio Imager Z2, Zeiss, Allemagne) sur dix épaisseurs différentes, avec 32.26% d'intensité de source lumineuse en DAPI (Filtres : 335-383, 420-470). Les images ont ensuite été analysées avec les logiciels Ilastik (Berg *et al.*, 2019) et ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) afin de quantifier le nombre de pixels identifiés comme étant de la callose. Quatre à six champs différents ont été observés au microscope sur chaque disque. Au total 36 à 54 images ont donc été observées par traitement.

Dosages d'hormones :

Les niveaux d'auxine (IAA), d'acide abscissique (ABA), d'acide salicylique (SA) et d'acide jasmonique (JA) endogènes ont été évalués après induction de *PvOFP7*. Les disques foliaires prélevés ont été figés dans de l'azote liquide puis lyophilisés et broyés. La concentration des hormones par gramme de poids sec (ng/gDW) a été quantifiée à l'IJPB de Versailles (Sylvie Citerne, Grégory Mouille). Deux expériences indépendantes (M8 et M23) comprenant chacune de un à trois échantillons (M8) et quatre échantillons (M23) ont été

réalisées. Ces échantillons correspondent à 4 mg de masse sèche (+/- 0,04) de disques prélevés sur trois feuilles de plantes différentes.

Dosages biochimiques de la paroi végétale :

La composition en oses des polysaccharides de la paroi cellulaire du haricot a été mesurée après induction de *PvOFP7*. Les disques foliaires prélevés et instantanément plongés dans de l'azote liquide, ont été lyophilisés et broyés en poudre fine à l'aide d'un broyeur à billes pendant 2x30s à 30Hz. Une extraction éthanolique a été réalisée sur la plateforme BIBS (INRAE, Nantes) afin d'évaluer la composition en oses constitutifs des polysaccharides totaux. Une pré-hydrolyse (H_2SO_4 72% 30 min 30°C) suivie d'une hydrolyse (H_2SO_4 2N 2h 100°C) ont ensuite été réalisées afin de rompre les liaisons glycosidiques. Les oses neutres (rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose et glucose) ont ainsi été dosées par chromatographie en phase gazeuse (CpG, TRACE GC ULTRA, Thermo) après dérivation acétate d'alditols (Englyst & Cummings, 1988). Les oses acides (acides uroniques = AU) ont été analysées avec la méthode colorimétrique au MétaHydroxyDiPhényl (MHDP) (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). Les pourcentages en oses ont été mesurés sur 5 mg pour chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage de masse sèche (DWi) obtenus en multipliant les valeurs mesurées par le rendement de l'extraction. Pour chaque traitement, un nombre total de 3 échantillons a été analysé.

Microscopie électronique à balayage :

L'impact de l'induction de *PvOFP7* sur l'intégrité physique des tissus foliaires de haricot a été réalisée en observant les disques foliaires au microscope électronique à balayage Quattro S (Thermo-Fisher, Etats-Unis) à la plateforme BIBS (Nantes).

Time Domain Résonance Magnétique Nucléaire :

L'impact de l'induction de *PvOFP7* sur la distribution de la mobilité et la teneur en eau dans les feuilles de haricot commun a été évalué à la plateforme BIBS (Nantes). Pour cela, le T_{2i} a été mesuré en ms par Time Domain Résonance Magnétique Nucléaire (TD- RMN) sur un spectromètre 20 MHz (0,47T) (Minispec mq20, Bruker Biospin) équipé d'une sonde ^1H thermostatée à 4,0 +/- 0,1°C en suivant le protocole de Dufour *et al.*, (2023). Brièvement, une séquence d'impulsions Carr-Purcell-Meiboom-Gill a été utilisée et 2500 points de données (échos pairs) ont été acquis par train d'échos, avec un temps d'espacement des impulsions 180° - 180° (2τ) de 86,3 μs pour un temps d'échantillonnage global de la courbe de relaxation T_2 de 100 ms. Le signal a été moyenné sur 128 scans pour une durée totale d'acquisition d'environ 20

min. Le pourcentage de teneur en eau dans les feuilles inoculées a ensuite été estimé en mesurant leurs poids frais et secs.

$$\% \text{ de teneur en eau} = \frac{[Poids\ frais\ (g) - Poids\ sec\ (g)] * 100}{Poids\ frais - Tare}$$

Le P_{2i} a ainsi pu être calculé, ce qui correspond à la proportion relative d'eau des échantillons (en %w/w), indépendamment de la variabilité de composition de la feuille. Un nombre total de 3 échantillons a été analysé. Un échantillon correspond à 9 disques prélevés sur trois feuilles.

Pouvoir pathogène sur gousses :

L'évaluation du pouvoir pathogène des souches bactériennes a été réalisé en déposant 3µL d'inoculum (5×10^7 cfu.ml⁻¹) sur jeunes gousses et en les piquant à l'aide d'une aiguille de seringue plongée dans l'inoculum. Chaque inoculum a été testé sur chacune des gousses. Les gousses ont été incubées dans un phytotron (28°C 16h de jour et 25°C 8h de nuit) et le diamètre des symptômes a été quantifié 6, 8 et 9 jours après inoculation à l'aide d'ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Un total de 28 à 29 gousses a été analysé par traitement.

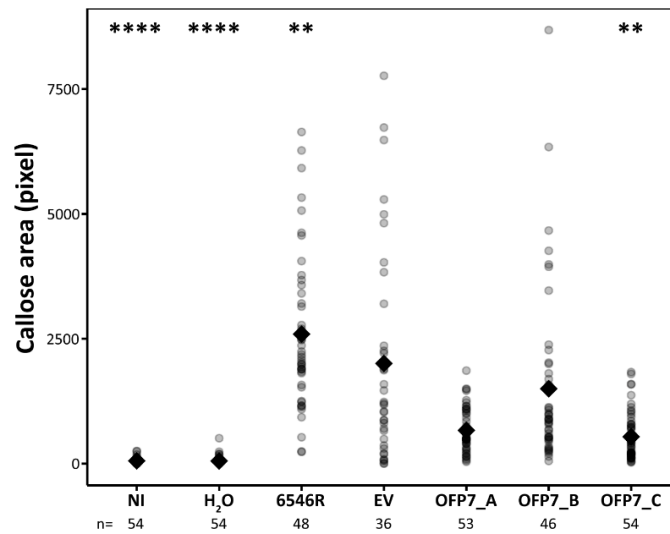


Figure 2. Quantification des dépôts de callose observés sur disques inoculés. Le nombre de pixels identifiés comme de la callose a été évalué par Ilastik et ImageJ sur des images prises à l'Axio Imager Z2 (Zeiss ; 100X ; dix couches z ; 32.26% d'intensité de source lumineuse en DAPI ; Filtres : 335-383, 420-470). Ces résultats représentent les données issues de 9 feuilles pour chacune desquelles 4 à 6 images ont été réalisées (n= 36 à 54 images par traitement). Le test de Kruskal Wallis a indiqué un effet significatif ($p < 0,05$) des traitements. Le nombre d'étoiles renvoie à des valeurs significativement différentes par rapport à la EV après le test de Dunn (**, $P < 0,01$; ****, $P < 0,0001$).

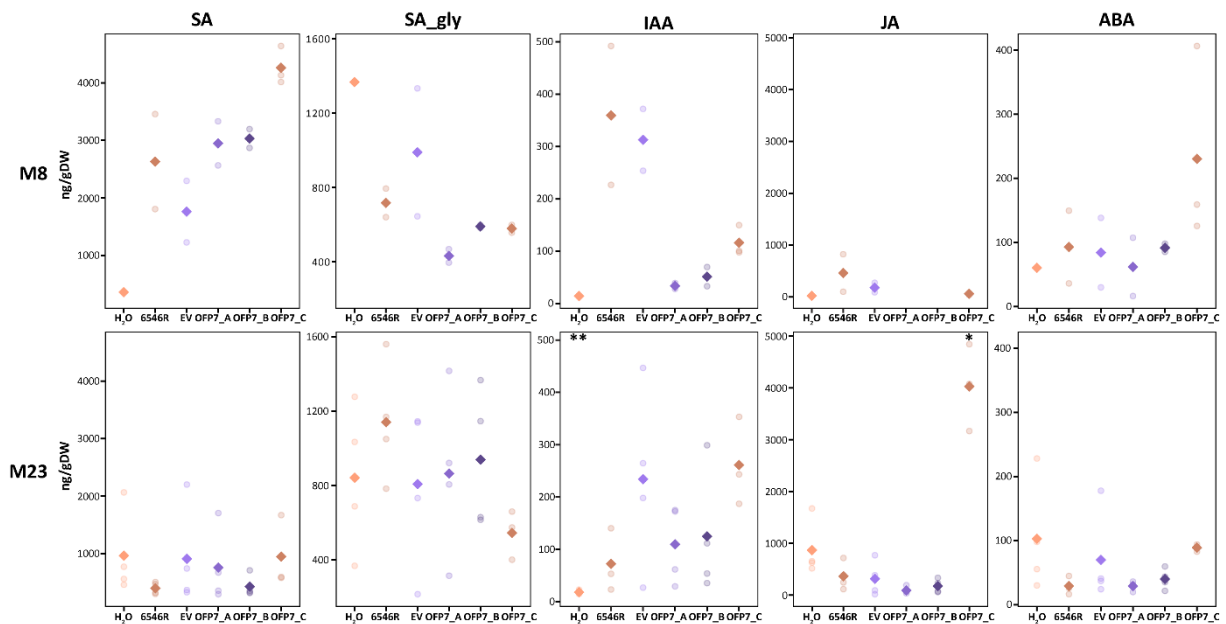


Figure 3. Dosage de l'auxine (IAA), de l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA) endogènes après induction de PvOFP7 par les dTALE. La concentration d'hormones par gramme de poids sec (ng/gDW) a été quantifiée. Ces résultats représentent deux expériences indépendantes (n = 1 à 3 pour la M8 et n = 4 par traitement pour la M23). Le test de Kruskal Wallis a indiqué un effet significatif ($p < 0,05$) des traitements uniquement pour IAA et JA de la M23. Le nombre d'étoiles renvoie à des valeurs significativement différentes par rapport à la EV après le test de Dunn (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

2. Résultats

L'induction de *PvOFP7* provoque-t-elle l'apparition de callose ?

Les échantillons non inoculés ou inoculés avec de l'eau présentent très peu, voire pas du tout de callose (Figure 2). La souche 6546R provoque significativement plus de callose que le témoin EV chez le haricot commun. La souche portant le dTALE OFP7_C cause significativement moins de dépôt de callose que le témoin EV. Les souches portant les deux autres dTALEs, OFP7_B et OFP7_A suivent cette même tendance, bien que la différence avec EV ne soit pas significativement différente (respectivement d'une p-value de 0,8 et de 0,07). Ces résultats suggèrent que l'induction du gène *PvOFP7* ne stimule pas la production de callose voire la réduirait.

Des hormones sont-elles impliquées dans la résistance médiée par *PvOFP7* ?

Deux essais indépendants ont été réalisés (Figure 3). Dans le premier de ces essais, M8, les trois souches dTALE, OFP7_A, OFP7_B et OFP7_C semblent induire une hausse de la concentration d'acide salicylique ainsi qu'une baisse de l'acide salicylique glycosylé et de l'auxine, bien que cela ne soit pas validé statistiquement. Ces tendances ne sont pas confirmées dans l'essai M23, peut-être en raison de la sensibilité des tests de dosage d'hormones au temps de prélèvement. Il serait intéressant de mettre en place un nouvel essai similaire, en réalisant cette fois une cinétique du suivi des concentrations d'hormones à différents temps après inoculation.

L'intégrité de la forme des cellules végétales est-elle impactée par l'induction de *PvOFP7* ?

Les formes des cellules végétales semblent similaires lorsqu'elles sont non-inoculées (NI), inoculées à l'H₂O ou avec les souches portant les différents dTALE (Figure 4). Les formes des cellules végétales infectées avec la souche EV et la souche 6546R se ressemblent et semblent abimées. Ces résultats suggèrent que lorsque les feuilles de haricot sont inoculées avec la 6546R et EV, ces bactéries dénaturent la structure tissulaire et la forme des cellules végétales. L'induction de *PvOFP7* semble protéger cette intégrité des cellules du haricot. Cependant au vu du faible nombre de répétitions ainsi que de la variabilité observée entre certains échantillons, il est difficile de conclure.

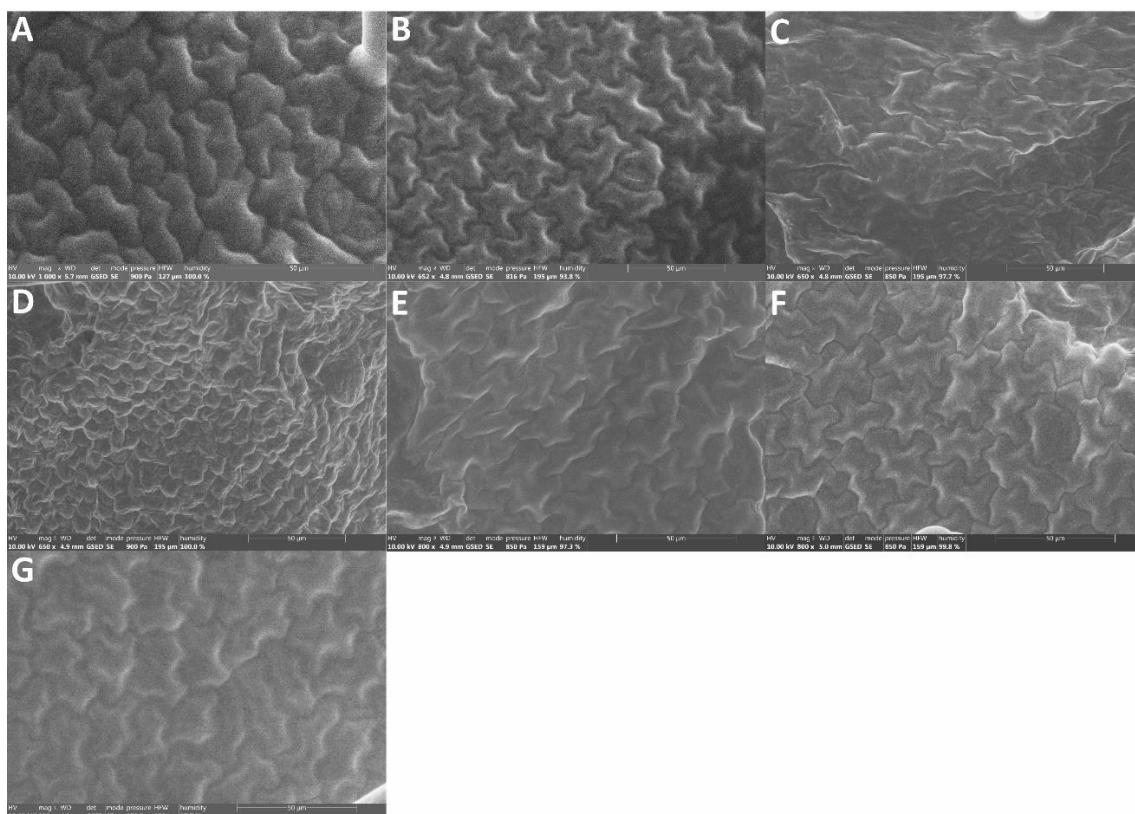


Figure 4. Observation de l'intégrité des cellules de haricot. Observation au MEB de la surface de cellules de feuilles de haricot. A) Cellules non inoculées. B) Cellules inoculées à l'eau. C) Cellules inoculées avec la WT. D) Cellules inoculées avec EV. E) Cellules inoculées avec OFP7_A. F) Cellules inoculées avec OFP7_B. G) Cellules inoculées avec OFP7_C.

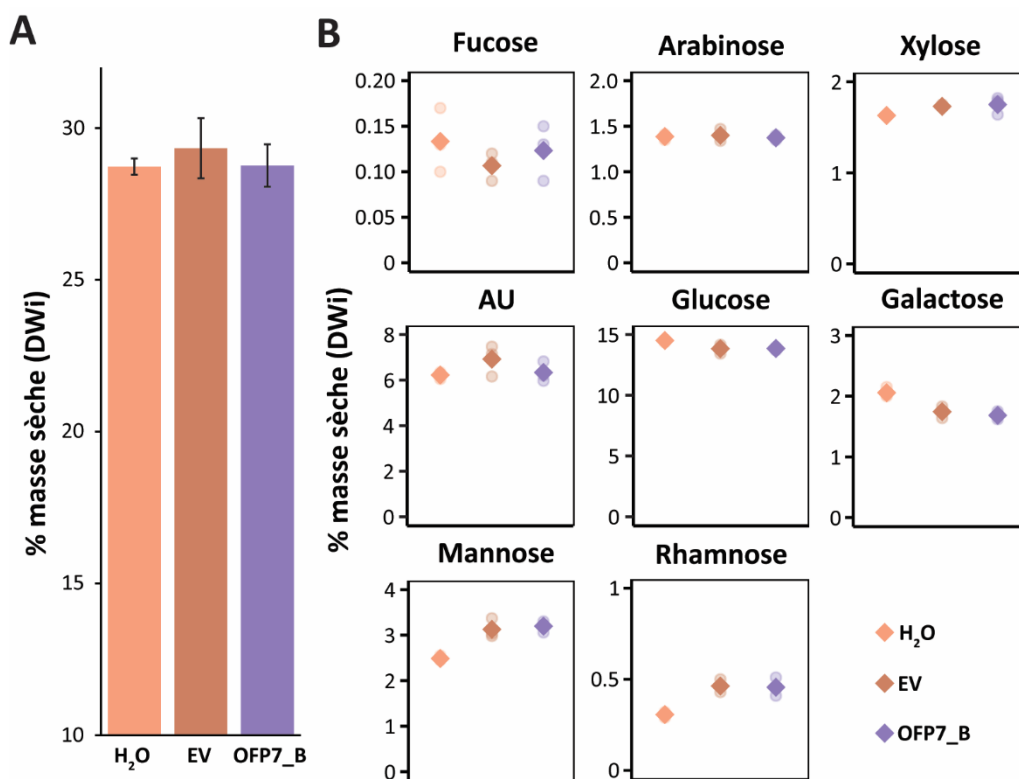


Figure 5. Dosage de la composition en oses des polysaccharides de la paroi cellulaire du haricot. Ces résultats représentent une expérience (n = 3). A) Pourcentage en masse sèche de polysaccharides totaux. B) Composition en oses constitutifs des polysaccharides. Les oses neutres sont le rhamnose, le fucose, l'arabinose, le xylose, le mannose, le galactose et le glucose. Les oses acides sont les acides uroniques (AU).

L'induction de *PvOFP7* a-t-elle un impact sur la composition des polysaccharides de la paroi végétale ?

Aucun changement majeur n'est observé entre les différentes conditions concernant les résidus de fucose, d'arabinose, de xylose et d'acide uronique (Figure 5A-B). Cependant, les échantillons inoculés avec la souche témoin EV et la souche OFP7_B présentent des teneurs réduites en résidus de glucose et en résidus de galactose par rapport aux échantillons inoculés avec de l'H₂O. En revanche, les résidus de mannose et de rhamnose présentent une tendance inverse. Ces résultats suggèrent que la composition de ces oses n'est pas influencée par l'induction de *PvOFP7*, mais plutôt par la présence ou l'absence de la bactérie dans la cellule végétale. Cependant il est difficile de déterminer si ces différences observées sont dues à la paroi du haricot ou la synthèse d'oses par la bactérie. En effet, la production de glucose, rhamnose et mannose a été montrée chez *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, tandis que les souches testées ne produisaient pas de galactose (Orentas *et al.*, 1963).

La mobilité de l'eau dans les cellules végétales est-elle impactée par *PvOFP7* ?

Avant de présenter ces résultats, il faut reprendre un peu le concept de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Lors d'une expérience de RMN, les noyaux atomiques de l'échantillon sont soumis à un champ magnétique intense qui aligne temporairement les spins nucléaires, autrement dit les noyaux d'hydrogène (Harris, 1983; Bovey *et al.*, 1988; Canet & Palmas, 2012)⁴. A l'arrêt du champ magnétique, les spins ont tendance à revenir à leur orientation aléatoire initiale à cause des interactions avec leur environnement (comme les autres noyaux, les électrons, etc.), ce qui provoque une perte de cohérence magnétique. Lors de cette étape de relaxation, les noyaux émettent une énergie mesurable permettant de déterminer le temps de relaxation transversale (T_{2i}), qui décrit le temps nécessaire pour que les spins nucléaires perdent leur cohérence magnétique. Ce paramètre, T_{2i}, dépend de l'environnement du noyau atomique. Plus le T_{2i} est court, plus rapidement les spins sont revenus à leur orientation aléatoire initiale et ont donc eu une interaction rapide avec leur environnement. Cette mesure permet de définir dans un échantillon des « domaines » différents où l'hydrogène ne se comporte pas de la même manière (Todt *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2008; Dufour *et al.*, 2023; Rakha *et al.*, 2023).

⁴[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR_-_Theory](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR_-_Theory)

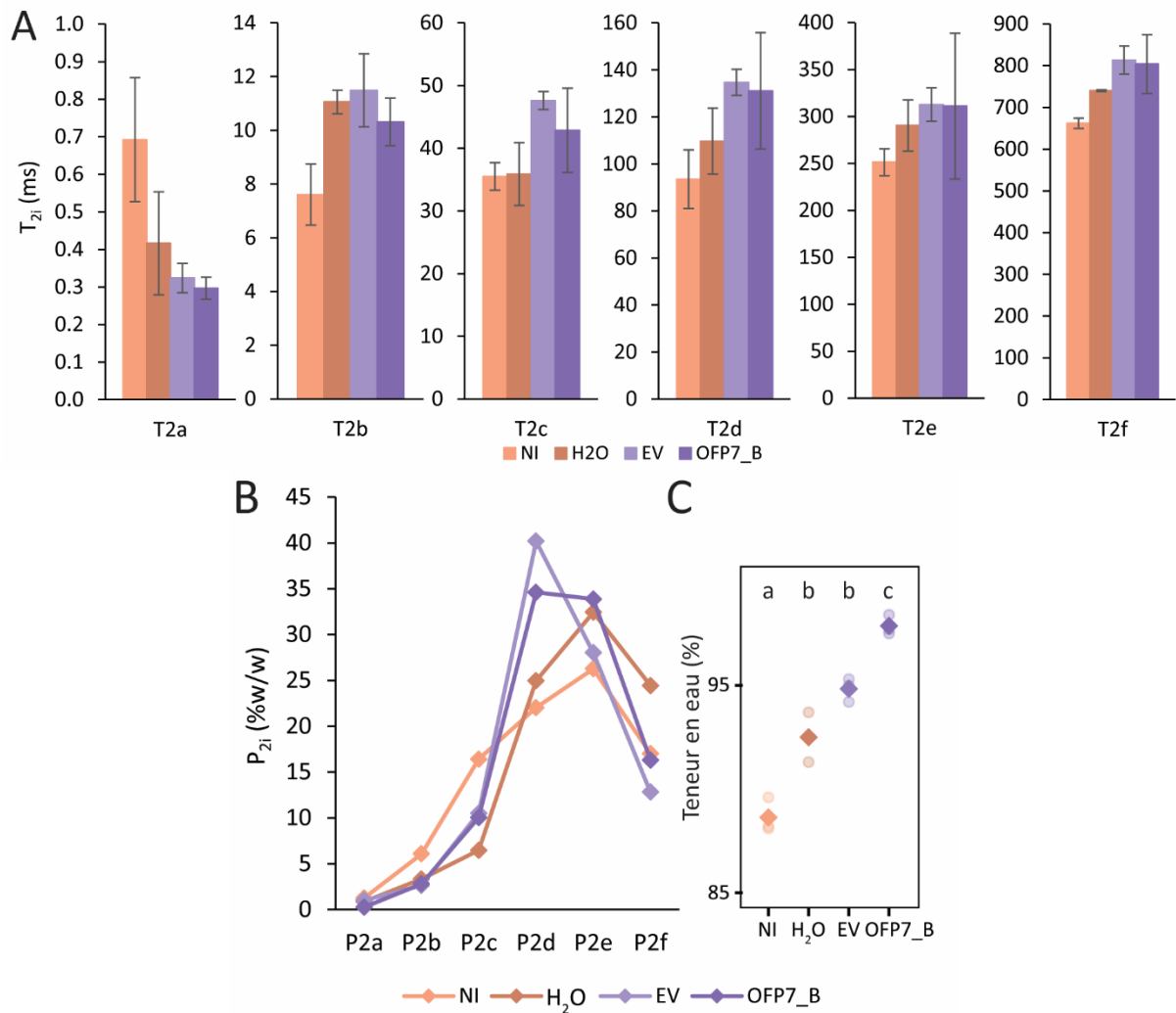


Figure 6. Mesure de la distribution de la mobilité et la proportion relative d'eau dans les feuilles de haricot commun. Les inocula sont représentés par différentes couleurs. A) Le T_{2i} a été mesuré en ms par Time Domain Résonance Magnétique Nucléaire (TD-RMN). B) Représentation du P_{2i} (%w/w) dans chaque domaine. C) Pourcentage de teneur en eau dans les feuilles inoculées. Ces données suivent une loi normale. Les lettres renvoient à des valeurs significativement différentes après le test de Tukey.

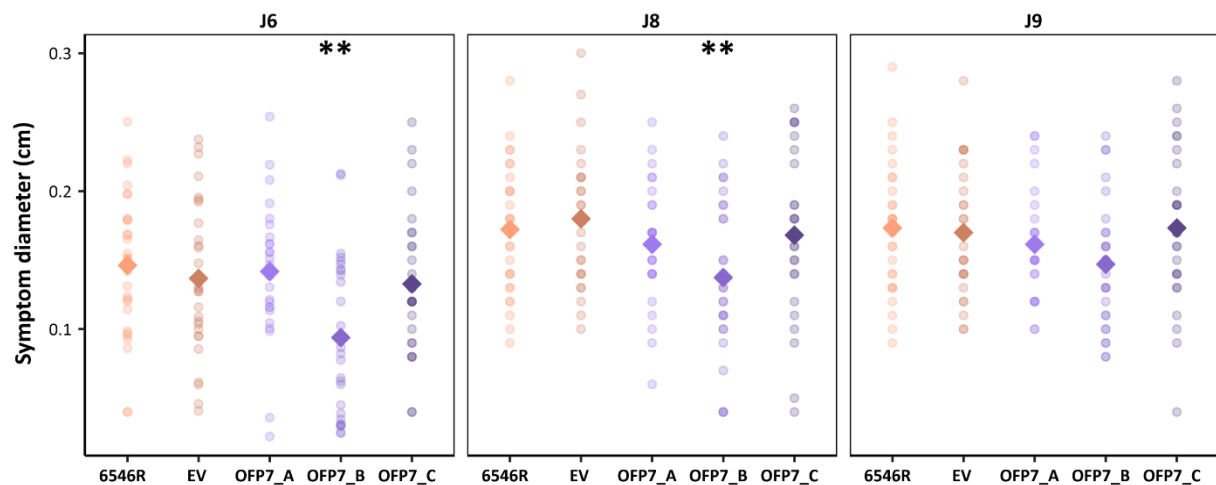


Figure 7. Evaluation des symptômes de CBB observés sur gousses après inoculation. Chaque inoculum a été testé sur chaque gousse et le diamètre des symptômes (cm) a été quantifié 6, 8 et 9 jours après inoculation. Les résultats proviennent de 28-29 gousses par traitement. Le test de Kruskal Wallis a indiqué un effet significatif ($p < 0,05$) des traitements. Le nombre d'étoiles renvoie à des valeurs significativement différentes par rapport à la EV après le test de Dunn (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

Dans notre expérience, la RMN permet d'observer la mobilité de l'eau à l'intérieur des disques de feuilles de haricot et d'y distinguer des domaines où l'eau se comporte différemment. Six domaines se distinguent dans nos échantillons, nommés a, b, c, d, e et f (Figure 6). Ces domaines correspondent à des compartiments dans lesquels l'eau est plus ou moins libre ou liée et donc ayant des temps de relaxation plus ou moins élevés. Les analyses réalisées ne permettent pas d'attribuer à ces domaines un compartiment physiologique précis (cellulaire, intracellulaire) dans les tissus étudiés. Dans un même domaine, la mobilité de l'eau, estimée par le temps de relaxation (T_{2i}) peut être différente en fonction des inocula. De plus, la surface de pic relatif au T_{2i} a également été mesurée et exprimée en fonction de la teneur en eau de l'échantillon pour obtenir la proportion relative d'eau contenue dans un compartiment donné ($P_{2i} = \% \text{ w/w}$). Ainsi, les valeurs T_{2i} et P_{2i} permettent d'observer si les différents inocula affectent la mobilité de l'eau dans les feuilles d'haricot, ce qui pourrait impliquer des changements physiologiques chez la plante. Ces résultats permettront de déduire si l'induction de *PvOFP7* a un impact sur la physiologie des feuilles de haricot.

Les T_{2i} plus courts, signifient que l'eau a une plus faible mobilité (interaction forte avec d'autres composants du domaine), par rapport aux domaines à T_{2i} plus longs, correspondant à une plus grande mobilité de l'eau (interactions plus faibles). Que ce soit pour le T_{2i} ou le P_{2i} , aucune différence significative n'est observée entre les différents inocula dans chaque domaine (Figure 6A-B). Toutefois, tout comme pour les résultats de dosages biochimiques, des tendances semblent apparaître. Globalement, l'inoculation de la souche EV, par rapport aux échantillons inoculés à l'eau, semble impacter le T_2 de plusieurs compartiments (c, d et f). Aucune différence n'est observée entre les échantillons inoculés par OFP7_B et EV, ce qui suggère que la bactérie impacte la mobilité de l'eau dans les compartiments c, d et f. Sans surprise, les domaines les plus petits (a, b et c) ont les proportions relatives en eau (P_{2i}) les plus faibles et présentent peu de différences entre les inocula (Figure 6A, B). Les P_{2e} des feuilles inoculées par de l'eau ou la bactérie portant le dTALE OFP7_B sont supérieurs à ceux des feuilles non inoculées ou inoculées avec EV. L'induction de *PvOFP7* semble donc augmenter la teneur en eau du domaine e. La proportion relative en eau des domaines d et f, quant à eux, semble impactée respectivement à la hausse ou à la baisse par la présence de la bactérie. En effet, par rapport à EV et OFP7_B, le P_{2d} est nettement inférieur et le P_{2f} supérieur pour l' H_2O . On remarque également une différence de teneur en eau apportée par l'inoculation (différence des autres inocula avec NI dans les domaines b et c notamment). Cela est appuyé par le tableau des moyennes de teneur en eau des feuilles entières qui ont servi à la normalisation du P_{2i}

(Figure 6C). La méthode d'inoculation semble également avoir un impact sur la mobilité de l'eau dans les domaines a, b, e et f (Fig. 6A, B). L'induction de *PvOFP7* ne semble pas influencer la mobilité en eau de ces différents domaines (EV vs OFP7_B). En revanche, la présence ou l'absence de la bactérie dans la cellule végétale (EV vs H₂O) a un impact sur la mobilité de l'eau dans les domaines d et f.

La résistance médiée par *PvOFP7* est-elle retrouvée dans les gousses ?

Une réduction significative des symptômes est observée sur gousses à 6 et 8 jours après inoculation de la souche portant le dTALE OFP7_B par rapport au témoin EV (Figure 7). Aucune différence significative n'est observée pour les autres inocula ou à partir de J9. Ces résultats doivent être répétés afin de pouvoir conclure sur la résistance médiée par *PvOFP7* dans les gousses, mais suggère que l'induction de *PvOFP7* pourrait aussi apporter une résistance à la graisse commune dans les gousses.

IV. Discussion & perspectives

L'étude présentée dans ce chapitre a permis de valider *PvOFP7* comme un acteur majeur dans la résistance du haricot à la graisse commune. Elle ouvre également de nouvelles perspectives de recherche sur les gènes *PvExpansinA17* et *PvAP2-ERF71*. Ces résultats enrichissent notre compréhension des mécanismes de résistance du haricot commun à la CBB. Cette résistance semble s'exprimer dans les gousses, ce qui fait de ce gène un candidat intéressant pour l'amélioration génétique du haricot pour la résistance à la CBB (Figure 7). Une étude plus approfondie sur la relation de ce gène dans la résistance de différentes variétés de haricot serait pertinente.

La littérature ainsi que l'analyse transcriptomique par RNAseq (Gaudin *et al.*, non publié) suggèrent que *PvOFP7* posséderait une fonction liée au développement de la cellule et à la paroi cellulaire. Les résultats complémentaires présentés dans ce chapitre constituent une première étape pour mieux comprendre son rôle dans la résistance de la plante.

Les résultats d'observation au MEB montrent que la souche 6546R altère l'intégrité des cellules végétales (Figure 4). En revanche, l'inoculation de souches portant les dTALE n'a pas d'incidence sur les structures tissulaires et la forme des cellules dans les feuilles de haricot. Ces constatations suggèrent que *PvOFP7* joue un rôle protecteur dans l'intégrité de la paroi cellulaire du haricot, un mécanisme clé de l'immunité des plantes. Dans les résultats de RMN le compartiment e présente une proportion relative d'eau plus élevée pour les échantillons inoculés par le dTALE OFP7_B que pour ceux inoculés par EV (Figure 6B). La proportion relative d'eau pour OFP7_B est similaire à celle des échantillons inoculés à l'eau. Inversement, le compartiment d présente une proportion relative d'eau plus élevée pour les échantillons inoculés par EV que pour ceux inoculés par le dTALE OFP7_B ou l'eau. Ces résultats peuvent être expliqués par l'hypothèse que l'induction de *PvOFP7* contribuerait à la rétention d'eau à un endroit stratégique de la feuille. *PvOFP7* empêcherait également la mobilisation de cette eau vers un compartiment utile lors d'interactions de sensibilité. L'hypothèse d'une rétention d'eau est renforcée par la différence significative de teneur en eau des feuilles qui est plus importante pour celles inoculées par OFP7_B que par le EV (Figure 6C). Cette rétention d'eau pourrait aussi indiquer un rôle potentiel de *PvOFP7* dans la protection de l'intégrité des cellules du haricot.

Comme évoqué dans l'article précédent, les résultats de l'analyse RNAseq (Gaudin *et al.*, non publié) ainsi que de l'étude de Foucher *et al.*, (2020) suggèrent que la suppression des HSP est une étape clé de la résistance à la CBB. Les résultats impliquent aussi que la

surexpression de *PvOFP7* permettrait aux cellules de haricot d'être dans un état moins stressé, similaire à celui observé chez le génotype de haricot résistant. De plus, l'induction du gène *PvOFP7* semble provoquer une réduction des dépôts de callose, ce qui pourrait être lié à une réduction de l'état de stress général du haricot (Figure 2). Ainsi, si ce gène est impliqué dans la préservation de l'intégrité des parois cellulaires, cela pourrait indiquer une meilleure barrière physique contre la bactérie. Le pathogène aurait alors du mal à pénétrer dans la plante et les cellules n'auraient pas de raisons d'être en état de stress.

Les résultats de RMN indiquent un impact de la souche 6546R sur la mobilité et la proportion relative en eau de plusieurs domaines du haricot (Figure 6). De plus, la composition en oses des polysaccharides de la paroi végétale semble aussi davantage affectée par la présence de la bactérie que par l'induction de *PvOFP7*. La bactérie dénature également la structure tissulaire ainsi que la forme des cellules végétales et provoque la formation de dépôt de callose chez le haricot. Bien que ces analyses n'aient pas permis de détecter des effets après induction de *PvOFP7*, ces résultats offrent des pistes intéressantes afin d'explorer plus largement l'impact des différentes lignées de *Xcf* et *Xpp* sur la paroi du haricot.

Il est également probable que la réduction de callose joue directement un rôle dans la résistance médiée par *PvOFP7*. Cette observation est cohérente avec certains travaux dans la littérature, où une résistance accrue associée à la perte d'une callose synthase a été observée chez *Arabidopsis thaliana* face à l'oïdium. Le mutant *pmr4* d'*A. thaliana* est à la fois résistant à *Erysiphe cichoracearum* et *Peronospora parasitica* (Vogel & Somerville, 2000). Le phénotype de ce mutant est expliqué par la mutation du gène *GLS5*, une callose synthase impliquée dans la biosynthèse de la callose. Chez ce même mutant, lorsque la voie de la signalisation des défenses de l'acide salicylique (SA) est également bloquée, le phénotype de sensibilité à *E. cichoracearum* est restauré (Nishimura *et al.*, 2003). Cette observation suggère que la callose ou la callose synthase régulerait négativement la voie du SA. La mutation de *GLS5* ou l'absence de callose lèverait donc la régulation négative de l'hormone, ce qui entrainerait alors une résistance (Nishimura *et al.*, 2003). Or Foucher *et al.*, (2020) ont montré que la résistance d'une variété de haricot commun est associée à l'induction de cette voie hormonale. Aux vues des résultats de callose et de l'analyse transcriptomique de Foucher *et al.*, (2020), la voie du SA est peut-être liée à celle de la callose chez le haricot commun, comme pour *A. thaliana*. Cependant les dosages d'hormones suggèrent que *PvOFP7* n'aurait pas d'impact sur la voie du SA ainsi que celles des autres testées, bien que ces résultats restent à confirmer (Figure 3). Il est donc probable que *PvOFP7* n'impacte pas du tout la voie de ces

hormones. Dans ce cas, son rôle dans la résistance à la graisse commune se trouverait en aval des voies de signalisation hormonales.

Dans l'ensemble, des répétitions et des analyses supplémentaires seront nécessaires afin de répondre à ces hypothèses.

Discussion

Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer la diversité des TALE dans la diversité des *Xanthomonas* pathogènes du haricot, ainsi que d'approfondir la compréhension des mécanismes de résistance du haricot à la gousse commune. Ces travaux ont permis de mieux comprendre la répartition mondiale des différentes lignées de ces agents pathogènes et la diversité des effecteurs TALE au sein de ces lignées. De plus, les résultats de cette thèse démontrent le rôle de plusieurs gènes du haricot dans la résistance à cette maladie, apportant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de défense du haricot.

I. Caractérisation de la diversité des TALE chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot

1. Les facteurs influençant la diversité allélique des TALE

Les résultats de la première partie de cette thèse (Chapitre 1) suggèrent que la localisation des TALE dans le génome des souches impacterait leurs diversités alléliques. En effet, *XfuTAL3* et *XfuTAL4* sont exclusivement chromosomiques et *XfuTAL4* présente au total quatre allèles qui diffèrent par leur séquence en RVD. Pourtant, ces TALE sont spécifiques à la lignée GL2, qui présente une faible diversité génétique et pour lesquelles seules 8 génomes ont été étudiées. A l'inverse, *XfuTAL2* est exclusivement plasmidique. Bien que ce TALE soit partagé entre les lignées fuscans et GL1, qui sont phylogénétiquement éloignées et chacune présentant beaucoup plus de diversité que la lignée GL2, *XfuTAL2* demeure remarquablement conservé avec seulement deux variants de RVD sur 26 génomes étudiés. Ces deux exemples mènent donc à penser que la localisation d'un gène codant pour un TALE sur un chromosome permet une plus grande diversité allélique qu'une localisation sur un plasmide.

XfuTAL1 présente à lui seul le parfait exemple de cette hypothèse. Ce TALE, présent à la fois chez *Xcf* et *Xpp*, a la plus grande diversité allélique, plus particulièrement marquée chez *Xpp*. Un transfert horizontal du plasmide A de la lignée fuscans vers un ancêtre de *Xpp* a permis le partage de ce TALE entre les deux pathovars (Ruh *et al.*, 2017). Pourtant, *Xcf* et *Xpp* ne partagent aucun variant allélique de *XfuTAL1* en commun. Chez *Xpp*, une portion du plasmide A contenant *XfuTAL1* s'est insérée dans le chromosome de souches *Xpp* (Gihaut *et al.*, in prep). De manière intéressante, *Xpp* possède cinq variants de *XfuTAL1* chromosomiques mais seulement deux variants plasmidiques. Ce nombre de variants chromosomiques supérieur aux variants plasmidiques corrobore l'idée que la localisation chromosomique d'un TALE permettrait une plus grande diversité allélique. Les quatre variants de *XfuTAL1* retrouvés chez

Xcf sont exclusivement plasmidiques ce qui indique qu'une localisation plasmidique n'empêche pas totalement la diversification. Cependant ces quatre variants sont retrouvés pour 25 souches de trois lignées différentes et ont au moins une cible commune prédite, alors que les sept variants de *Xpp* sont retrouvés sur 16 souches et paraissent beaucoup plus diversifiés en termes de cibles prédites (Gihaut *et al.*, in prep).

De manière intéressante, il a été observé que les espèces de *Xanthomonas* possédant les TALome les plus larges portaient exclusivement leurs gènes *tal* au niveau chromosomique (Schandry *et al.*, 2018). *XfuTAL3* et *XfuTAL4*, situés sur le chromosome, ont subi une duplication, un phénomène qui n'a été montré pour aucun autre TALE chez *Xpp* et *Xcf* (Ruh *et al.*, 2017). De plus, la lignée GL2, où l'on trouve exclusivement ces TALE, présente également le TALome le plus large (3 TALE) par rapport aux autres lignées (0 à 2 TALE). Ces constatations vont dans le sens qu'une localisation chromosomique contribuerait à l'expansion du TALome des *Xanthomonas*. Il est également possible de spéculer que la localisation des TALE sur les chromosomes permettrait de réduire les risques de perte de gènes codant les TALE par simple perte du plasmide.

Nos travaux suggèrent également que *Xpp* a probablement pour origine l'Amérique du Nord, au vu de sa surreprésentation dans cette région du monde. En revanche, *Xcf* est plus présente en Europe, en Afrique et en Amérique du Sud. Il est donc légitime de se demander dans quelles mesures les pratiques agricoles et les génotypes de haricots utilisés dans ces différentes régions du monde pourraient influencer la diversité des TALE. Par exemple, le QTL de résistance SAP6 dérivé de la variété Great Northern a été utilisé pour développer des variétés résistantes à la graisse commune utilisées en Amériques du Nord (Miklas *et al.*, 2003). La diversité de *XfuTAL1* observée chez *Xpp* pourrait donc résulter de l'évolution constante de ces bactéries pour surmonter les résistances du haricot, spécifiques à la culture d'Amérique du Nord. En effet, il est suggéré que la diversité et l'accroissement du nombre de TALE dans les génomes de *Xanthomonas* pourraient résulter de la pression de sélection exercée par la culture de plantes résistantes (Schandry *et al.*, 2018). L'introduction de nouvelles variétés de plantes résistantes aux TALE dans les cultures exerceraient donc une pression sur les bactéries pathogènes, les obligeant à adapter leurs TALE pour tenter de contourner la résistance. Par exemple, certaines souches de *Xoo* portent des nombreux TALE aux fonctions redondantes (Hutin *et al.*, 2015). Cette redondance leur conférerait un avantage lors d'une résistance par perte de sensibilité (Schandry *et al.*, 2018). Lorsqu'un TALE ne reconnaît plus sa cible, un autre prendrait alors le relais. Ainsi, la résistance imposée par des programmes de sélection variétales

pourrait favoriser des *Xanthomonas* possédant différents variants de TALE. Dans le cas des souches pathogènes de haricot, le TALome de chaque souche est très restreint, mais il pourrait être compensé par la diversité des variants alléliques en séquences de RVD, constituant un TALome diversifié à l'échelle de la population.

2. Cible de XfuTAL1

Chez *Xcf*, une cible commune aux quatre variants de XfuTAL1 (TAL23A, TAL22B, TAL22C, TAL3K) a été prédite. Ce gène correspond à *Phvul.010G130200* et est homologue au gène *AIL1* codant pour un AP2-Like Ethylene-Responsive Transcription Factor. Cette prédiction confirme de précédents résultats obtenus dans mon laboratoire d'accueil, où *PvAIL1* a été validé en tant que cible de TAL23A, TAL22B et TAL22C chez le haricot (Foucher *et al.*, in prep). Il serait intéressant de vérifier si le nouvel allèle TAL23K partage également cette cible.

Comme *PvAIL1* a été validé comme cible de différents variants de XfuTAL1 et que ces variants sont conservés dans les lignées GL2, GL3 et fuscans, cette cible semble importante dans la pathogénie de *Xcf*. Ce gène code pour un facteur de transcription, une cible privilégiée des TALE qui permet de réguler l'expression de multiple gènes (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2017; Perez-Quintero & Szurek, 2019). Les gènes de la famille AIL font partie de la grande famille des facteurs de transcription AP2/ERF. Cette famille est centrale chez les plantes et a des rôles qui s'étendent de la régulation de gènes exprimés lors d'un stress abiotique (salinité, fluctuation de température, sécheresse), jusqu'au lien avec la résistance aux maladies et le développement floral (Feng *et al.*, 2020). Chez *A. thaliana*, il a été montré que les gènes de la famille AIL sont en lien avec le développement floral (Krizek *et al.*, 2016). Or les bactéries du genre *Xanthomonas* sont transmissibles par les semences (Zaumeyer & Rex Thomas, 1957; EFSA, 2014). Chez le haricot, si *PvAIL1* est également en lien avec le développement des fleurs, l'induction de ce gène pourrait faciliter la transmission des *Xcf* par voie florale. Il serait donc intéressant de comparer la capacité de transmission de la fleur à la semence d'une souche *Xcf* sauvage, délétée de *XfuTAL1* ainsi que complétée par des dTALE ciblant différentes régions du promoteur de *PvAIL1*.

La différence allélique observée entre *Xpp* et *Xcf* pose question sur l'importance de XfuTAL1 dans la pathogénie de *Xpp* chez le haricot. Dans l'étude menée par Foucher *et al.*, (in prep) il a été montré que lorsque des dTALE, présentant la même séquence RVD que les allèles tal19I et tal21D de XfuTAL1 provenant de *Xpp*, sont insérés dans une souche de *Xcf* délétée de

son *XfuTAL1*, l'agressivité de la souche n'est pas rétablie. De plus, le gène identifié comme cible des différents allèles de *Xcf* n'est pas induit (Foucher *et al.*, in prep). Bien que l'on ne puisse exclure que l'environnement génomique de la souche *Xcf* n'ait pas permis le fonctionnement d'allèles de *Xpp*, ces résultats suggèrent que *tal19I* et *tal21D* ne sont pas fonctionnels. Il serait intéressant de renouveler l'expérience avec les nouveaux allèles plasmidiques ou chromosomiques détectés dans *Xpp* au cours de notre étude, afin de déterminer s'ils complémentent l'agressivité de la souche délétée de *XfuTAL1*.

II. Etude des mécanismes de résistance du haricot à la graisse commune

Cette étude a permis mettre en lumière le lien de trois gènes (*PvAP2-ERF71*, *PvExpansinA17* et *PvOFP7*) avec la résistance du haricot à la graisse commune. Le rôle de *PvOFP7* dans cette résistance a également été étudié. C'est la première fois chez le haricot que des gènes spécifiques ont été montré comme impliqués dans la résistance à la graisse commune. Il est tentant de faire un parallèle entre les cibles naturelles des TALE et les gènes mis en évidence pour leur implication dans la résistance. En effet, deux de ces gènes (*PvAP2-ERF71* et *PvOFP7*) codent pour des facteurs de transcription, qui constituent une classe de gènes connue pour être ciblée par les TALE (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2017; Perez-Quintero & Szurek, 2019). Dans les deux cas, cibler des facteurs de transcriptions ne paraît pas être un hasard puisqu'ils permettent de contrôler des processus complexes, par la régulation de multiples gènes. Ce seraient donc des gènes clefs dont l'induction peut faire pencher la balance en faveur soit du pathogène, soit de la plante. De plus, les analyses transcriptomiques ont montré que l'induction de *PvAIL1* par *XfuTAL1* amenait à une induction de gènes liés à la dégradation des parois (Foucher *et al.*, in prep), alors que l'induction de *PvOFP7* aboutit à l'expression de gènes liés à leur renforcement par la synthèse de composés pariétaux (Gaudin *et al.*, in prep). Le rôle de *PvExpansinA17* pourrait également être en lien avec la paroi, même si les expansines sont plutôt connues pour leur implication dans le relâchement des parois (Cosgrove, 2000). Au final, ces observations suggèrent un rôle essentiel de la paroi à la fois pour la sensibilité et pour la résistance du haricot à la graisse commune.

1. La résistance médiée par *PvOFP7*

La résistance médiée par *PvOFP7* reste encore à évaluer en raison de la complexité de la résistance chez le haricot. En effet, la résistance à la gousse commune ainsi que les gènes impliqués peuvent varier entre les différents organes du haricot et selon les souches attaquant la plante (Opio *et al.*, 1996; Miklas *et al.*, 2006; Singh & Schwartz, 2010; Singh & Miklas, 2015). La résistance médiée par *PvOFP7* a été testée dans les feuilles et les gousses ; elle semble fonctionner également dans ces deux organes. Cependant, une seule souche appartenant à la lignée GL1 (pathovar *phaseoli*) a été testée pour vérifier l'impact de *PvOFP7* dans la résistance. Ainsi, tester des souches des lignées fuscans, GL2 et GL3 (pathovar *fuscans*) serait également intéressant d'autant que l'éloignement phylogénétique de ces deux pathovars et les différences dans leurs répertoires de TALE suggèrent des stratégies différentes d'attaque du haricot.

PvOFP7 semble jouer effectivement un rôle dans la préservation de l'intégrité de la paroi. Il est donc possible que la stratégie de défense par le renforcement de la barrière physique permette une résistance globale aux souches. En revanche, il est également envisageable que le répertoire de CWDE diffère entre les lignées de *Xcf* et *Xpp* et que certaines combinaisons de ces enzymes soient particulièrement efficaces pour rompre l'intégrité de cette barrière. A ce jour, la seule étude sur le sujet a montré que la souche 4834R de *Xcf* possède un large répertoire de CWDE, comprenant des protéases, des xylosidases, des xylanases, des pectates lyases, des cellulases, des polygalacturonases et des bêta-galactosidases (Darrasse *et al.*, 2013). Par conséquent, il serait pertinent d'approfondir l'analyse des répertoires de CWDE présents chez *Xcf* et *Xpp* en utilisant les données génomiques disponibles, ce qui n'a pas été fait lors de cette thèse par faute de temps. Une comparaison des répertoires de CWDE entre les différentes lignées, couplée à l'évaluation de l'efficacité de la résistance médiée par *PvOFP7* contre ces lignées, pourrait fournir des réponses à cette hypothèse.

Suite à l'induction de *PvOFP7*, on observe une modification transcriptionnelle de gènes liés à la production de xyloglucanes. Chez *Xcc*, la dégradation du xyloglucane joue un rôle important dans la pathogénie de la bactérie, car elle participe à la régulation de l'expression du SST3 (Vieira *et al.*, 2021). Or, l'induction de *PvOFP7* entraîne une surexpression des gènes liés à la synthèse des xyloglucanes. Dans ce contexte, si la dégradation du xyloglucane joue un rôle similaire à *Xcc* dans la régulation de l'expression du SST3 chez *Xcf* et *Xpp*, il est envisageable que les enzymes impliquées dans la synthèse des xyloglucanes puissent contrer leurs dégradations par les bactéries, limitant ainsi l'efficacité des facteurs de virulence bactériens.

2. La résistance chez d'autres génotypes

L'implication de *PvOFP7* dans la résistance a d'abord été mise en évidence grâce à l'étude transcriptomique du génotype résistant BAT93 (Foucher *et al.*, 2020). Il est probable que ce gène soit en partie responsable de la résistance observée dans d'autres variétés de haricot commun. Le gradient de résistance à la graisse commune de dix génotypes (chapitre 2.1) révèle que d'autres génotypes, tels que Vezer, Caprice et Deezer, présentent différents degrés de résistance à la graisse commune. J'ai également réalisé des analyses RT-qPCR pour étudier l'induction de *PvOFP7* dans ces différents génotypes. Cependant, ces analyses n'ont pas produit de résultats concluants en raison d'une trop faible expression du gène. Il est possible qu'un autre type d'analyse, comme le RNAseq, soit plus approprié dans ce contexte. L'étude de l'implication de ce gène dans la résistance observée chez différentes variétés de haricot commun semble être une voie intéressante à poursuivre, en particulier dans le cadre d'une amélioration génétique de la plante. En effet, si l'induction de *PvOFP7* était commune à tous les génotypes de haricots résistants par rapport aux sensibles, il constituerait une cible de choix pour sélectionner des haricots résistants à la graisse commune. Par contre, comme la résistance médiée par *PvOFP7* paraît liée à son induction, une étude du promoteur devrait être envisagée afin de détecter d'éventuels polymorphismes associés aux phénotypes de résistance/sensibilité.

3. D'autres voies à explorer

PvOFP7 n'explique qu'une partie des différences transcriptomiques observées chez le génotype résistant BAT93 par rapport au génotype sensible JaloEEP558 (Foucher *et al.*, 2020). L'induction de ce gène n'explique pas l'induction de la voie d'acide salicylique ainsi que la répression de la photosynthèse et du métabolisme des sucres observées chez BAT93 en réponse à l'infection par *Xpp*. De plus, le QTL de résistance sur lequel *PvOFP7* est présent n'explique que 13% de la variation phénotypique chez cette variété résistante. Un travail sur le rôle dans la résistance d'autres gènes est donc important. *PvExpansinA17* et *PvAP2-ERF71* sont deux gènes prometteurs.

PvExpansinA17 fait partie de la grande famille des expansines, de petites protéines (225–300 acides aminés) de la paroi cellulaire, présentes dans toutes les plantes, assurant le relâchement de la paroi (Kende *et al.*, 2004; Sampedro & Cosgrove, 2005). Depuis leur découverte initiale chez le concombre, il est maintenant clair que ces protéines ont des rôles biologiques divers (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 2015; Marowa *et al.*, 2016). Les expansines sont désormais connues comme étant nécessaires dans presque tous les aspects du

développement physiologique des plantes, de la germination à la fructification (Chen & Bradford, 2000; Rose *et al.*, 2000; Kuluev *et al.*, 2013). Les expansines, sécrétées dans l'espace des parois (apoplasme), sont également en lien avec leurs remodelages (Marowa *et al.*, 2016). Ces protéines ont en effet la capacité de permettre le glissement local des polymères des parois en réduisant l'adhésion entre les polysaccharides des parois adjacentes, ce qui permet l'expansion cellulaire (Marowa *et al.*, 2016). En plus d'affecter des stades de croissance particuliers, il a été démontré que les expansines jouent un rôle central dans l'amélioration de la capacité des plantes à résister aux stress biotiques et abiotiques. Par exemple la surexpression du gène P450 CYP71Z2 chez le riz confère une résistance à *Xoo*, qui est partiellement due à la répression de six gènes d'expansine (Li *et al.*, 2015). La répression des gènes d'expansine empêcherait le desserrement des parois cellulaires, améliorant ainsi la protection physique des végétaux contre les phytopathogènes (Marowa *et al.*, 2016). Dans notre cas, ça paraît être l'inverse puisque ce serait l'induction d'un gène codant pour une expansine qui permet la réduction de symptômes de gousse commune. Chez le haricot, une hypothèse serait que l'induction de ce gène induise une boucle de régulation négative de la famille des expansines. Aussi, bien que les expansines participent au relâchement des parois, elles n'ont pas d'activité proprement enzymatique et en particulier pas d'activité xyloglucanase (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995). Il se pourrait donc aussi que l'induction de cette expansine chez le haricot puisse jouer un rôle encore indéterminé dans la modification des parois, en lien avec la résistance à la gousse commune.

PvAP2-ERF71 appartient à la grande famille des facteurs de transcription AP2/ERF. Cette famille se divise en quatre principales sous-familles : les Dehydration Responsive Element-Binding (DREB), les Related to ABI3/VP (RAV), les APETALA2 (AP2) ainsi que les Ethylene-Responsive-Element-Binding protein (ERF) (Feng *et al.*, 2020). Selon une analyse par BlastP, *PvAP2-ERF71* appartient à la sous-famille ERF, qui est la plus vaste parmi les AP2/ERF, avec 12 groupes phylogénétiques décrits (Nakano *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2022). *PvAP2-ERF71* appartient à la sous-famille des cytokinin response factors (CRF), impliqués dans la régulation de divers aspects de la croissance et du développement des plantes et dans la médiation des interactions entre la signalisation hormonale et la réponse au stress environnemental (Kim, 2016). Par exemple, CRF2 pourrait réguler positivement la réponse immunitaire associée à la voie de l'acide salicylique chez *Arabidopsis thaliana* (Kwon, 2016). La protéine la plus proche de *PvAP2-ERF71* chez *A. thaliana* est CRF10 (AT1G68550), qui a été montrée comme contrôlant le temps de floraison chez *Brassica napus* (Yang *et al.*, 2023).

Ce facteur de transcription semble partager des cibles communes avec GTE4, un autre facteur de transcription régulant la réponse immunitaire à *Pseudomonas syringe* chez *A. thaliana* par induction de la voie de l'acide salicylique (Zhou *et al.*, 2022). Le rôle de *PvAP2-ERF71* dans la résistance pourrait donc, contrairement à *PvOFP7*, être en lien avec l'acide salicylique. Il serait donc intéressant de quantifier cette hormone suite à l'induction de *PvAP2-ERF71*.

Tous les gènes candidats de la liste fournie par Foucher *et al.*, (2020) n'ont pas encore été testés. Sur les 28 gènes candidats, j'ai construit des TALE afin de cibler 18 d'entre eux, parmi lesquels 14 ont été utilisés durant cette étude. Le rôle d'autres gènes dans la résistance restent donc encore à découvrir. Cependant, la technique de screening utilisée afin de valider le rôle des 14 gènes dans la résistance présente des limites. En effet, certains gènes pourraient nécessiter l'action combinée d'autres gènes pour avoir un impact sur la résistance à la grasse commune. L'induction d'un seul gène semble donc être limitante, des co-inoculations impliquant différentes combinaisons de dTALE serait ainsi intéressantes à réaliser. De plus, les dTALE provoquent une très forte induction de leurs gènes ciblés, ce qui pourrait masquer l'observation de gènes nécessitant une régulation plus fine afin d'avoir un lien avec la résistance.

III. Durabilité de la résistance

1. Résistance contre les TALE

Une manière pour *PvOFP7* d'aider à l'amélioration variétale pourrait être par la création d'un gène *executor*. En effet, une EBE ou plusieurs EBE ciblées par les TALE de *Xpp* et *Xcf* pourraient être placées dans le promoteur du gène de *PvOFP7*. Cependant ce genre de méthode reste compliqué à mettre en place au vu de l'interdiction de cultiver des variétés OGM en Europe, à l'exception du maïs MON810, seul OGM autorisé à la culture dans l'Union Européenne⁵. En France, aucune culture OGM n'est autorisée.

De plus, quelle durabilité la résistance par les gènes *executor* offre-t-elle ? La manière dont les TALE sont reconnus par les plantes soulève des questions. En effet, la résistance par les protéines codées par les gènes *executor* repose sur l'induction de leur expression par des TALE. Cela signifie que cette résistance repose sur les répétitions portant les RVD, une partie fortement évolutive chez les TALE. Au vu de ces caractéristiques fonctionnelles, Nowack *et*

⁵ <https://www.ecologie.gouv.fr/organismes-genetiquement-modifies-ogm-0>

al., (2022) suggèrent que les gènes *executor* fournissent une résistance moins durable et à spectre plus étroit que les NLR. Par exemple, les NLR *Bs4*, *Xa1* et *Xo1* permettent la détection de plusieurs TALE présentant des compositions en RVD distinctes, ce qui suggère qu'ils reconnaissent la partie conservée des répétitions des TALE (Schornack et al., 2004; Ji et al., 2016; Triplett et al., 2016; Read et al., 2020; Nowack et al., 2022). Par conséquent, les changements de RVD ne devraient pas affecter la capacité de détection de ces NLR (Nowack et al., 2022). A l'inverse, tout changement dans la séquence de RVD est susceptible de réduire ou annuler la résistance de type *executor*. Mais cette modification de la séquence RVD pourrait aussi affecter l'accroche du TALE à son EBE naturelle, ce qui aboutirait à une autre résistance par perte de sensibilité. Aussi, pyramider plusieurs EBE dans un même promoteur pourrait permettre de générer des gènes *executor* plus durables.

Les EBE ciblées par les différents allèles de TALE présents chez *Xcf* et *Xpp* pourraient être également délétées afin d'obtenir une résistance par perte de sensibilité. Cependant, ces effecteurs sont hautement évolutifs. En effet, des dérivés de PthA4 incapables d'induire le gène cible du TALE ont subi des cycles d'incubation répétitive *in planta*, ce qui leur a permis de recouvrir la capacité à activer le gène de sensibilité ciblé par PthA4 (Teper & Wang, 2021). La délétion de ces EBE pourrait causer une forte pression de sélection sur la population de *Xcf* et *Xpp*, ce qui entraînerait rapidement la réactivation du gène de sensibilité (Nowack *et al.*, 2022). La durabilité de la résistance contre les TALE semble donc restreinte.

2. Résistance quantitative et qualitative

L'efficacité de la résistance médiée par *PvOFP7* a été évaluée dans un contexte d'interaction particulièrement simple, impliquant une seule variété de haricot et une seule souche de *Xanthomonas*. Cependant, dans la nature, les interactions sont bien plus complexes, impliquant souvent plusieurs variétés de haricots, différentes espèces végétales et diverses souches bactériennes. Pour comprendre pleinement l'efficacité de la résistance médiée par *PvOFP7*, il est essentiel d'étendre ces évaluations à ces interactions complexes. Outre l'évaluation de son efficacité, il est aussi crucial d'étudier la durabilité de la résistance médiée par *PvOFP7* face à l'évolution des bactéries.

Typiquement, deux types de résistance existent : la résistance qualitative (gènes majeurs) et la résistance quantitatives (QTL de résistance). Généralement la résistance qualitative est monogénique et confère une immunité totale, tandis que la résistance quantitative est polygénique et partielle (Burdon *et al.*, 2014; Mundt, 2014; Brown, 2015). La résistance

quantitative est généralement plus durable que la résistance qualitative, car elle implique la combinaison de plusieurs gènes, ce qui rend plus complexe son contournement (Parlevliet, 2002; Mundt, 2014). Cependant, l'utilisation d'un seul gène majeur peut être pertinente dans certaines situations, par exemple face à une maladie de gravité modérée ou faible (Mundt, 2014). D'autre part, une résistance partielle exerce une pression de sélection plus faible sur les agents pathogènes, ce qui peut contribuer à maintenir son efficacité sur le long terme. La résistance médiée par *PvOFP7* étant partielle, ces observations laissent penser qu'elle pourrait être également durable.

Dans le cadre d'une stratégie de résistance durable à la graisse commune, le rôle d'autres gènes de résistance, tels que *PvExpansinA17* et *PvAP2-ERF7*, devra être soigneusement considérée. Plutôt que d'opter pour le pyramidage de plusieurs de ces gènes dans un même génotype, une alternative pourrait être d'utiliser un mélange de variétés présentant chacune une résistance partielle. Combinée à d'autres méthodes de lutte efficaces, telles que l'utilisation de semences saines, la rotation de cultures avec des plantes bénéfiques, l'élimination des débris végétaux, cette approche pourrait s'avérer plus durable que l'utilisation d'un gène seul. Un modèle de prédiction de l'efficacité et la durabilité des stratégies de lutte a été développé (Rimbaud *et al.*, 2018). Cette avancée pourrait permettre de sélectionner la méthode la plus pertinente à suivre, renforçant ainsi notre capacité à concevoir des approches de lutte durables et efficaces contre la graisse commune du haricot.

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'enrichir notre compréhension de l'interaction du haricot commun et les *Xanthomonas* responsables de la graisse commune. Cela a été accompli en caractérisant la diversité des TALE et des agents pathogènes ainsi qu'en étudiant le rôle de plusieurs gènes dans la résistance à cette maladie.

Cette thèse démontre que l'étude de la résistance d'une plante hôte à *Xanthomonas* est possible par le biais des TALE. Ces travaux sont en accord avec la proposition selon laquelle les TALE peuvent servir de sondes chez les espèces hôtes et non hôtes, pour découvrir des phénotypes spécifiques chez les plantes en cas d'activation transcriptionnelle d'un gène donné (Nowack *et al.*, 2022). En effet, l'utilisation de dTALE nous a permis d'établir un lien entre trois gènes et la résistance à la graisse commune.

L'étude de la diversité des TALE et des agents responsables de la graisse commune a permis d'améliorer notre compréhension de leur répartition à travers le monde. Ces informations sont essentielles pour une meilleure compréhension de la co-évolution entre ces bactéries et le haricot, et contribue à renforcer notre capacité à lutter contre la graisse commune du haricot.

Références bibliographiques

- Van Den Ackerveken G, Marois E, Bonas U. 1996.** Recognition of the Bacterial Avirulence Protein AvrBs3 Occurs inside the Host Plant Cell. *CELL* **87**: 1307–1316.
- Akhavan A, Bahar M, Askarian H, Lak MR, Nazemi A, Zamani Z. 2013.** Bean common bacterial blight: Pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *SpringerPlus* **2**: 1–9.
- Akimoto-Tomiyama C, Furutani A, Tsuge S, Washington EJ, Nishizawa Y, Minami E, Ochiai H. 2012.** XopR, a type III effector secreted by *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 505–514.
- Alavi SM, Sanjari S, Durand F, Brin C, Manceau C, Poussier S. 2008.** Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive h. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3295–3301.
- Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CHI, Da Silva ACR, Farah CS. 2005.** Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology* **187**: 2315–2325.
- Alexandratos N, Bruinsma J. 2012.** FAO WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030/2050. *ESA Working paper* **12**: 146.
- Alvarez-Díaz JC, Gratias A, Klopp C, Latrasse D, Benhamed M, Geffroy V. 2022.** Chromosome-scale Genome Assembly of the Common Bean Genotype JaloEEP558 using PACBIO HIFI and HI-C. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperation (BIC)* **65**: 93–94.
- Alvarez-Martinez CE, Sgro GG, Araujo GG, Paiva MRN, Matsuyama BY, Guzzo CR, Andrade MO, Farah CS. 2021.** Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**: 279–302.
- An SQ, Potnis N, Dow M, Vorhölter FJ, He YQ, 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* **44**: 1–32.
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. 2010.** Rice xa13 recessive

resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *Plant Cell* **22**: 3864–3876.

Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros LMG, Brasileiro ACM, Maxwell DR, Rech EL, Faria JC. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* **4**: 491–499.

Aritua V, Harrison J, Sapp M, Buruchara R, Smith J, Studholme DJ. 2015. Genome sequencing reveals a new lineage associated with lablab bean and genetic exchange between *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–18.

Arnaud-Santana E, Pena-Matos E, Coyne DP, Vidaver AK. 1991. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Naturally Infested Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*) Debris. *Plant Disease* **75**: 952.

Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species Nuclear. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 208–218.

Assefa T, Assibi Mahama A, Brown A V., Cannon EKS, Rubyogo JC, Rao IM, Blair MW, Cannon SB. 2019. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* **39**.

Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* **93**: 614–636.

Baptista JC, Machado MA, Homem RA, Torres PS, Vojnov AA, Do Amaral AM. 2010. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genetics and Molecular Biology* **33**: 146–153.

Bayer-Santos E, Lima L dos P, Ceseti L de M, Ratagami CY, de Santana ES, da Silva AM, Farah CS, Alvarez-Martinez CE. 2018. *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environmental Microbiology* **20**: 1562–1575.

Belete T, Bastas K. 2017. Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* **08**.

- Belete T, Bastas KK, Francesconi S, Balestra GM. 2021.** Biological effectiveness of *Bacillus subtilis* on common bean bacterial blight. *Journal of Plant Pathology* **103**: 249–258.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V. 2014.** Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–8.
- Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, et al. 2019.** Ilastik: Interactive Machine Learning for (Bio)Image Analysis. *Nature Methods* **16**: 1226–1232.
- Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, Rossi M, Giardini A, Zeuli PS, Logozzo G, Stougaard J, McClean P, Attene G, et al. 2012.** Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**.
- Bitocchi E, Rau D, Bellucci E, Rodriguez M, Murgia ML, Gioia T, Santo D, Nanni L, Attene G, Papa R. 2017.** Beans (*Phaseolus* spp .) as a Model for Understanding Crop Evolution. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–21.
- Blair MW, González LF, Kimani PM, Butare L. 2010.** Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics* **121**: 237–248.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973.** New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**: 484–489.
- Boch J, Bonas U. 2010.** *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 419–436.
- Boch J, Bonas U, Lahaye T. 2014.** TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist* **204**: 823–832.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaya T, Anja N, Bonas U. 2009.** Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. 2010.** TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 394–401.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes ÉA, Aragão FJL. 2007.** RNAi-mediated

resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 717–726.

Bongaarts J. 2009. Human population growth and the demographic transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 2985–2990.

Bovey FA, Mirau PA, Gutowsky HS. 1988. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Elsevier.

Briand M, Ruh M, Darrasse A, Jacques M-A, Chen NWG. 2021. Complete and Circularized Genome Sequences of 17 *Xanthomonas* Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean. *Microbiology Resource Announcements* **10**: 17–20.

Brown JKM. 2015. Durable Resistance of Crops to Disease: A Darwinian Perspective. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 513–539.

Burdman S, Shen Y, Lee SW, Xue Q, Ronald P. 2004. RaxH/RaxR: A two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for Avrxa21 activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 602–612.

Burdon JJ, Barrett LG, Rebetzke G, Thrall PH. 2014. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications* **7**: 609–624.

Büttner D, Bonas U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 107–133.

Cafati CR, Saettler AW. 1980a. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in Seed of Resistant and Susceptible *Phaseolus* Genotypes. *Phytopathology* **70**: 638.

Cafati CR, Saettler AW. 1980b. Role of Nonhost Species as Alternate Inoculum Sources of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease* **64**: 194.

Cai L, Cao Y, Xu Z, Ma W, Zakria M, Zou L, Cheng Z, Chen G. 2017. A Transcription Activator-Like Effector Tal7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* Activates Rice Gene Os09g29100 to Suppress Rice Immunity. *Scientific Reports* **7**: 1–13.

Canet D, Palmas P. 2012. La RMN en chimie Mobilité moléculaire et RMN. **1**: 97–103.

Carrère S, Mayjonade B, Lalanne D, Gaillard S, Verdier J, Chen NWG. 2023. First whole genome assembly and annotation of a European common bean cultivar using PacBio HiFi and Iso-Seq data. *Data in Brief* **48**.

- Chacón S. MI, Pickersgill B, Debouck DG, Arias JS. 2007.** Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution* **266**: 175–195.
- Chan JWYF, Goodwin PH. 1999.** Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 867–878.
- Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Solanilla EL, Low D, Moleleki L, et al. 2012.** The role of secretion systems and small molecules in soft-rot enterobacteriaceae pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 425–449.
- Chen F, Bradford KJ. 2000.** Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology* **124**: 1265–1274.
- Chen X, Liu P, Mei L, He X, Chen L, Liu H, Shen S, Ji Z, Zheng X, Zhang Y, et al. 2021a.** Xa7, a new executor R gene that confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight disease in rice. *Plant Communications* **2**: 100143.
- Chen NWG, Ruh M, Darrasse A, Foucher J, Briand M, Costa J, Studholme DJ, Jacques MA. 2021b.** Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology* **22**: 1464–1480.
- Chen NWG, Serres-Giardi L, Ruh M, Briand M, Bonneau S, Darrasse A, Barbe V, Gagnevin L, Koebnik R, Jacques MA. 2018.** Horizontal gene transfer plays a major role in the pathological convergence of *Xanthomonas* lineages on common bean. *BMC Genomics* **19**: 1–20.
- Choudhury R, Panda S, Singh D V. 2012.** Emergence and dissemination of antibiotic resistance: A global problem. *Indian Journal of Medical Microbiology* **30**: 384–390.
- Chu Z, Yuan M, Yao J, Ge X, Yuan B, Xu C, Li X, Fu B, Li Z, Bennetzen JL, et al. 2006.** Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes and Development* **20**: 1250–1255.
- Collado R, Bermúdez-Caraballoso I, García LR, Veitía N, Torres D, Romero C, Martirena-Ramírez A, Angenon G. 2015.** Agrobacterium-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. using indirect organogenesis. *Scientia Horticulturae* **195**: 89–100.

- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B. 2016.** Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* **65**: 792–806.
- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015.** Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 541–563.
- Cosgrove DJ. 2000.** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**: 321–326.
- Costerton WJ, Lewandowski Z. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*: 711–45.
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ. 2013.** Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**: 746–751.
- Darrasse A, Barret M, Cesbron S, Compant S, Jacques MA. 2018.** Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant and Soil* **422**: 115–128.
- Darrasse A, Bureau C, Samson R, Morris CE, Jacques MA. 2007.** Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 203–215.
- Darrasse A, Carrère S, Barbe V, Boureau T, Arrieta-Ortiz ML, Bonneau S, Briand M, Brin C, Cociancich S, Durand K, et al. 2013.** Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* **14**.
- Darrasse A, Darsonval A, Boureau T, Brisset MN, Durand K, Jacques MA. 2010.** Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6787–6796.
- Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques MA. 2009.** Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 747–757.
- Darsonval A, Darrasse A, Meyer D, Demarty M, Durand K, Bureau C, Manceau C, Jacques MA. 2008.** The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible

beans. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2669–2678.

Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375–382.

Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS, Strynadka NCJ, Finlay BB. 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **15**: 323–337.

Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N. 2012. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* **335**: 720–723.

Didinger C, Thompson HJ. 2022. The role of pulses in improving human health: A review. *Legume Science* **4**: 1–14.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.

Domínguez E, Cuartero J, Heredia A. 2011. An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Science* **181**: 77–84.

Duan S, Jia H, Pang Z, Teper D, White F, Jones J, Zhou C, Wang N. 2018. Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene CsLOB1. *Molecular Plant Pathology* **19**: 1908–1916.

Dufour M, Foucat L, Hugon F, Dugué A, Chiron H, Della Valle G, Kansou K, Saulnier L. 2023. Water mobility and microstructure of gluten network during dough mixing using TD NMR. *Food Chemistry* **409**.

EFSA. 2014. Panel on Plant Health. *Scientific Opinion on the pest categorisation of Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli and Xanthomonas fuscans subsp. fuscans*.

Englyst HN, Cummings JH. 1988. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* **71**: 808–814.

EPPO. 2023a. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online.

EPPO. 2023b. *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online.

Erkes A, Mücke S, Reschke M, Boch J, Grau J. 2019. *PrediTALE: A novel model learned from quantitative data allows for new perspectives on TALE targeting.*

Feng K, Hou XL, Xing GM, Liu JX, Duan AQ, Xu ZS, Li MY, Zhuang J, Xiong AS. 2020. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Critical Reviews in Biotechnology* **40**: 750–776.

Filloux A. 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1694**: 163–179.

Fininsa C, Tefera T. 2001. Effect of primary inoculum sources of bean common bacterial blight on early epidemics, seed yield and quality aspects. *International Journal of Pest Management* **47**: 221–225.

Fininsa C, Yuen J. 2002. Temporal progression of bean common bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in sole and intercropping systems. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 485–495.

Fonseca NP, Patané JSL, Varani AM, Felestrino ÉB, Caneschi WL, Sanchez AB, Cordeiro IF, Lemes CG de C, Assis R de AB, Garcia CCM, et al. 2019. Analyses of Seven New Genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* Strains, Causative Agents of Citrus Canker B and C, Show a Reduced Repertoire of Pathogenicity-Related Genes. *Frontiers in Microbiology* **10**: 1–15.

Fonteyne S, Castillo Caamal JB, Lopez-Ridaura S, Van Loon J, Espidio Balbuena J, Osorio Alcalá L, Martínez Hernández F, Odjo S, Verhulst N. 2023. Review of agronomic research on the milpa, the traditional polyculture system of Mesoamerica. *Frontiers in Agronomy* **5**: 1–16.

Foucher J. 2020. Rôle des effecteurs TAL dans l'interaction *Xanthomonas*-haricot et apports dans la lutte contre la graisse commune.

Foucher J, Ruh M, Préveaux A, Carrère S, Pelletier S, Briand M, Serre RF, Jacques MA, Chen NWG. 2020. Common bean resistance to *Xanthomonas* is associated with upregulation of the salicylic acid pathway and downregulation of photosynthesis (BMC Genomics (2020) 21 (566) DOI: 10.1186/s12864-020-06972-6). *BMC Genomics* **21**: 1–18.

Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, Cowling W, Bramley H, Mori TA, Hodgson JM, et al. 2016. Neglecting legumes has compromised

human health and sustainable food production. *Nature Plants* **2**: 1–10.

Gakuubi MM, Wagacha JM, Dossaji SF, Wanzala W. 2016. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Microbiology* **2016**.

Gao C, Xiong W, Zhang Y, Yuan W, Wu Q. 2008. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. *Journal of Microbiological Methods* **75**: 437–440.

Geißler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens SE, Boch J. 2011. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS ONE* **6**: 1–7.

Gent DH, Lang JM, Schwartz HF. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* **89**: 558–564.

Giorgio A, Lo Cantore P, Shanmugaiah V, Lamorte D, Iacobellis NS. 2016. Rhizobacteria isolated from common bean in southern Italy as potential biocontrol agents against common bacterial blight. *European Journal of Plant Pathology* **144**: 297–309.

Giraud E. 2007. Symbiose rhizobium / légumineuse : un nouveau sésame Abonnez-vous. *Medecine/Sciences*: 663–666.

Grau J, Wolf A, Reschke M, Bonas U, Posch S, Boch J. 2013. Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites. *PLoS Computational Biology* **9**.

Grimault V, Olivier V, Rolland M, Darrasse A, M. AJ. 2014. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in *Phaseolus vulgaris* (bean). *ISTA International rules for seed testing Chapter 7*: 345.

Gu K, Tian D, Yang F, Wu L, Sreekala C, Wang D, Wang GL, Yin Z. 2004. High-resolution genetic mapping of Xa27(t), a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 800–807.

Gu K, Yang B, Tian D, Wu L, Wang D, Sreekala C, Yang F, Chu Z, Wang GL, White FF, et al. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**: 1122–1125.

- Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Boureau T, Poussier S. 2009.** A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* **4**.
- Harris RK. 1983.** *Nuclear magnetic resonance spectroscopy : a physicochemical view*. Pitman Books, Marshfield, Massachusetts.
- Hayward A. 1993.** The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings J, Civerolo E, eds. *Xanthomonas*. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1–119.
- He YW, Zhang LH. 2008.** Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 842–857.
- Hématy K, Cherk C, Somerville S. 2009.** Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 406–413.
- Hnatuszko-konka K, Kowalczyk T, Gerszberg A. 2014.** *Phaseolus vulgaris* — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances* **32**: 1205–1215.
- Hnatuszko-konka K, Kowalczyk T, Gerszberg A, Glińska S. 2019.** Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. : 1–12.
- Hokins CM, White FF, CHoi S-H, Guo A, Leach JE. 1992.** Identification of a Family of Avirulence Genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**: 451–459.
- Van Der Hoorn RAL, Kamoun S. 2008.** From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**: 2009–2017.
- Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A. 2016.** The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–18.
- Hu N, Hung MN, Liao CT, Lin MH. 1995.** Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology* **141**: 1395–1406.
- Hu Y, Zhang J, Jia H, Sosso D, Li T, Frommer WB, Yang B, White FF, Wang N, Jones JB. 2014.** Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**.

- Hückelhoven R. 2007.** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.
- Hui S, Liu H, Zhang M, Chen D, Li Q, Tian J, Xiao J, Li X, Wang S, Yuan M. 2019a.** The host basal transcription factor IIA subunits coordinate for facilitating infection of TALEs-carrying bacterial pathogens in rice. *Plant Science* **284**: 48–56.
- Hui S, Shi Y, Tian J, Wang L, Li Y, Wang S, Yuan M. 2019b.** TALE-carrying bacterial pathogens trap host nuclear import receptors for facilitation of infection of rice. *Molecular Plant Pathology* **20**: 519–532.
- Hummel AW, Wilkins KE, Wang L, Cernadas RA, Bogdanove AJ. 2016.** A transcription activator-like effector from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* elicits dose-dependent resistance in rice. *Molecular Plant Pathology* **18**: 55–66.
- Hutin M, Césari S, Chalvon V, Michel C, Tran TT, Boch J, Koebnik R, Szurek B, Kroj T. 2016.** Ectopic activation of the rice NLR heteropair RGA4/RGA5 confers resistance to bacterial blight and bacterial leaf streak diseases. *Plant Journal* **88**: 43–55.
- Hutin M, Pérez-Quintero AL, Lopez C, Szurek B. 2015.** MorTAL Kombat: The story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Iyer AS, McCouch SR. 2004.** The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1348–1354.
- Izoré T, Job V, Dessen A. 2011.** Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* **19**: 603–612.
- 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.
- Jacques M., Josi K, Darrasse A, Samson R. 2005.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2008–2015.
- Jeandet P, Clément C, Courot E, Cordelier S. 2013.** Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance. : 14136–14170.

- Ji Z, Ji C, Liu B, Zou L, Chen G, Yang B. 2016.** Interfering TAL effectors of *Xanthomonas oryzae* neutralize R-gene-mediated plant disease resistance. *Nature Communications* **7**: 1–9.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Kaiser WJ, Vakili NG. 1978.** Insect Transmission of Pathogenic *Xanthomonads* to Bean and Cowpea in Puerto Rico. *Phytopathology* **68**: 1057.
- Karavina C. 2014.** The contribution of soil and crop debris inocula to the outbreak of common bacterial blight in field beans (*Phaseolus vulgaris* L) under Zimbabwean conditions.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. 2007.** A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.
- Kende H, Bradford KJ, Brummell DA, Cho HT, Cosgrove DJ, Fleming AJ, Gehring C, Lee Y, McQueen-Mason S, Rose JKC, et al. 2004.** Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology* **55**: 311–314.
- Kim J. 2016.** CYTOKININ RESPONSE FACTORs Gating Environmental Signals and Hormones. *Trends in Plant Science* **21**: 993–996.
- Kim NH, Hwang BK. 2015.** Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant Physiology* **167**: 307–322.
- Koehler HH, Chang C-H, Scheier G, Burke DW. 1987.** Nutrient Composition, Protein Quality, and Sensory Properties of Thirty-Six Cultivars of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* **52**: 1335–1340.
- Krizek BA, Bequette CJ, Xu K, Blakley IC, Fu ZQ, Stratmann JW, Loraine AE. 2016.** RNA-Seq Links the Transcription Factors AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 to Cell Wall Remodeling and Plant Defense Pathways. *Plant Physiology* **171**: 2069–2084.
- Kuluev BR, Safiullina MG, Knyazev A V., Chemeris A V. 2013.** Effect of ectopic expression of NtEXPA5 gene on cell size and growth of organs of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Developmental Biology* **44**: 28–34.
- Kwon T. 2016.** Cytokinin response factor 2 positively regulates salicylic acid-mediated plant immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* **33**: 207–210.
- de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun KH, Koszinowski J, Heuer H, Strauß A, Lahaye T. 2013.** Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL

effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist* **199**: 773–786.

De Lange O, Wolf C, Dietze J, Elsaesser J, Morbitzer R, Lahaye T. 2014. Programmable DNA-binding proteins from Burkholderia provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. *Nucleic Acids Research* **42**: 7436–7449.

De Lange O, Wolf C, Thiel P, Krüger J, Kleusch C, Kohlbacher O, Lahaye T. 2015. DNA-binding proteins from marine bacteria expand the known sequence diversity of TALE-like repeats. *Nucleic Acids Research* **43**: 10065–10080.

Lavorgna G, Guffanti A, Borsani G, Ballabio A, Boncinelli E. 1999. TargetFinder: Searching annotated sequence databases for target genes of transcription factors. *Bioinformatics* **15**: 172–173.

Lee HA, Lee HY, Seo E, Lee J, Kim SB, Oh S, Choi E, Choi E, Lee SE, Choi D. 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **30**: 5–15.

Lee HM, Wang KC, Liu YL, Yew HY, Chen LY, Leu WM, Chen DC, Hu NT. 2000. Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Bacteriology* **182**: 1549–1557.

Li W, Wang F, Wang J, Fan F, Zhu J, Yang J, Liu F, Zhong W. 2015. Overexpressing CYP71Z2 enhances resistance to bacterial blight by suppressing auxin biosynthesis in rice. *PLoS ONE* **10**: 1–17.

Liu F, McDonald M, Schwessinger B, Joe A, Pruitt R, Erickson T, Zhao X, Stewart V, Ronald PC. 2019. Variation and inheritance of the *Xanthomonas* raxX-raxSTAB gene cluster required for activation of XA21-mediated immunity. *Molecular Plant Pathology* **20**: 656–672.

Liu Q, Yuan M, Zhou Y, Li X, Xiao J, Wang S. 2011. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant, Cell and Environment* **34**: 1958–1969.

Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R, et al. 2008. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* **3**.

- Luu DD, Joe A, Chen Y, Parys K, Bahar O, Pruitt R, Chan LJG, Petzold CJ, Long K, Adamchak C, et al. 2019.** Biosynthesis and secretion of the microbial sulfated peptide RaxX and binding to the rice XA21 immune receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 8525–8534.
- Mahmood I, Ruqii Imadi S, Shazadi K, Gul A, Rehman Hakeem K. 2016.** Effects of Pesticides on Environment. *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*: 1–366.
- Maphosa S, Moleleki LN, Motaung TE. 2023.** Bacterial secretion system functions: evidence of interactions and downstream implications. *Microbiology (United Kingdom)* **169**: 1–13.
- Marcec MJ, Gilroy S, Poovaiah BW, Tanaka K. 2019.** Plant Science Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science* **283**: 343–354.
- Marois E, Van Den Ackerveken G, Bonas U. 2002.** The Xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 637–646.
- Marowa P, Ding A, Kong Y. 2016.** Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports* **35**: 949–965.
- McClellan P, Gepts P, Kamir J. 2004.** Genomics and Genetic Diversity in Common Bean. *Legume Crop Genomics*.
- McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. 1995.** Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology* **107**: 87–100.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992.** Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425–1433.
- Merda D, Briand M, Bosis E, Rousseau C, Portier P, Barret M, Jacques MA, Fischer-Le Saux M. 2017.** Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in Xanthomonas plant pathogens. *Molecular Ecology* **26**: 5939–5952.
- Miklas PN, Beaver JS, Grafton KF, Freytag GF. 1994.** Registration of TARS VCI-4B Multiple Disease Resistant Dry Bean Germplasm. *Crop Science* **34**: 1415–1415.
- Miklas PN, Coyne DP, Grafton KF, Mutlu N, Reiser J, Lindgren DT, Singh SP. 2003.** A

major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. *Euphytica* **131**: 137–146.

Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* **147**: 105–131.

Miklas PN, Zapata M, Beaver JS, Grafton KF. 1999. Registration of Four Dry Bean Germplasms Resistant to Common Bacterial Blight: ICB-3, ICB-6, ICB-8, and ICB-10. *Crop Science* **39**: 594–594.

Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 165–99.

Mkandawire ABC, Mabagala RB, Guzmán P, Gepts P, Gilbertson RL. 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology* **94**: 593–603.

Moreira LM, De Souza RF, Almeida NF, Setubal JC, Oliveira JCR, Furlan LR, Ferro JA, Da Silva ACR. 2004. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 163–184.

Morris CE, Monier JM. 2003. The Ecological Significance of Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 429–453.

Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* **326**: 1501.

Mundt CC. 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 446–455.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H, W R, Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H, Rice W. 2006. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family. *Plant Physiology* **140**: 411–432.

Nga-Sze Mak A, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012. The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target. *Science* **335**: 716–719.

Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG. 2021. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110–115.

- Ngou BPM, Ding P, Jones JDG. 2022.** Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* **34**: 1447–1478.
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. 2003.** Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**: 969–972.
- Niu XN, Wei ZQ, Zou HF, Xie GG, Wu F, Li KJ, Jiang W, Tang JL, He YQ. 2015.** Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *BMC Microbiology* **15**: 1–15.
- Nodari RO, Tsai SM, Guzman P, Gilbertson RL, Gepts P. 1993.** Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* **134**: 341–350.
- Nowack MK, Holmes DR, Lahaye T. 2022.** TALE-induced cell death executors: an origin outside immunity? *Trends in Plant Science* **27**: 536–548.
- Oerke EC. 2006.** Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* **144**: 31–43.
- Opio AF, Allen DJ, Teri JM. 1996.** Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in Phaseolus beans. *Plant Pathology* **45**: 1126–1133.
- Opio AF, Teri JM, Allen DJ. 1992.** Assessment of yield losses caused by common bacterial blight of beans in Uganda. Bean Improvement Cooperative. *Annual Report (USA)*: 113–114.
- Orentas DG, Sloneker JH, Jeanes A. 1963.** Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. *Canadian Journal of Microbiology* **9**: 0–3.
- Papa R, Nanni L, Sicard D, Rau D, Attene G. 2006.** Evolution of Genetic Diversity in *Phaseolus vulgaris* L. In: Systematics and the origin of crops. 121–142.
- Parlevliet JE. 2002.** Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* **124**: 147–156.
- Paulino C de S, Carneiro LT, Almeida NM, Santa-Martinez E, Castro CC. 2023.** Neutral influence of animal pollination in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) production and seed germination. *Scientia Horticulturae* **318**: 112096.
- Pérez-Quintero AL, Rodríguez-R LM, Dereeper A, López C, Koebnik R, Szurek B,**

- Cunnac S. 2013.** An Improved Method for TAL Effectors DNA-Binding Sites Prediction Reveals Functional Convergence in TAL Repertoires of *Xanthomonas oryzae* Strains. *PLoS ONE* **8**.
- Perez-Quintero AL, Szurek B. 2019.** A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 459–481.
- Petry N, Boy E, Wirth JP, Hurrell RF. 2015.** Review: The potential of the common bean (*phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients* **7**: 1144–1173.
- Pflieger S, Blanchet S, Meziadi C, Richard MMS, Thareau V, Mary F, Mazoyer C, Geffroy V. 2014.** The ‘one-step’ Bean pod mottle virus (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* **14**: 1–16.
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.
- Rakha A, Foucat L, Saulnier L, Bonnin E. 2023.** Mechanisms of action of endo-xylanases on wheat milling products under variable solid loadings conditions. *Food Chemistry*.
- Read AC, Hutin M, Moscou MJ, Rinaldi FC, Bogdanove AJ. 2020.** Cloning of the rice Xo1 resistance gene and interaction of the Xo1 protein with the defense-suppressing *Xanthomonas* effector Tal2h. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **33**: 1189–1195.
- Richard MMS, Gratias A, Alvarez Diaz JC, Thareau V, Pflieger S, Meziadi C, Blanchet S, Marande W, Bitocchi E, Papa R, et al. 2021.** A common bean truncated CRINKLY4 kinase controls gene-for-gene resistance to the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Experimental Botany* **72**: 3569–3581.
- Richter I, Uzum Z, Stanley CE, Moebius N, Stinear TP, Pidot SJ, Ferling I, Hillmann F, Hertweck C. 2020.** Secreted TAL effectors protect symbiotic bacteria from entrapment within fungal hyphae. *bioRxiv*: 1–11.
- Rimbaud L, Papaix J, Rey JF, Barrett LG, Thrall PH. 2018.** Assessing the durability and efficiency of landscape-based strategies to deploy plant resistance to pathogens.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T. 2007.** Plant Pathogen

Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science* **318**: 645–649.

Römer P, Recht S, Strauß T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S, Lahaye T. 2010. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **187**: 1048–1057.

Rose JKC, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. 2000. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiology* **123**: 1583–1592.

Rossman DR, Rojas A, Jacobs JL, Mukankusi C, Kelly JD, Chilvers MI. 2017. Pathogenicity and virulence of soilborne oomycetes on phaseolus vulgaris. *Plant Disease* **101**: 1851–1859.

Rudolph K. 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings J, Civerolo E, eds. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 193–264.

Ruh M, Briand M, Bonneau S, Jacques MA, Chen NWG. 2017. *Xanthomonas* adaptation to common bean is associated with horizontal transfers of genes encoding TAL effectors. *BMC Genomics* **18**: 1–18.

Saettler AW. 1989. *Bean Production Problems in the Tropics*.

Saettler AW. 1991. Compendium of bean diseases. In: Hall R, ed. *Diseases caused by bacteria*. St Paul: APS Press – The American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 1, 29–32.

Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* **6**: 1–11.

Schandry N, Jacobs JM, Szurek B, Perez-Quintero AL. 2018. A cautionary TALE: how plant breeding may have favoured expanded TALE repertoires in *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **19**: 1297–1301.

Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Song Q, Chavarro C, et al. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* **46**: 707–713.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671–675.

Schornack S, Ballvora A, Gürlebeck D, Peart J, Ganai M, Baker B, Bonas U, Lahaye T.

2004. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant Journal* **37**: 46–60.

Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D, et al. 2012. Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* **195**: 894–911.

Schuman MC, Baldwin IT. 2016. The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology* **61**: 373–394.

Schuster M, Sayre R. 1967. A coryneform bacterium induces purple coloured seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae. *Phytopathology*: 1064–1067.

Schwartz AR, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2017. TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: E897–E903.

Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, Forster RL. 2005. *Compendium of Bean Diseases*. APS Press – The American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 1.

Sgro GG, Costa TRD, Cenens W, Souza DP, Cassago A, Coutinho de Oliveira L, Salinas RK, Portugal R V., Farah CS, Waksman G. 2018. Cryo-EM structure of the bacteria-killing type IV secretion system core complex from *Xanthomonas citri*. *Nature Microbiology* **3**: 1429–1440.

Shaliutina-Loginova A, Francetic O, Doležal P. 2023. Bacterial Type II Secretion System and Its Mitochondrial Counterpart. *mBio* **14**.

Shen Y, Sharma P, DaSilva FG, Ronald P. 2002. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* raxP and raxQ genes encode an ATP sulphurylase and adenosine-5'-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. *Molecular Microbiology* **44**: 37–48.

Da Silva FG, Shen Y, Dardick C, Burdman S, Yadav RC, De Leon AL, Ronald PC. 2004. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 593–601.

da Silva Júnior TAF, do Nascimento DM, da Silva JC, Gonçalves RM, Maringoni AC. 2022. Common bacterial blight of beans: an integrated approach to disease management in

Brazil. *Tropical Plant Pathology* **47**: 457–469.

Singh SP, Miklas PN. 2015. Breeding common bean for resistance to common blight: A review. *Crop Science* **55**: 971–984.

Singh SP, Schwartz HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. *Crop Science* **50**: 2199–2223.

Sinha D, Gupta MK, Patel HK, Ranjan A, Sonti R V. 2013. Cell Wall Degrading Enzyme Induced Rice Innate Immune Responses Are Suppressed by the Type 3 Secretion System Effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS ONE* **8**: 1–19.

Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11998–12002.

Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW, Dunger G, Hobeika L, Cavalcante NS, Alegria MC, Barbosa LRS, Salinas RK, *et al.* 2015. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications* **6**: 1–9.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187–209.

Strauß T, Van Poecke RMP, Strauß A, Römer P, Minsavage G V., Singh S, Wolf C, Strauß A, Kim S, Lee HA, *et al.* 2012. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 19480–19485.

Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **200**: 808–819.

Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA γ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10720–10725.

Swings J, Vauterin L, Kersters K. 1993. The bacterium *Xanthomonas*. *Xanthomonas*: 121–

156.

Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Coge V, Bonas U, Büttner D. 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytologist* **187**: 983–1002.

Szurek B, Marois E, Bonas U, Ackerveken G Van Den, Genetik È, Universita M. 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3 : protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. **26**.

Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* **46**: 13–23.

Teper D, Pandey SS, Wang N. 2021. The HrpG/HrpX regulon of xanthomonads-an insight to the complexity of regulation of virulence traits in phytopathogenic bacteria. *Microorganisms* **9**: 1–16.

Teper D, Salomon D, Sunitha S, Kim JG, Mudgett MB, Sessa G. 2014. *Xanthomonas* euvesicatoria type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *Plant Journal* **77**: 297–309.

Teper D, Wang N. 2021. Consequences of adaptation of TAL effectors on host susceptibility to *Xanthomonas*. *PLoS Genetics* **17**: 1–23.

Thomas C V., Waines JG. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *Journal of Heredity* **75**: 93–98.

Thordal-Christensen H. 2020. A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**: 3963–3976.

Tian H, Wu Z, Chen S, Ao K, Huang W, Yaghmaiean H, Sun T, Xu F, Zhang Y, Wang S, et al. 2021. Activation of TIR signalling boosts pattern-triggered immunity. *Nature* **598**: 500–503.

Todorović B, Potočnik I, Rekanović E, Stepanović M, Kostić M, Ristić M, Milijašević-Marčić S. 2016. Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **51**: 832–839.

Todt H, Burk W, Guthausen G, Guthausen A, Kamlowski A. 2001. Quality control with time-domain NMR. **103**: 835–840.

Toili MEM. 2022. Insights into the molecular mechanism of the hard-to-cook defect towards genetic improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) through crispr-cas9 gene editing optimization.

Tran TT, Pérez-Quintero AL, Wonni I, Carpenter SCD, Yu Y, Wang L, Leach JE, Verdier V, Cunnac S, Bogdanove AJ, et al. 2018. Functional analysis of African *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALomes reveals a new susceptibility gene in bacterial leaf blight of rice. *PLoS Pathogens* **14**: 1–25.

Triplett LR, Cohen SP, Heffelfinger C, Schmidt CL, Huerta AI, Tekete C, Verdier V, Bogdanove AJ, Leach JE. 2016. A resistance locus in the American heirloom rice variety Carolina Gold Select is triggered by TAL effectors with diverse predicted targets and is effective against African strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **87**: 472–483.

Tugume JK, Tusiime G, Sekamate AM, Buruchara R, Mukankusi CM. 2018. Diversity and interaction of common bacterial blight disease-causing bacteria (*Xanthomonas* spp.) with *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Journal* **7**: 1–7.

Uebersax MA, Cichy KA, Gomez FE, Porch TG, Heitholt J, Osorno JM, Kamfwa K, Snapp SS, Bales S. 2022. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security—A review. *Legume Science*: 1–13.

Underwood W. 2012. The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–6.

Veltcheva M, Svetleva D, Petkova S, Perl A. 2005. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)— Problems and progress. **107**: 2–10.

Verhaegen M, Bergot T, Liebana E, Stancanelli G, Streissl F, Mingeot-Leclercq MP, Mahillon J, Bragard C. 2023. On the use of antibiotics to control plant pathogenic bacteria: a genetic and genomic perspective. *Frontiers in Microbiology* **14**.

Vidaver AK. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. In: *Xanthomonas*. 40–44.

Vieira PS, Bonfim IM, Araujo EA, Melo RR, Lima AR, Fessel MR, Paixão DAA, Persinoti

- GF, Rocco SA, Lima TB, et al. 2021.** Xyloglucan processing machinery in *Xanthomonas* pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors. *Nature Communications* **12**: 1–15.
- Viteri DM, Singh SP. 2014.** Response of 21 common beans of diverse origins to two strains of the common bacterial blight pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Euphytica* **200**: 379–388.
- Vlasova A, Capella-Gutiérrez S, Rendón-Anaya M, Hernández-Oñate M, Minoche AE, Erb I, Câmara F, Prieto-Barja P, Corvelo A, Sanseverino W, et al. 2016.** Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology* **17**: 1–18.
- Vogel J, Somerville S. 2000.** Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1897–1902.
- Wallen VR, Jackson HR. 1975.** Model for Yield Loss Determination of Bacterial Blight of Field Beans Utilizing Aerial Infrared Photography Combined With Field Plot Studies. *Phytopathology* **65**: 942.
- Wang L, Rinaldi FC, Singh P, Doyle EL, Dubrow ZE, Tran TT, Pérez-Quintero AL, Szurek B, Bogdanove AJ. 2017.** TAL Effectors Drive Transcription Bidirectionally in Plants. *Molecular Plant* **10**: 285–296.
- Wang C, Zhang X, Fan Y, Gao Y, Zhu Q, Zheng C, Qin T, Li Y, Che J, Zhang M, et al. 2015.** XA23 Is an executor protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Molecular Plant* **8**: 290–302.
- Welch RA. 1991.** Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* **5**: 521–528.
- Weller DM, Saettler AW. 1980.** Colonization and Distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in Field-Grown Navy Beans. *Phytopathology*: 500–506.
- Wu Y, Li X, Zhang J, Zhao H, Tan S, Xu W, Pan J, Yang F, Pi E. 2022.** ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **13**: 1–25.
- El Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW. 2007.** In planta horizontal

transfer of a major pathogenicity effector gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1612–1621.

Yang Y, Gabriel D w. 1995. Xanthomonas Avirulence / Pathogenicity Gene Family Encodes Functional Plant Nuclear Targeting Signals.pdf. *The American Phytopathological Society*.

Yang B, Sugio A, White FF. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10503–10508.

Yang L, Xie M, Wu Y, Cui X, Tang M, Yang L, Xiang Y, Li Y, Bai Z, Huang J, et al. 2023. Genetic mapping and regional association analysis revealed a CYTOKININ RESPONSE FACTOR 10 gene controlling flowering time in Brassica napus L. *Industrial Crops and Products* **193**: 116239.

Yoshimura A. 1983. Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in Rice Cultivar Cas 209. *Phytopathology* **73**: 1409.

Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T. 1998. Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1663–1668.

Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B. 2011. Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of Xanthomonas oryzae pv. oryzae Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 Os11N3 Gene . *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1102–1113.

Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou JM, He SY, Xin XF. 2021a. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* **592**: 105–109.

Yuan M, Ke Y, Huang R, Ma L, Yang Z, Chu Z, Xiao J, Li X, Wang S. 2016. A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria. *eLife* **5**: 1–17.

Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin XF. 2021b. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102030.

Zapata M, Beaver JS, Porch TG. 2011. Dominant gene for common bean resistance to

common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica* **179**: 373–382.

Zaumeyer WJ. 1930. The bacterial blight of beans caused by bacterium *phaseoli*. *USDA Technical Bulletin* **186**: 36.

Zaumeyer WJ, Rex Thomas H. 1957. *A Monographic study of Bean diseases and Methods for their control.*

Zhang J, Huguet-Tapia JC, Hu Y, Jones J, Wang N, Liu S, White FF. 2017. Homologues of CsLOB1 in citrus function as disease susceptibility genes in citrus canker. *Molecular Plant Pathology* **18**: 798–810.

Zhang C, Whitham SA, Hill JH. 2013. Virus-induced gene silencing in soybean and common bean. *Methods in Molecular Biology* **975**: 149–156.

Zhang J, Yin Z, White F. 2015. TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–9.

Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom JS, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, et al. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant Journal* **82**: 632–643.

Zhou Q, Sun Y, Zhao X, Yu Y, Cheng W, Lu L, Chu Z, Chen X. 2022. Bromodomain-containing factor GTE4 regulates Arabidopsis immune response. *BMC Biology* **20**: 1–15.

Zhou L, Zhang LH, Cámara M, He YW. 2017. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends in Microbiology* **25**: 293–303.

Zhu PC, Li YM, Yang X, Zou HF, Zhu XL, Niu XN, Xu LH, Jiang W, Huang S, Tang JL, et al. 2020. Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Research in Microbiology* **171**: 64–73.

Zhu W, Yang B, Chittoor JM, Johnson LB, White FF. 1998. AvrXa10 Contains an Acidic Transcriptional Activation Domain in the Functionally Conserved C Terminus. **11**: 824–832.

Ziv C, Zhao Z, Gao YG, Xia Y. 2018. Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–8.

Zou H, Wenwen Y, Zang G, Kang Z, Zhang Z, Huang J, Wang G. 2015. OsEXPB2, a β -expansin gene, is involved in rice root system architecture. *Molecular Breeding* **35**: 1–14.

Annexe : Vulgarisation



Figure 1. QR code d'une vidéo de vulgarisation (2') sur sujet et objectifs de ma thèse.



Figure 2. Exemple d'illustrations du jeu « Qui veut la peau de la pomme »

Ce travail de thèse a été une opportunité pour moi de participer à divers projets de vulgarisation, en plus des différents oraux et présentations d'affiches que j'ai pu faire. Je souhaitais incorporer cette facette à mon manuscrit car la vulgarisation me tient particulièrement à cœur.

1. Vulgarisation de la thèse

Lors de ma participation à la 15^{ème} Journées Des Doctorants de la SFR Quasav, le 17 novembre 2023, j'ai eu l'opportunité de réaliser une vidéo de deux minutes afin de présenter le sujet de ma thèse (Figure 1). Diffusée en amont de la JDD, elle introduisait le contexte et les objectifs de mon travail. Les résultats étaient quant à eux présentés oralement. Grâce à ces deux interventions, j'ai été l'une des 2 lauréates de cette manifestation. La vidéo a été mise à profit pour l'opération DigiFilles, [initiée par #DigitAg et l'ISDM](#), conduite à l'IRHS. Cette opération vise à faire découvrir les métiers en lien avec le numérique à des collégiennes et lycéennes, en mettant en avant des représentations féminines. La vidéo permettra d'illustrer des interventions de scientifiques dans des établissements scolaires.

2. Les mystérieuses taches du pain

J'ai accompagné le projet Savanturiers d'une classe de CP et Grande Section de l'école des Tilleuls à Evellys. Les enfants ont découvert des tranches de pain avec un aspect particulier (taches). A l'aide de leur raisonnement scientifique et de la mise en place d'expériences, ils ont découvert dans quelles conditions ces taches apparaissent. A la fin de leur enquête, j'ai répondu aux diverses questions qu'ils se posaient (Que sont ces taches ? Sont-elles des microbes ? Sont-elles vivantes ?). Avec la participation de collègues de l'IRHS, j'ai également réalisé une vidéo de repiquage de champignons et de photos de la diversité du règne fongique.

3. Qui veut la peau de la pomme ?

J'ai eu l'occasion de participer à la préparation du stand de l'IRHS pour la Fête de la Science 2023 à Angers. J'ai notamment réalisé les dessins afin d'illustrer un jeu de vulgarisation sur les maladies du pommier, au principe similaire à celui du Cluedo (Figure 2).

4. Livre « Comme au labo »

J'ai participé à la rédaction du livre « Comme au labo » qui rassemble des portraits de scientifiques angevins et des expériences à faire pour les enfants. J'ai également rédigé un paragraphe pour un inter-chapitre à l'attention des adultes sur la différence de la temporalité de

la recherche et celles d'autres domaines. Cette initiative vient de l'université d'Angers et de l'association les petits débrouillards. Le livre devrait voir le jour en 2024.

Titre : Diversité des effecteurs transcription activator-like (TALE) chez les *Xanthomonas* pathogènes du haricot et mécanismes impliqués dans la résistance du haricot à la graisse commune.

Mots clés : *Xanthomonas*, TALE, haricot commun, résistance, diversité

Résumé : *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*) et *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (*Xcf*) sont responsables de la graisse commune du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), une bactériose d'incidence mondiale transmise par les semences. L'agressivité de ces bactéries repose fortement sur les TALE (Transcription Activator-Like effectors), qui sont des protéines injectées dans les cellules végétales et agissant comme des facteurs de transcription eucaryotes, ce qui leur permet d'induire l'expression de gènes de sensibilité chez le haricot. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'histoire évolutive des TALE ainsi que les mécanismes de résistance du haricot à la graisse commune. Pour cela, une phylogénie basée sur des données génomiques ainsi qu'une analyse des séquences

des TALE ont été réalisées. Cela a permis de mieux appréhender la diversité des TALE de *Xcf* et *Xpp* ainsi que leurs cibles potentielles. Le rôle de gènes candidats dans la résistance a ensuite été étudié à l'aide de TALE artificiels (dTALE) ainsi que d'une analyse transcriptomique par RNAseq. Cette étude a mis en lumière le facteur de transcription PvOFP7 en tant qu'élément majeur dans la résistance contre la graisse commune. L'implication des gènes *PvExpansinA17* et *PvAP2-ERF71* dans cette résistance est également suspectée. Dans leur ensemble ces découvertes améliorent la compréhension de l'interaction entre le haricot et les agents de la graisse commune. Elles ouvrent de nouvelles perspectives pour la lutte contre la graisse commune du haricot.

Title: Diversity of transcription activator-like effectors (TALEs) in bean pathogenic *Xanthomonas* and mechanisms involved in bean resistance to common bacterial blight.

Keywords: *Xanthomonas*, TALE, common bean, resistance, diversity

Abstract: *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*) and *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (*Xcf*) are responsible for common bacterial blight of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), a seed-borne bacterial disease of worldwide significance. The aggressiveness of these bacteria highly depends on TALEs (Transcription Activator-Like effectors), which are proteins injected into plant cells acting as eukaryotic transcription factors, enabling them to induce the expression of susceptibility genes in beans. The aim of this thesis is to study the evolutionary history of TALEs and the mechanisms of bean resistance to common bacterial blight. To this end, a phylogeny based on genomic data and an analysis of TALE sequences were carried

out. This provided a better understanding of the diversity of *Xcf* and *Xpp* TALEs and their potential targets. The role of candidate genes in resistance was then studied using artificial TALEs (dTALEs) and transcriptomic analysis using RNAseq. This study highlighted the transcription factor PvOFP7 as an important element in resistance to common bacterial blight. The involvement of the *PvExpansinA17* and *PvAP2-ERF71* genes in this resistance is also suggested. Taken together, these discoveries improve our understanding of the interaction between beans and the pathogens of common bacterial blight. They open up new prospects in the fight against common bacterial blight of bean.